

	(19) 대한민국특허청(KR)	(11) 공개번호 10-2012-0120965
	(12) 공개특허공보(A)	(43) 공개일자 2012년11월02일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <i>A61K 39/36</i> (2006.01) <i>A61K 38/10</i> (2006.01) <i>A61P 27/14</i> (2006.01)	(71) 출원인 서카시아 리미티드 영국 오엑스4 4쥐에이 옥스포드 더 옥스포드 사이언스 파크 마그달렌 센트레	
(21) 출원번호 10-2012-7024247	(72) 발명자 마크 캐나다, 온타리오 해밀턴, 엘8엔 3지5, 1200 메인 스트리트 웨스트, 맥매스터 대학교, 의과대학, 에이치에스씨 4에이치20	
(22) 출원일자(국제) 2011년02월15일 심사청구일자 없음	마크 헤프너, 로드리 피터 영국, 옥스퍼드, 오엑스4 4쥐에이, 옥스퍼드 사이언스 파크, 서카시아 리미티드 (뒷면에 계속)	
(85) 번역문제출일자 2012년09월17일	(74) 대리인 이덕록	
(86) 국제출원번호 PCT/GB2011/000206		
(87) 국제공개번호 WO 2011/098778 국제공개일자 2011년08월18일		
(30) 우선권주장 1002559.1 2010년02월15일 영국(GB)		

전체 청구항 수 : 총 27 항

(54) 발명의 명칭 자작나무 알레르기애 대한 펩티드백신

(57) 요 약

본 발명자들은 자작나무종 꽃가루의 주요 알레르기항원으로부터 파생된 어떤 펩티드 조각이 이를 알레르기항원에 대하여 개인을 탈감각화시키는 것에 유용하다는 것을 발견했다. 자작나무의 Bet v2, Bet v1, Bet v3, Bet v4, Bet v6, Bet v7(속명: *Betulaceae*)로부터 파생된 펩티드 조각은 특히 유용하다.

본 발명의 펩티드는 펩티드-주 조직적합 복합체 상호작용(peptide-MHC interactions)과 주 조직적합 복합체 클래스II 결합분석시험(MHC class-II binding assays)을 예측하기위해 인실리코 분석을 통하여 주 조직적합 복합체 클래스II-결합 T세포 항원결정부위로서 선택되었다. 추가적인 항원결정부위는 상동관계로 확인되었다.

펩티드 면역에 근거한 탈감각화 시도에 관련되는 어려움은 알레르기항원의 적절한 크기와 구역을 어떻게 선택하는가에 놓여있다. 펩티드 크기의 선택은 중요하다. 펩티드가 너무 작으면 백신은 면역반응을 이끌어내는데 효과적이지 못할 것이다. 펩티드가 너무 크거나 항원 전체가 개인에게 도입된다면 초과민반응 같은 역반응을 유발할 위험성이 있고 이것은 치명적일 수 있다.

본 발명의 폴리펩티드는 그것으로 하여금 분자 전체에서 면역글로불린E 결합 항원결정부위의 구조를 유지하게 하는 중요한 4차구조를 소유하지 않을 정도로 작으면서 T세포 특이성을 유지하기 위해 선택되었다. 그러므로 본 발명의 폴리펩티드는 비만세포와 호염구 같은 세포에 인접한 특이적 면역글로불린E 분자의 중요한 교차결합을 유도하지 않고 따라서 중요한 히스타민 방출을 유도하지 않는다.

본 발명의 이점은 주 조직적합 복합체(MHC)분자를 포괄적으로 공격할 수 있는 펩티드의 능력이다. T세포 수용체는 특이성 면에서 매우 가변적이다. 가변성은 세포 내 유전자 재조합을 통해 항체분자와 함께 발생된다. T세포 수용체(TCRs)는 주조직적합 복합체(MHC)유전자에 의해 암호화된 분자에 결합하는 짧은 펩티드 형태의 항원을 인지한다. 이 유전자 산물들은 이식에서 사용되는 “조직형(tissue type)”이 생기게 하는 같은 분자이고, 또한 통용되는 용어인 인간 백혈구 항원 분자(Human Leukocyte Antigen molecule;HLAs)로 나타낸다. 각 주 조직적합 복합체분자는 그것의 모양과 전하 때문에 오직 제한된 펩티드 그룹에 결합할 수 있는 펩티드 결합 홈을 가진다. 하나의 주 조직적합 복합체분자에 결합하는 펩티드는 다른 주 조직적합 복합체분자들에 결합할 필요가 없다.

항원이나 알레르기항원 같은 단백질 분자가 B림프구, 수지상세포, 단핵구 그리고 대식세포 같은 항원제시세포에 의해 잡아먹힐 때, 분자는 세포 내에서 효소로 분해된다. 분해과정은 적절한 크기와 전하, 모양이라면 어떤 주 조직적합 복합체분자의 펩티드 결합 홈 안에 결합하고 그 뒤에 항원제시세포 표면에 펩티드 조각을 내보인다. 펩티드/MHC 복합체가 항원제시세포 표면에 충분히 제시된다면 그것은 적절한 펩티드/MHC-특이적인 T세포 수용체를 가지고 있는 T세포를 활성화시킨다.

주 조직적합 복합체(MHC)의 다형성 성질 때문에 인간처럼 인간에서는 개개인이 세포표면에 다양한 조합의 주 조직적합 복합체(MHC) 분자를 발현한다. 다양한 주 조직적합 복합체(MHC) 분자들은 펩티드의 크기, 전하 그리고 모양을 근거로 한 같은 분자로부터 다양한 펩티드에 결합할 수 있기 때문에 다양한 개개인은 주 조직적합 복합체(MHC)분자에 결합하는 다양한 목록의 펩티드를 전시할 수 있을 것이다. 인간 같은 이종교배 인구에서 보편

적인 주 조직적합 복합체(MHC)결합 웨티드 항원결정부위의 확인은 동종교배한 동물(실험실 쥐의 가계(strains)처럼)보다 더욱 어렵다. 웨티드 결합과 제시에서 개인과 내재된 차이 사이의 주 조직적합 복합체(MHC)발현의 차이에 근거하여 인간의 탈감각화 치료에 이용될 단일 웨티드가 확인될 것 같지 않다.

그러나 본 발명의 웨티드는 다수의 다양한 주 조직적합 복합체(MHC)분자를 공격함으로써 인류에게 넓은 범위의 효능을 제공한다. 그러므로 본 발명의 웨티드로 만들어낸 백신은 넓은 유용성을 가진다. 그래서 본 발명은 면역관용의 유도를 포함함으로써 자작나무 꽃가루에 대한 알레르기를 예방하거나 치료하는데 이용하는데 적합한 조성물을 제공한다.

i)폴리웨티드 SEQ ID NO: 74 (BIR12B;AKYMIQGEPGRVIRGK), SEQ ID NO: 72 (BIR11; FPQFKPQEITGIMK), SEQ ID NO: 71 (BIR10; GSWAQSSFPQFK), SEQ ID NO: 73 (BIR12A;PTGMFVAGAKYMIQGR), SEQ ID NO: 75 (BIR13;IKYMIQGEAGAVIRGK), SEQ ID NO: 76 (BIR14;EAGAVIRGKKGSGGIT)중에서 적어도 1개 또는 그의 변종, 그리고

ii)폴리웨티드 SEQ ID NO: 53 (Bir02J;PAARMFKAFILEGDKLVPK), SEQ ID NO: 48 (Bir01I; FNYETETTSVIPAARK), SEQ ID NO: 54 (Bir04;PGTIKKISFPEGFPFKYV), SEQ ID NO: 67 (Bir09;ETLLRAVESYLLAHSDAY), SEQ ID NO: 60 (BIR07;SNEIKIVATPDGGSILK), SEQ ID NO: 63 (Bir07C;SNEIKIVATPEGGSILK)중에서 적어도 1개 또는 그의 변종,

여기에서 말한 변종이란:

I) (i)또는(ii)에 특이적인 폴리웨티드에 상응하는 염기서열을 포함하는 30개 아미노산의 긴 폴리웨티드.

II) (i)또는(ii)에 특이적인 폴리웨티드에 상응하는 염기서열에 적어도 65%의 상동관계를 가진 염기서열을 포함하는 9~30개 아미노산의 폴리웨티드, 이 염기서열은 상기에 언급된 상응하는 폴리웨티드에 면역관용을 유도할 수 있다.

III) (i)또는(ii)에 특이적인 폴리웨티드에 상응하는 염기서열에 적어도 65%의 상동관계를 가지고 적어도 9개의 인접한 아미노산의 염기서열을 포함하는 9~30개 아미노산 길이의 폴리웨티드, 이 염기서열의 적어도 9개의 인접한 아미노산이나 상동관계의 염기서열은 상기에 언급된 상응하는 폴리웨티드에 면역관용을 유도할 수 있다.

또한 적어도 3개의 다른 폴리웨티드를 포함함으로써 자작나무 꽃가루의 알레르기를 예방하거나 치료하는데 유용한 조성물을 제공한다.

- (a) Bir12B(AKYMIQGEPGRVIRGK), 또는 그의 변종;
- (b) Bir02J(PAARMFKAFILEGDKLVPK), 또는 그의 변종;
- (c) Bir01I(FNYETETTSVIPAARK) 또는 그의 변종;
- (d) Bir04(PGTICKISFPEGFPFKYV) 또는 그의 변종;
- (e) Bir09(ETLLRAVESYLLAHSDAY) 또는 그의 변종;
- (f) Bir16A(AERERIFKRFDANGEK) 또는 그의 변종;
- (g) Bir07(SNEIKIVATPDGGSILK) 또는 그의 변종;
- (h) Bir07C(SNEIKIVATPEGGSILK) 또는 그의 변종;
- (i) Bir011(FPQFKPQEITGIMK) 또는 그의 변종;
- (j) Bir15(SLNTLRLRRIFDLFDK) 또는 그의 변종;

여기에서 말한 변종이란:

I) (a)내지(j)에 특이적인 폴리웨티드에 상응하는 염기서열을 포함하는 30개 아미노산의 긴 폴리웨티드.

II) (a)내지(j)에 특이적인 폴리웨티드에 상응하는 염기서열에 적어도 65%의 상동관계를 가진 염기서열을 포함하는 9~30개 아미노산의 폴리웨티드, 이 염기서열은 상기에 언급된 상응하는 폴리웨티드에 면역관용을 유도할 수 있다.

III) (a)내지(j)에 특이적인 폴리웨티드에 상응하는 염기서열에 적어도 65%의 상동관계를 가지고 적어도 9개의 인접한 아미노산의 염기서열을 포함하는 9~30개 아미노산 길이의 폴리웨티드, 이 염기서열의 적어도 9개의 인접한 아미노산이나 상동관계의 염기서열은 상기에 언급된 상응하는 폴리웨티드에 면역관용을 유도할 수 있다.

(72) 발명자

레이들러, 폴

영국, 옥스퍼드, 오엑스4 4쥐에이, 옥스퍼드 사이
언드 파크, 서카시아 리미티드

레이튼, 가이

영국, 옥스퍼드, 오엑스4 4쥐에이, 옥스퍼드 사이
언드 파크, 서카시아 리미티드

특허청구의 범위

청구항 1

면역관용을 유도함으로써 자작나무 꽃가루 알레르기 예방 및 치료용 적합한 하기를 포함하는 약학적 조성물:

(i) 폴리펩티드 SEQ ID NO:74(BIR12B;AKYMIQGEPGRVIRK), SEQ ID NO:72(BIR11 ;FPQFKPQEITGIMK), SEQ ID NO:71(BIR10;GSVWAQSSSFQPK), SEQ ID NO:73(BIR12A ;PTGMFVAGAKYMIQGR), SEQ ID NO:75(BIR13;IKYMIQGEAGAVIRGK), SEQ ID NO:76 (BIR14;EAGAVIRKKGSGGIT) 중에서 적어도 하나를 포함하는 펩티드 또는 그의 변종 및;

(ii) 폴리펩티드 SEQ ID NO:53(Bir02J;PAARMFKAFILEGDKLVPK), SEQ ID NO:48 (Bir01I;FNYETETTSVIPAAARK), SEQ ID NO:54(Bir04;PGTIKKISFPEGFPFKYV), SEQ ID NO:67(Bir09;ETLLRAVESYLLAHSDAY), SEQ ID NO:60(Bir07;SNEIKIVATPDGGSILK), SEQ ID NO:63(Bir07C;SNEIKIVATPEGGSILK) 중에서 적어도 하나를 포함하는 펩티드 또는 그의 변종,

여기서, 상기 변종은:

I) (i) 또는 (ii)에 특이적인 폴리펩티드에 상응하는 염기서열을 포함하는 아미노산 30개까지의 긴 폴리펩티드, 또는

II) (i) 또는 (ii)에 특이적인 폴리펩티드에 상응하는 염기서열에 적어도 65%의 상동성을 가지는 염기서열을 포함하는 아미노산 9개 내지 30개의 폴리펩티드, 상기 염기서열은 상기 상응하는 폴리펩티드에 면역관용을 유도하는 능력을 가지거나; 또는

III) (i) 또는 (ii)에 특이적인 폴리펩티드에 상응하는 염기서열의 적어도 9개의 근접한 아미노산 염기서열을 포함하는 아미노산 9개 내지 30개의 폴리펩티드, 또는 상기 9개의 근접한 아미노산에 적어도 65%의 일치관계를 가지는 염기서열, 적어도 한 9개의 근접한 염기서열 또는 상동성을 가지는 염기서열은 상기상응하는 폴리펩티드에 면역관용을 유도하는 능력을 가진다.

청구항 2

제1항에 있어서,

제1항에서 선택되지 않은 폴리펩티드 (i) 또는 (ii) 또는 그의 변종 중에서 적어도 1개를 더 첨가하여서 되는 자작나무 꽃가루 알레르기 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

SEQ ID NO:77(Bir15;SLNTLRLRRIFDLFDK) 또는 SEQ ID NO:78 (Bir16A ;AERERIFKRFDANGEK) 또는 그의 변종 중에서 적어도 1개를 더 포함하는 폴리펩티드로 구성되는 자작나무 꽃가루 알레르기 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제2항에 있어서,

(a) 폴리펩티드 Bir12B(AKYMIQGEPGRVIRGK), 또는 그의 변종;

(b) 폴리펩티드 Bir02J(PAARMFKAFILEGDKLVPK), 또는 그의 변종;

(c) 폴리펩티드 Bir01I(FNYETETTSVIPAARL), 또는 그의 변종;

으로 구성되는 자작나무 꽃가루 알레르기 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항에 있어서,

상기 Bir01I의 변종은 Bir01F(FNYETEATSVIPAARK), Bir01G(FNYEIEATSVIPAARK) 또는 Bir01H(FNYEETTSVIPAARK); 및/또는

상기 Bir02J의 변종은 Bir02E(PAARLFKAFILEGDTLIPK), Bir02G (PAARLFKAFILEGDNLIPK), Bir02I(PAARMFKAFILD) 또는 Bir02D(PAARMFKAFILDGDKLVPK); 및/또는

상기 Bir09의 변종은 Bir09A(GETLLRAVESYLLAHS), Bir09B (KEMGETLLRAVESYLLAHS) 또는 Bir09C(KEKGETLLRAVESYLLAHS); 및/또는

상기 Bir16A의 변종은 Bir16B(AERERIFKRFDAGGEGK).

청구항 6

하기로부터 선택된, 적어도 3개의 다른 폴리펩티드로 구성되어 면역관용을 유도함으로써 자작나무 꽃가루 알레르기의 예방 및 치료용 약학적 조성물.

- (a) Bir12B(AKYMVIQGEPGRVIRGK), 또는 그의 변종;
- (b) Bir02J(PAARMFKAFILEGDKLVPK) 또는 그의 변종;
- (c) Bir01I(FNYETETTSVIPAARL) 또는 그의 변종;
- (d) Bir04(PGTIKKISFPEGFPFKYV) 또는 그의 변종;
- (e) Bir09(ETLLRAVESYLLASHSDAY) 또는 그의 변종;
- (f) Bir16A(AERERIFKRFDANGEGK) 또는 그의 변종;
- (g) Bir07(SNEIKIVATPDGGSILK) 또는 그의 변종;
- (h) Bir07C(SNEIKIVATPEGGSILK) 또는 그의 변종;
- (i) Bir011(FPQFKPQEITGIMK) 또는 그의 변종;
- (j) Bir15(SLNTLRLRRIFDLFDK) 또는 그의 변종;

여기서 변종은:

I) (a)에서 (j)에 특이적인 폴리펩티드에 상응하는 염기서열을 포함하는 아미노산 30개까지의 긴 폴리펩티드, 또는

II) (a) 또는 (j)에 특이적인 폴리펩티드에 상응하는 염기서열에 적어도 65%의 일치관계를 가지는 염기서열을 포함하는 아미노산 9개 내지 30개의 폴리펩티드, 이 폴리펩티드는 앞서 언급한 상응하는 폴리펩티드에 면역관용을 유도하는 능력을 가지거나; 또는

III) (a) 또는 (j)에 특이적인 폴리펩티드에 상응하는 염기서열의 적어도 9개의 근접한 아미노산 염기서열을 포함하는 아미노산 9개 내지 30개의 폴리펩티드, 또는 상기 9개의 근접한 아미노산에 적어도 65%의 상동성을 가지는 염기서열, 적어도 9개의 근접한 염기서열 또는 상동성을 가지는 상기 염기서열이며

상기 상응하는 폴리펩티드에 면역관용을 유도할 수 있다.

청구항 7

제6항 기재의

- a) Bir12B(AKYMVIQGEPGRVIRGK) 또는 그의 변종;
- b) 폴리펩티드 Bir02J(PAARMFKAFILEGDKLVPK) Bir01I(FNYETETTSVIPAARK) 또는

그의 변종 중에서 적어도 1개; 및

c)상기 선택되지 않은 폴리펩티드 a)내지 j) 중에서 적어도 1개.

를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 8

제7항 기재의

폴리펩티드 Bir12B(AKYMVIQGEPGRVIRGK) 또는 그의 변종, 폴리펩티드 Bir02J(PAARMFKAFILEGDKLVPK) 또는 그의 변종, 폴리펩티드 Bir01I (FNYETETTSVIPAARK) 또는 그의 변종, 및 상기의 선택되지 않은 폴리펩티드

a)내지 j)중의 적어도 1개의 폴리펩티드를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 9

제6항 내지 제8항 중 어느 항 기재의

폴리펩티드 Bir12B(AKYMVIQGEPGRVIRGK) 또는 그의 변종, 폴리펩티드 Bir02J(PAARMFKAFILEGDKLVPK) 또는 그의 변종, 폴리펩티드 Bir01I (FNYETETTSVIPAARK) 또는 그의 변종, 폴리펩티드 Bir04(PGTIKKISFPEGFPKYV) 또는 그의 변종, 폴리펩티드 Bir09(ETLLRAVESYLLASHDAY) 또는 그의 변종, 폴리펩티드 Bir07C(SNEIKIVATPEGGSILK) 또는 그의 변종, 폴리펩티드 Bir16A (AERERIFKRFDANGEKGK) 또는 그의 변종을 포함하지만 선택적으로 더 포함하는 폴리펩티드가 없는 것이 특징인 약학적 조성물.

청구항 10

제6항 내지 제8항 중 어느 항 기재의

폴리펩티드 Bir12B(AKYMVIQGEPGRVIRGK) 또는 그의 변종, Bir02J (PAARMFKAFILEGDKLVPK) 또는 그의 변종, Bir01I(FNYETETTSVIPAARK) 또는 그의 변종, Bir04(PGTIKKISFPEGFPKYV) 또는 그의 변종, Bir07C(SNEIKIVATPEGGSILK) 또는 그의 변종, Bir16A(AERERIFKRFDANGEKGK) 또는 그의 변종, Bir09B(KEMGETLLRAVESYLLAHS) 또는 그의 변종을 포함하지만 선택적으로 더 포함하는 폴리펩티드가 없는 것이 특징인 약학적 조성물.

청구항 11

제6항 내지 제8항 중 어느 항 기재의

폴리펩티드 Bir12B(AKYMVIQGEPGRVIRGK) 또는 그의 변종, Bir02J (PAARMFKAFILEGDKLVPK) 또는 그의 변종, Bir01I(FNYETETTSVIPAARK) 또는 그의 변종, Bir04(PGTIKKISFPEGFPKYV) 또는 그의 변종, Bir07C(SNEIKIVATPEGGSILK) 또는 그의 변종, Bir16A(AERERIFKRFDANGEKGK) 또는 그의 변종을 포함하지만 선택적으로 더 포함하는 폴리펩티드가 없는 것이 특징인 약학적 조성물.

청구항 12

제6항 내지 제11항 중 어느 항 기재의

상기 Bir01I의 변종 Bir01F(FNYETEATSVIPARK), Bir01G(FNYEIEATSVIPARK) 또는 Bir01H(FNYEIETTSVIPAARK); 및/또는

상기 Bir02J의 변종 Bir02E (PAARLFKAFILEGDTLIPK), Bir02G (PAARLFKAFILEGDNLIPK), Bir02I(PAARMFKAFILD) 또는 Bir02D(PAARMFKAFILDGDKLVPK); 및/또는

상기 Bir09의 변종 Bir09A(GETLLRAVESYLLAHS), Bir09B(KEMGETLLRAVESYLLAHS) 또는 Bir09C(KEKGETLLRAVESYLLAHS)로부터 선택되거나; 및/또는
상기 Bir16A의 변종 Bir16B(AERERIFKRFDAGGEGK)으로 구성되는 것이 특징인 약학적 조성물.

청구항 13

제1항 내지 제12항에 있어서,

모집단에서 자작나무 꽃가루 알레르기에 걸린 개체의 패널에서 적어도 50% 또는 60%정도 면역관용을 유도할 수 있고

적어도 1개의 추가 폴리펩티드에서 총 13개의 특정한 폴리펩티드를 포함하는 조성물.

상기에서 추가 폴리펩티드는:

- (a)상기에서 선택되지 않은 SEQ ID No: 1-80의 적어도 9개 또는 그 이상의 근접한 아미노산에 적어도 65%의 염기서열 동일성을 가지는 염기서열을 포함하고
- (b)상기 폴리펩티드 9 내지 30개 아미노산 길이를 가지는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 14

제1항 내지 제13항에 있어서,

9 내지 20개 또는 13 내지 17개 아미노산 길이의 적어도 1개의 폴리펩티드를 구성하는 약학적 조성물, 여기서 상기 폴리펩티드는 SEQ ID No: 1-80에 적어도 70%의 염기서열 동일성을 가진다.

청구항 15

제1항 내지 제14항에 있어서,

상기 1개 이상의 폴리펩티드는 하기 변형들 중 1개 이상을 선택하여서 되는 약학적 조성물:

- (i) N 말단 아세틸화;
- (ii) C 말단 아미드화;
- (iii) 아르기닌 및/또는 리신의 결사를 아민의 1개 또는 그 이상의 수소가 메틸그룹으로 치환;
- (iv) 글리코실화; 및
- (v) 인산화.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서,

적어도 1개의 펩티드는 용해될 수 있도록 설계할 수 있으며 하기를 포함한다:

- i)T 세포 항원결정부위 주변에 있는 펩티드 잔기쪽으로 N말단을: N말단 2?6개의 근접한 아미노산에 즉각 상응하는 1?6개의 근접한 아미노산이 펩티드가 파생한 단백질 배열의 상기 잔기쪽으로, 및/또는
- ii) T 세포 항원결정부위 주변에 있는 펩티드 잔기쪽으로 C말단을: C말단 1?6개의 근접한 아미노산에 즉각 상응하는 1?6개의 근접한 아미노산이 펩티드가 파생한 단백질 배열의 상기 잔기쪽으로, 및/또는
- iii) T세포 항원결정부위 주변에 있는 펩티드 잔기의 N말단과 C말단을: 아르기닌, 리신, 히스티딘, 글루탐산, 아스파르트산 중에서 선택된 적어도 1개의 아미노산을.

여기서, 폴리펩티드는 용해도가 적어도 3.5mg/mL이고, T세포 항원결정부위의 용해도는 3.5mg/mL미만이다.

청구항 17

제1항 내지 제16항에 있어서,

적어도 하나 이상의 펩티드는 추가적으로 가용되도록 설계되어진 약학적 조성물:

- i) 펩티드의 음성 염기서열의 시스테인 잔기가 세린이나 2-아미노뷰트릭산으로 대체된다; 및/또는
- ii) 펩티드의 자연상태 염기서열의 N이나 C말단에 3개의 아미노산의 소수성 잔기를 삭제한다; 및/또는
- iii) T세포 항원결정부위를 구성하지 않는, 펩티드의 자연상태 염기서열의 N이나 C말단의 4개의 아미노산의 아스파르트산-그리신 염기서열을 구성하는 연속적인 2개의 아미노산을 삭제한다;
- iv) 하나 이상의 양성전하를 띤 잔기가 펩티드의 자연상태 염기서열의 N이나 C말단에 추가된다.

청구항 18

제1항 내지 제17항에 있어서,

상기 각 폴리펩티드는 0.03 내지 200nmol/mL, 0.3 내지 200nmol/mL, 50내지 200nmol/mL 또는 30 내지 120nmol/mL 범위 안의 농도를 가지는 약학적 조성물.

청구항 19

제1항 내지 제18항에 있어서,

글루코코르티코이드, 비타민 D 및/또는 라파마이신으로부터 선택된, 약학적으로 허용할 수 있는 담체 또는 희석제 및/또는 선택적으로 1개 또는 그 이상의 보조제를 포함하지만 추가로 더 포함되는 펩티드가 없는 것이 특징인 약학적 조성물.

청구항 20

제1항 내지 제17항 기재의 조성물의 생산을 야기하는 폴리뉴클레오티드 염기서열을 적어도 1개 포함하며 면역관용을 유도함으로써 자작나무 꽃가루 알레르기의 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 21

제1항 내지 제17항 기재의 각각 다른 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 염기서열을 4개 이상을 포함하며 면역관용을 유도함으로써 자작나무 꽃가루 알레르기의 예방 및 치료용 백터.

청구항 22

하기로 구성된 산물.

i) 폴리펩티드 SEQ ID NO:74(Bir12B;AKYMIQGEPEGRVIRGK), SEQ ID NO:72(Bir011 ;FPQFKPQEITGIMK), SEQ ID NO:71(BIR10;GSVWAQSSFPQFK), SEQ ID NO:73(BIR12A;

PTGMFVAGAKYMIQGR), SEQ ID NO:75(BIR13;IKYMIQGEAGAVIRGK), SEQ ID NO:76 (BIR14;EAGAVIRGKKGSGGIT)중의 적어도 하나, 또는 제1항 (I) 내지 (III)에서 정의한 그의 변종,

ii) 폴리펩티드 SEQ ID NO:53(Bir02J;PAARMFKAFILEGDKLVPK), SEQ ID NO:48 (Bir01I;FNYETETTSVIPAAARK), SEQ ID

NO:54 (Bir04;PGTIKKISFPEGFPFKYV), SEQ ID NO: 67(Bir09;ETLLRAVESYLLAHSDAY), SEQ ID NO:60(BIRO7;SNEIKIVATPDGGSILK), SEQ ID NO:63(Bir07C;SNEIKIVATPEGGSILK), 또는 제1항 (I)내지(III)에서 정의한 변종,

여기서, 상기 각기 다른 폴리펩티드는 동시의, 독립적인 또는 연속적인 용도로 면역관용을 유도함으로써 자작나무 꽃가루 알레르기를 예방 및 치료에 사용된다.

청구항 23

제1항 내지 제20항 중의 어느 항에 따른 조성물; 제21항에 따른 백터; 제22항에 따른 산물; 그리고 약학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제, 그리고 글루코코르티코이드, 비타민 D, 라파마이신으로부터 선택된 하나 이상의 보조제를 구성하여 면역 관용을 유도함으로써 자작나무 꽃가루 알러지를 예방 및 치료용 약학적 제제.

청구항 24

제23항 기재의 제형은 경구투여, 비강투여, 국소투여, 피하투여, 설하투여, 피부내투여, 협부투여, 표피투여, 흡입이나, 주사, 패치투여용 중 어느 하나임을 특징으로 하는 약학적 제제.

청구항 25

개인적으로 추가의 폴리펩티드 알레르기항원에 대한 면역관용을 유도하는데 이용하는, 추가의 폴리펩티드 알레르기항원을 더 포함하는 제1항 내지 제20항에서 정의한 약학적 조성물 또는 제22항에서 정의한 산물.

청구항 26

상기 조성물과 상기 T세포가 접촉하는 것을 포함하는 제1항에 정의된 조성물을 T세포가 인지하는지 결정하고, 상기 T세포가 상기 조성물에 의해 활성화되는지 검사하는 인비트로(*in vitro*) 방법.

청구항 27

제26항에 있어서,

개인이 자작나무 꽃가루에 알레르기를 가지고 있는지, 가질 위험이 있는지 결정하기 위해 수행하는 인비트로방법.

명세서

기술분야

[0001]

본 발명은 자작나무 알레르기를 예방 또는 치료하기 위한 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002]

T 세포 항원인식은 주 조직적합 복합체 분자(MHC)와 관련하여 항원조각(펩티드)를 세포표면에 제시하기 위해 항원제시세포(APCs)를 필요로 한다. T세포는 자신의 항원 특이적인 T 세포 수용체(TCRs)를 이용하여 APC에 의해 제시된 항원 조각을 인지한다. 이런 인지는 그동안 인지되었던 항원을 제거하기 위한 다양한 반응을 일으키기 위해 면역계에 원인으로서 작용한다.

[0003]

인간 같은 생물체의 면역계에 의한 외부 항원의 인지는 어떤 경우에는 아토피 피부염이라고 부르는 질병이 발생할 수 있다. 후자의 예는 천식, 아토피 피부염과 알레르기성 비염을 포함하는 알레르기성 질병이다. 이 질병들

에서 B 림프구가 외부적으로 파생된 항원에 결합하는 면역글로불린E(Immunoglobulin E; IgE) 클래스 항체(인간의 경우)를 발생시키고, 이 맥락에서 이 분자들이 항원으로서 알레르기 반응을 끌어내기 때문임을 나타낸다. 알레르기항원에 특이적인 면역글로불린E의 생산은 역시 알레르기 항원에 특이적으로 활성화되는 T 림프구에 의존한다. 알레르기항원 특이적 면역글로불린E 항체는 호염구와 대식세포 같은 세포 표면에 발현되는 면역글로불린E 수용체 때문에 그 세포 표면에 결합한다.

[0004] 알레르기항원에 의해 면역글로불린E와 결합한 세포표면의 교차결합은 히스타민(histamine), 5-하이드록시트립타민(5-hydroxytryptamine) 같은 염증성 매개물질과 술피도류코트리엔(sulphidoleukotrienes)같은 막 매개물질의 방출을 야기하는 이 효과세포들의 과립감소의 결과를 야기한다. 면역글로불린E 의존적 경우와 더불어 천식 같은 어떤 알레르기성 질병은 면역글로불린E-비의존적경우로 특징지어진다.

[0005] 알레르기성 면역글로불린E 매개성 질병은 증상완화와 방지를 제공하는 물질로 현재 치료된다. 이런 물질들의 예는 항히스타민(anti-histamine), 베타2 길항체(β_2 agonists), 그리고 당질피질스테로이드(glucocorticosteroids)이다. 게다가 어떤 면역글로불린E 매개성 질병은 알레르기항원 요소나 추출물의 주기적인 감염을 포함하는 탈감각화(desensitisation) 과정에 의해 치료된다. 탈감각화치료는 알레르기항원에 대해 면역글로불린E와 경쟁하는 면역글로불린G반응을 유발하거나 알레르기항원에 대항하는 면역글로불린E의 합성을 막는 특이적인 억제 T세포를 유발한다. 이런 형태의 치료법은 항상 효과적이지 않을 뿐 아니라 심각한 부작용, 특히 일반적인 초과민성쇼크를 유발한다. 이것은 즉시 인지하여 아드레날린으로 치료하지 않으면 치명적일 수 있다. 다른 외부의 알레르기항원에 대한 면역 반응성을 바꾸거나 알레르기 반응을 스스로 유발하지 않은 채, 특정한 알레르기항원에 대해 원치 않는 알레르기 면역반응을 감소시키거나 제거하는 치료방법은 알레르기에 걸린 개인들에게 많은 이익이 될 것이다.

[0006] 꽃가루 알레르기항원은 인간과 동물에게 천식, 알레르기성 비염과 알레르기성 피부염을 포함하여 알레르기 질병을 일으키는 주요 유발원으로 인식된다. 미국인구의 적어도 10%가 여러 상황에서, 각각의 다양한 범위의 꽃가루 알레르기로 고통받는다. 나무 꽃가루에서 특히 쌍떡잎 식물의 나무, 예를 들어 자작나무, 오리나무, 개암나무, 서어나무와 오크나무에서 제시되는 단백질은 특히 중요하다. 이들 종중에서 자작나무 꽃가루 알레르기항원은 나무 꽃가루에 대한 알레르기 반응을 유발하는 가장 빈번한 개시제이다(Jarolim et al: Allergy 1989;44(6):385-95). 예를 들어 대략 25%의 건초열 환자는 자작나무 꽃가루에 즉각 반응한다. 건초열은 재채기, 콧물, 가려운 눈으로 특징지어지는 계절적인 알레르기 형태에 대한 일반적인 용어이다. 나무 꽃가루에 대한 알레르기는 4월 근처에 전형적으로 발생하는(북반구에서) 자작나무 꽃가루 철을 포함하여 봄 기간에 가장 문제가 많다. 그러나 오리나무와 개암나무 같은 어떤 관련 타입의 나무들은 일찍이 1월에 공기로 운반되는 꽃가루를 방출한다(북반구에서). 이것들은 3월에 느릅나무, 베드나무, 물푸레나무에 뒤이어 생기는데 오크나무는 늦은 4월과 이른 5월에 따라온다.

[0007] 미국에서 성인을 대상으로 계산해본 결과 건초열은 5번째로 중요한 만성질병이고 직장결근의 주요 원인이다. 그 결과 직장에서 매년 4백만일의 병가로 인한 결근 및 일을 할 수 없게 되고, 총 생산성 손실액 중에서 7억 달러 이상의 비용을 초래한다. 또한 알레르기는 가장 빈번하게 소아 만성질병으로 보고되면서 아이들의 40%이상의 활동을 제한한다. 매년 알레르기는 미국에서 천 7백만 외래환자의 의료방문을 차지할 뿐만 아니라 건초열 같은 계절적인 알레르기는 이 알레르기 외래방문의 절반 이상을 차지한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 따라서, 본 발명의 목적은 자작나무 알레르기항원으로부터 면역관용을 유도하는 항원결정부위를 제공하는 것을 특징으로 하는 자작나무 알레르기항원으로부터 파생된 웨პ티드를 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명의 상기 목적은 자작나무 알레르기에 걸린 개인에게 자작나무 알레르기항원으로부터 파생된 폴리웨პ티드 조성물; 폴리웨პ티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 염기서열을 4개 이상 포함하는 백터; 그리고 약학적으로 허용 가능한 운반체 및 회석체, 그리고 글루코코르티코이드, 비타민 D, 라파마이신으로부터 선택된 하나 이상의 보조제를 구성하여 면역관용을 유도함으로써 자작나무 알레르기를 예방, 치료하는데 이용되는 약학적인 제제를 경구투여, 비강투여, 국소투여, 피하투여, 설하투여, 피부내투여, 협부투여, 표피투여, 흡입이나, 주사, 패치에 의한 투여를 통해 달성한다.

발명의 효과

[0010]

본 발명은 자작나무 알레르기 항원에 대한 원치 않는 알레르기 면역반응을 감소시키거나 제거하는 치료방법을 제 공함으로써 자작나무 알레르기로부터 고통받는 또는 고통을 받을 위험성이 있는 사람들에게 큰 유익이 될 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0011]

본 발명은 면역관용 유도에 이용될 수 있는 펩티드에 관한 것이다. 이런 펩티드는 SEQ ID NOS:1내지80에서 보이는 염기서열을 포함하거나, 구성하거나, 필수적으로 구성한다. 이 특이적인 펩티드의 변종 또한 사용된다. 변 종은 SEQ ID NOS:1내지80 중 하나 또는 그것의 상동인 조각의 염기서열을 포함하거나, 구성하거나, 필수적으로 구성한다.

[0012]

본 발명은 또한 본 발명의 폴리펩티드를 구성하는 생산물과 제제를 제공하고, 조성물과, 생산물과 면역관용 유 도에 의해 자작나무 알레르기를 예방하거나 치료하는데 쓸 수 있는 본 발명의 폴리펩티드를 발현할 수 있는 폴 리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터를 제공한다. 이런 면역관용 유도는 전형적으로 SEQ ID NOS: 1내지80에서 제 시된 항원결정부위(예를 들어 MHC class II 결합 T세포 항원결정부위)가 될 것이다.

[0013]

수종(Tree species)

[0014]

보편적으로 자작나무라고 알려진 Betulaceae군의 나무 종은 세계적인 나무 알레르기, 특히 건초열 같은 나무 꽃 가루와 관련되어 있는 알레르기의 높은 비율의 원인이 된다. 다른 중요한 나무 종은 오리나무, 개암나무, 서어 나무 그리고 오크나무를 포함한다.

[0015]

자작나무, 예를 들어 Silver Birch (*Betula pendula*)는 토양 pH 약 3~7의 넓은 범위의 서식지를 견딘다. 그들 은 유럽의 대부분 지역과 아시아의 일부 지역이 원산지이나 북반구의 온도와 북풍 기후에서 그리고 북극대에서 특히 캐나다와 북아메리카의 다른 지역에서 발견되어 전 세계를 통틀어 보편적이라 할 수 있다. 자작나무는 일반적으로 4월과 5월 사이에 꽃을 피운다(북반구에서).

[0016]

자작나무 꽃가루 알레르기 항원의 펩티드 조각

[0017]

본 발명자들은 자작나무 꽃가루 알레르기 항원 단백질에서 MHC class-II 결합 T세포 항원결정부위를 구성하는 지역을 확인했다. 본 발명자들은 또한 주요한 자작나무 꽃가루 알레르기 항원 내에서 MHC class-II 결합 T세포 항원결정부위에 상응하는 지역이 앞서 언급한 알레르기 항원의 다양한 개별형 사이에서 매우 보존된다는 것을 보여 주었다. 이 정보에 근거하여 각 단백질의 관련된 지역에서 파생된 펩티드는 그 단백질의 모든 개별형에 면역관 용을 유도함으로써 자작나무 알레르기를 예방하거나 치료하는데 적합하다.

[0018]

본 발명의 펩티드는 직접적으로 또는 상동관계에 따라 단백질 알레르기 항원 Bet v2 (SEQ ID NOS: 71 내지 76), Bet v1 (SEQ ID NOS: 1 내지 34 와 45 내지 70), Bet v3 (SEQ ID NOS: 35, 36 과 77), Bet v4 (SEQ ID NOS: 37 내지 39, 78과 79), Bet v6 (SEQ ID NOS: 40 내지 43 과 80) 그리고 Bet v7 (SEQ ID NO: 44)으로부터 파생 된다. 용어 "펩티드" 와 "폴리펩티드" 는 여기에서 교환되어 쓰일 수 있다. 상기 단백질은 또한 여기에서 "알 레르기 항원"으로서 언급된다. 표 1~7은 각각의 단백질이 파생된 모체 단백질을 나타내면서 본 발명의 펩티드 염기서열(SEQ ID NOS:1 내지 80)을 정리한 것이다. 본 발명의 조성물은 SEQ ID NOS:1 내지 80 또는 그의 변종으로 부터 선택된, 적어도 하나의 폴리펩티드를 구성한다.

[0019]

즉, 본 발명은 SEQ ID NOS:1 내지 80 또는 그의 변종에서 선택된 적어도 3개, 가급적이면 4개의 각기 다른 폴리 펩티드를 구성하는 면역관용을 유도함으로써 자작나무 알레르기의 예방 또는 치료에 쓰이는 조성물을 제공한다. 선택된 폴리펩티드가 SEQ ID NOS:1 내지 80중 하나에 의해 정의된 동일한 본래의 염기서열의 변종이 되지 않는 것이 선호된다. 즉, 3개 또는 4개의 폴리펩티드 각각은 SEQ ID NOS:1 내지 80 중 하나에 의해 정의되는 각기 다른 본래의 기준치 염기서열이거나 SEQ ID NOS:1 내지 80중 하나에 의해 정의되는 각기 다른 본래의 기준치 염기서열의 변종이다.

[0020]

가급적이면, 조성물은 하나 이상의 알레르기 항원으로부터 파생된 폴리펩티드를 구성할 것이다. 예를 들어 조성 물은 Bet v2로부터 파생된 1개 이상의 폴리펩티드나 그의 변종과, Bet v1으로부터 파생된 1개 이상의 폴리펩티

드나 그의 변종을 구성한다. Bet v3, Bet v4, Bet v6, Bet v7 으로부터 파생된 추가의 폴리펩티드가 선택적으로 포함될 수 있다. 따라서, 일부 실시예들에서 조성물은 다음을 구성한다.

- [0021] i) (Bet v2에서 파생된)폴리펩티드 SEQ ID NO:74,72,71,73,75,76 중 적어도 1개 또는 여기에서 정의한 대로 그의 변종; 그리고
- [0022] ii) (Bet v1에서 파생된)폴리펩티드 SEQ ID NO:1내지34 와 45내지70 중 적어도 1개 또는 그의 변종; 선택적으로
- [0023] iii) 적어도 다음의 폴리펩티드들 중 1개:
- [0024] (a)(Bet v3에서 파생된)폴리펩티드 SEQ ID NOs:35,36과 77, 또는 여기에서 정의한 대로 그의 변종; 그리고/또는
- [0025] (b)(Bet v4에서 파생된)폴리펩티드 SEQ ID NOs:37 내지 39, 78과 79, 또는 여기에서 정의한 대로 그의 변종; 그리고/또는
- [0026] (c)(Bet v6에서 파생된)폴리펩티드 SEQ ID NOs:40내지 43과 80, 또는 여기에서 정의한 대로 그의 변종; 그리고/또는
- [0027] (d)(Bet v7에서 파생된)폴리펩티드 SEQ ID NO:44, 또는 여기에서 정의한 대로 그의 변종.

[0028] 이와 같이 조성물은 그룹 (i)에서 선택된 1개 이상의 폴리펩티드, 그룹 (ii)에서 선택된 1개 이상의 폴리펩티드 그리고 위에 정의한 대로 그룹 (iii)(a)내지(d)으로부터 선택적으로 1개 이상의 폴리펩티드의 조합을 구성한다. 그룹 (i), (ii), 그리고 (iii) (a)~(d)는 위에 묘사한 대로 각기 다른 Bet 알레르기항원으로부터 파생된 웹티드에 상응한다. 각기 다른 Bet 알레르기항원으로부터 파생된 폴리펩티드들을 결합하는 것은 하나 이상의 자작나무 꽃가루 알레르기항원으로부터 면역관용을 유도하는 항원결정부위를 제공함으로써 일반적인 인구에서 관찰되는 자작나무 꽃가루 알레르기의 넓은 범위를 감안할 수 있다.

- [0029] 상기 정의한 대로 선택된 조성물의 비 제한 예들은 포함한다:
- [0030] SEQ ID NO:74,72,71,73,76 또는 그의 변종으로부터 선택된 1개, 2개, 또는 그 이상의 폴리펩티드, 그룹(ii)에서 선택된 적어도 1개의 폴리펩티드 또는 그의 변종, 선택적으로 (iii)(a)와/또는 (b)에서 선택된 적어도 1개의 폴리펩티드 또는 그의 변종; 또는
- [0031] SEQ ID NO:74,72,71,73,75,76 또는 그의 변종으로부터 선택된 1개, 2개 또는 그이상의 폴리펩티드와 그룹(ii) 또는 그의 변종에서 선택된 2개, 3개, 4개 또는 5개 폴리펩티드, 그리고 선택적으로 그룹(iii)(a)와/또는(b)에서 선택된 적어도 1개의 폴리펩티드 또는 그의 변종; 또는
- [0032] SEQ ID NO:74,72,71,73,75,76 또는 그의 변종으로부터 선택된 1개, 2개 또는 그 이상의 폴리펩티드와 그룹(ii) 또는 그의 변종으로부터 선택된 2개, 3개, 4개, 또는 5개의 폴리펩티드, 그리고 그룹(iii)(b)에서 선택된 적어도 1개의 폴리펩티드.
- [0033] 본 실시예에서 조성물은 하기를 포함한다:
- [0034] i)폴리펩티드 SEQ ID NO: 74 (BIR12B;AKYMVIQGEPGRVIRGK), SEQ ID NO: 72 (BIR11; FPQFKPQEITGIMK), SEQ ID NO: 71 (BIR10; GSVWAQSSSFQFK), SEQ ID NO: 73 (BIR12A;PTGMFVAGAKYMIQGR), SEQ ID NO: 75 (BIR13;IKYMVIQGEAGAVIRGK), SEQ ID NO: 76 (BIR14;EAGAVIRGKKGSGGIT)중에서 적어도 1개 또는 그의 변종, 그리고
- [0035] ii)폴리펩티드 SEQ ID NO: 53 (Bir02J;PAARMFKAFILEGDKLVPK), SEQ ID NO: 48 (Bir01I;FNYETETTSVIPAARK),SEQ ID NO: 54 (Bir04;PGTIKKISFPEGFPFKYV), SEQ ID NO: 67 (Bir09;ETLLRAVESYLLAHSDAY), SEQ ID NO: 60 (BIR07;SNEIKIVATPDGGSILK), SEQ ID NO: 63 (Bir07C;SNEIKIVATPEGGSILK)중에서 적어도 1개 또는 그의 변종,
- [0036] 또 다른 실시예에서, 조성물은 위에 선택되지 않은, 적어도 1개의 추가적인 폴리펩티드(i) 또는(ii) 또는 그의 변종을 더 포함한다. 또 다른 실시예에서, 조성물은 SEQ ID NO:77(BIR15;SLNTLRLRRIFDLFDK) 또는 SEQ ID NO:78(BIR16A; AERERIFKRFDANGEGK)중에서 적어도 1개의 폴리펩티드 또는 그의 변종을 더 포함한다. 바람직하기로는 본 실시예에서, 조성물은 하기를 포함한다.
- [0037] (a)폴리펩티드 Bir12B(AKYMVIQGEPGRVIRGK), 또는 그의 변종;

- [0038] (b) 폴리펩티드 Bir02J(PAARMFKAFILEGDKLVPK), 또는 그의 변종; 그리고
- [0039] (c) 폴리펩티드 Bir01I(FNYETETTSVIPAARK) 또는 그의 변종;
- [0040] 특히 더욱 바람직한 실시예로서 조성물은 폴리펩티드 Bir12B (AKYMIQGEPEGRVIRGK) 또는 그의 변종, 폴리펩티드 Bir02J(PAARMFKAFILEGDKLVPK) 또는 그의 변종, 폴리펩티드 Bir01I(FNYETETTSVIPAARK) 또는 그의 변종, 폴리펩티드 Bir04(PGTIKKISFPEGFPFKYV) 또는 그의 변종, 폴리펩티드 Bir09 (ETLLRAVESYLLAHSDAY) 또는 그의 변종, 폴리펩티드 Bir07C(SNEIKIVATPEGGSILK) 또는 그의 변종, 폴리펩티드 Bir16A(AERERIFKRFDANGEKGK) 또는 그의 변종을 포함한다. 그리고 선택적으로 추가되는 폴리펩티드는 없다.
- [0041]
- [0042] 특히 더욱 바람직한 실시예로서 조성물은 폴리펩티드 Bir12B (AKYMIQGEPEGRVIRGK) 또는 그의 변종, 폴리펩티드 Bir02J(PAARMFKAFILEGDKLVPK) 또는 그의 변종, 폴리펩티드 Bir01I(FNYETETTSVIPAARK) 또는 그의 변종, 폴리펩티드 Bir04(PGTIKKISFPEGFPFKYV) 또는 그의 변종, 폴리펩티드 Bir07C
- [0043] (SNEIKIVATPEGGSILK) 또는 그의 변종, 폴리펩티드 Bir16A(AERERIFKRFDANGEKGK) 또는 그의 변종, 폴리펩티드 Bir09B(KEMGETLLRAVESYLLAHS) 또는 그의 변종을 포함한다. 그리고 선택적으로 추가되는 폴리펩티드는 없다.
- [0044]
- [0045] 특히 더욱 바람직한 실시예로서 조성물은 폴리펩티드 Bir12B (AKYMIQGEPEGRVIRGK) 또는 그의 변종, 폴리펩티드 Bir02J(PAARMFKAFILEGDKLVPK) 또는 그의 변종, 폴리펩티드 Bir01I(FNYETETTSVIPAARK) 또는 그의 변종, 폴리펩티드 Bir04(PGTIKKISFPEGFPFKYV) 또는 그의 변종, 폴리펩티드 Bir07C
- [0046] (SNEIKIVATPEGGSILK) 또는 그의 변종, 폴리펩티드 Bir16A(AERERIFKRFDANGEKGK) 또는 그의 변종을 포함한다. 그리고 선택적으로 추가되는 폴리펩티드는 없다.
- [0047]
- [0048] 본 발명은 또한 펩티드, 변종, 본 발명에 따른 조성물을 포함하는 산물을 제공한다. 본 발명이 제공하는 산물은 하기를 포함한다.
- [0049] i) 폴리펩티드 SEQ ID NO:74(BIR12B;AKYMIQGEPEGRVIRGK), SEQ ID NO:72(BIR11; FPQFKPQEITGIMK), SEQ ID NO:71(BIR10;GSVWAQSSSFQPK), SEQ ID NO:73(BIR12A;
- [0050] PTGMFVAGAKYMIQGR), SEQ ID NO:75(BIR13; IKYMIQGEAGAVIRGK) 그리고 SEQ ID NO:76 (BIR14;EAGAVIRGKKGSGGIT) 중에서 적어도 1개 또는 (I)내지(III)에 정의한 대로 그의 변종, 그리고
- [0051] ii) 폴리펩티드 SEQ ID NO:53(Bir02J;PAARMFKAFILEGDKLVPK), SEQ ID NO:48(Bir01I; FNYETETTSVIPAARK), SEQ ID NO:54(Bir04;PGTIKKISFPEGFPFKYV), SEQ ID NO:67 (Bir09;ETLLRAVESYLLAHSDAY), SEQ ID NO:60(BIR07;SNEIKIVATPDGGSILK), 그리고
- [0052] SEQ ID NO:63(Bir07C;SNEIKIVATPEGGSILK)중에서 적어도 1개 또는 (I)내지(III)에 정의한 대로 그의 변종, 여기에서 각기 다른 폴리펩티드는 면역관용을 유도함으로써 자작나무 꽃가루 알레르기를 예방 및 치료하는데 있어서 동시적이고, 독립적이고 또는 연속적인 용도로 사용된다.
- [0053]
- [0054] 폴리펩티드 SEQ ID NOS:1내지 80의 변종이 여기에 언급된다. SEQ ID NOS:1내지 80중에서 하나의 변종은 일반적으로 기능할 것이다. 변종이 기능적이라는 것은:
- [0055] (a) SEQ ID NOS:1내지 80의 상응하는 폴리펩티드로서 동일한 주 조직적합 복합체 클래스 II 분자에 결합하는 염기서열을 포함하거나 구성한다; 그리고/또는
- [0056] (b) SEQ ID NOS:1내지 80의 상응하는 폴리펩티드를 인지하는 T세포에 의해 인지되는 염기서열을 포함하거나 구성한다; 그리고/또는
- [0057] (c) 자작나무 알레르기에 걸린 개인의 후기 반응을 유도할 수 있다; 그리고/또는
- [0058] (d) 개인에게 상응하는 폴리펩티드에 대해 면역관용을 유도할 수 있다.
- [0059]

- [0060] T 세포에 의한 인지는 T 세포샘플에서 T 세포의 확산을 유도하는 웨티드나 변종의 능력을 측정함으로써 테스트된다. 후기 반응의 유도는 T세포샘플이 자작나무 알레르기에 걸린 개인으로부터 채취할 때 또한 테스트된다. T 세포확산의 유도를 테스트하는 방법은 기술적으로 잘 알려져 있고 그 방법 중 하나가 실시예 8에서 전형적으로 보여준다.
- [0061] SEQ ID NOS:1-80의 변종은 절단에 의해, 예를 들어 폴리펩티드의 N이나 C말단으로부터 1개 이상의 아미노산을 제거함으로써 파생된 조각들이다. 또한 조각들은 T세포 항원결정부위를 형성하는 주요한 아미노산 9개가 실질적으로 방해되지 않는다면 1개 이상의 내부 결실에 의해 발생되기도 한다.
- [0062] 예를 들어 SEQ ID NO:1의 변종은 SEQ ID NO:1의 조각(fragment), 즉 짧은 염기서열을 구성한다. 이는 SEQ ID NO:1의 N말단 끝에서 또는 C말단 끝에서 1개, 2개, 3개 또는 4개 아미노산의 결실을 포함한다. 이런 결실은 SEQ ID NO:1 양쪽 끝에서 만들어진다.
- [0063] SEQ ID NO:1의 변종은 SEQ ID NO:1말단 너머를 확장하는 추가의 아미노산을 (예를 들어 웨티드가 파생된 모체 단백질의 염기서열로부터) 포함한다. 폴리펩티드 변종은 일반적으로 SEQ ID NO:1-80의 상응하는 폴리펩티드의 염기서열을 구성하는 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30개 아미노산까지의 긴 폴리펩티드이다.
- [0064] 변종은 위에서 논의된 결실과 첨가의 결합을 포함한다. 예를 들어, 아미노산은 SEQ ID NO:1의 한쪽 끝에서 제거되지만, 총 모체 단백질 염기서열의 추가 아미노산은 SEQ ID NO:1의 다른 쪽 끝에 첨가된다. 위의 변종에 대한 동일한 논의는 SEQ ID NOS:2-80에도 또한 적용된다.
- [0065] 그렇지 않으면 변종은 SEQ ID NOS:1-80의 상응하는 폴리펩티드의 염기서열에 적어도 65% 염기일치를 가지는 염기서열로 이뤄진 9-30개, 11-20개 또는 13-17개 아미노산의 폴리펩티드이다. 더욱 바람직하게는 적합한 변종은 SEQ ID NO: 1-80의 상응하는 폴리펩티드에 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90% 또는 적어도 98% 아미노산 일치를 포함한다. 변종은 SEQ ID NO: 1-80의 상응하는 폴리펩티드의 염기서열의 적어도 9 개(예를 들어 적어도 10, 11, 12 또는 13) 또는 더 인접한 아미노산에 적어도 65% 염기가 일치하거나 일부로 포함된 염기서열로 이뤄진 9-30개, 11-20개, 13-17개 아미노산 길이의 폴리펩티드이다. 이런 인접한 아미노산은 일반적으로 MHC class II 항원결정부위를 구성하는데, 예를 들어 상기 언급된 주 조직적합 복합체(MHC)분자에 결합한다.
- [0066] 변종 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 1-80 또는 그것의 조각의 아미노산 염기서열로부터 1개 이상의 치환을 포함한다. 변종 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 1-80에서 적어도 9개 또는 더 인접한 아미노산에 적어도 65%의 염기일치성을 가지는 염기서열로 구성될 수 있다. 더욱 가급적이면, 적합한 변종은 SEQ ID NO: 1-80의 적어도 9개 인접한 아미노산에 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 98% 아미노산 일치를 포함한다. 아미노산 일치의 이 레벨은 주요한 부분이 더 선호되기는 하지만 웨티드의 어느 구획에서든지 볼 수 있다. 아미노산 일치 레벨은 적어도 9개의 인접한 아미노산을 넘어서지만 웨티드들의 크기비교에 의존하면서 적어도 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17개의 아미노산이 될 수 있다. 그러므로 상기 특이적인 일치성의 레벨은 전체의 염기서열 전체에 걸칠 수도 있다.
- [0067] 아미노산 염기서열과 관련하여, "염기서열일치성"은 하기의 파라미터로 크리스탈더블유 (ClustalW;Thompson et al., 1994, supra)을 이용하여 평가할 때의 표시된 값을 가지는 염기서열을 나타낸다:
- [0068] 페어와이즈 얼라인먼트 파라미터(Pairwise alignment parameters)-메소드(Method) :액큐레이트(accrurate), 매트릭스(Matrix):피에이엠(PAM), 갭 오픈 패널티(Gap open penalty):10.00, 갭 익스텐션 패널티(Gap extension penalty):0.10; 멀티플 얼라인먼트 파라미터(Multiple alignment parameters)-매트릭스(Matrix):피에이엠 (PAM), 갭 오픈 패널티(Gap open penalty):10.00, % 아이덴티티 포 딜레이(% identity for delay):30, 패널라이즈 엔드 갭(Penalize end gaps):온, 갭 새퍼레이션 디스턴스(Gap separation distance):0, 네거티브 매트릭스(Negative matrix):노(no), 갭 익스텐션 패널티(Gap extension penalty):0.20, 레시듀-스페시픽 갭 패널티 (Residue-specific gap panalties):온(on), 하이드로필릭 갭 패널티(Hydrophilic gap penalties): 온(on), 하이드로필릭 레시듀(Hydrophilic residues):GPSNDQEKR.

[0069] 특정 잔기에서 염기서열 일치성은 간단히 파생물 형성에 의해 변형되었던 동일한 잔기를 포함하려는 것이다.

[0070] 변종 펩티드는 SEQ ID NO: 1-80중에서 1, 2, 3, 4, 5 또는 그이상 또는 10개 까지의 아미노산의 치환을 구성할 수 있다. 치환변종은 가급적이면 같은 수의 아미노산과 보존적 아미노산 치환을 만들면서 1개 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 예를 들어 아미노산은 유사한 특성을 가진 대체의 아미노산으로 치환될 수 있는데 예를 들면 또 다른 염기성 아미노산, 또 다른 산성 아미노산, 또 다른 중성 아미노산, 또 다른 전하를 띤 아미노산, 또 다른 친수성의 아미노산, 또 다른 소수성의 아미노산, 또 다른 극성 아미노산, 또 다른 방향족 아미노산, 또는 또 다른 지방족 아미노산이다. 적합한 치환물을 선택하기 위하여 사용될 수 있는 20개 주요 아미노산의 특성 몇 가지는 하기와 같다:

알라닌	지방족, 소수성, 중성	메티오닌	소수성, 중성
시스테인	극성, 소수성, 중성	아스파라긴	극성, 친수성, 중성
아스파르산	극성, 친수성, 음전하	프롤린	소수성, 중성
글루탐산	극성, 친수성, 음전하	글루타민	극성, 친수성, 중성
페닐알라닌	방향족, 소수성, 중성	아르기닌	극성, 친수성, 양전하
글리신	지방족, 중성	세린	극성, 친수성, 중성
히스티딘	방향족, 극성, 친수성, 양전하	트레오닌	극성, 친수성, 중성
이소루신	지방족, 소수성, 중성	발린	지방족, 소수성, 중성
리신	극성, 친수성, 양전하	트립토판	방향족, 소수성, 중성
루신	지방족, 소수성, 중성	티로신	방향족, 극성 소수성

[0071]

[0072] 계다가 변종은 중성적으로 존재하는 아미노산 대신에, 서열 속에 있는 구조적인 유사체 아미노산을 포함한다. 또한 염기서열에서 이용되는 아미노산은 펩티드의 기능에 크게 악영향을 주지 않는다면 예를 들어 표를 붙이는 방법으로 변형된다. SEQ ID NOS:1-80의 염기서열 또는 그것의 일부 조각과는 다른 염기서열을 가진 펩티드의 경우에는 치환은 SEQ ID NOS: 1-80 염기서열 내부 또는 SEQ ID NOS: 1-80의 외부 등 염기서열 전체에 걸쳐서 일어난다. 예를 들어 여기에 명시된 추가, 결실, 치환, 변형같은 변화는 SEQ ID NOS:1-80 염기서열 내부에서 일어난다. 변종 펩티드는 1, 2, 3, 4개 또는 그이상의 아미노산 치환이 일어났던 SEQ ID NOS:1-80 염기서열의 아미노산을 필수적으로 포함할 수 있다. 변종 펩티드는 SEQ ID NOS: 1-80보다 큰 모체 단백질의 일부 조각을 포함할 수 있다. 이 실시예에서 치환과 변형같이 여기에 명시한 변화는 SEQ ID NOS:1-80 염기서열 내부 그리고/또는 외부에서 일어난다. 예를 들어 1개 또는 그 이상의 양전하를 띠는 잔여물은 SEQ ID NOS:1-80 펩티드의 자연상태의 염기서열의 N 그리고/또는 C말단에서 첨가될 수 있다.

[0073] 본 발명의 변종 펩티드는 9-30개 아미노산이다. 가급적이면 9-20개 또는 더욱 가급적이면 13-17개 아미노산이다. 펩티드는 SEQ ID NOS:1-80 중 한 개의 펩티드 염기서열과 동일한 길이이다.

[0074] 펩티드는 화학적으로 예를 들어 단백질 가수분해의 절단에 의해 폴리펩티드 알레르기항원으로부터 파생된다. 또는 폴리펩티드 알레르기항원의 아미노산 염기서열을 사용하고 염기서열에 근거하여 펩티드를 합성하는 등 지적 의미에서 폴리펩티드 알레르기항원으로부터 파생될 수 있다. 펩티드들은 본 발명이 속한 기술분야에서 잘 알려진 방법을 이용해 합성된다.

[0075] “펩티드”라는 용어는 아미노산 잔기가 펩티드 결합에 의해 연결된 분자들 뿐만 아니라 펩티드 결합이 역으로 일어나는 분자들도 포함한다. 이런 레트로-인버스 펩티도미메틱스(retro-inverso peptidomimetics)는 예를 들어 Meziere et al(1997) J. Immunol. 159, 3230-3237에서 설명된 것 같이 본 발명이 속한 기술분야에서 잘 알려진 방법을 이용하여 만들어진다. 이 시도는 골격(backbone)과 관련된 변화를 포함하지만 결사슬(side chains)의 방향은 포함하지 않는 슈도펩티드 (pseudopeptides)를 만드는 것을 포함한다. Meziere et al(1997)은 적어도 한 주 조직적합 복합체(MHC) 클래스 II와 보조 T (T helper)세포의 반응에 한해서 이 슈도펩티드(pseudopeptides)가 유용하다는 것을 보여주었다. CO-NH 펩티드 결합 대신에 NH-CO결합을 포함한 레트로-인버스 펩티드는 단백질 가수분해에 더욱 강하다.

[0076] 유사하게도, 펩티드 결합은 아미노산 잔기의 탄소원자들 사이에 간격을 유지하는 적절한 링커 성분이 사용된다면 모두 없어진다. 특히 링커 성분이 펩티드결합으로서 대체로 같은 전하의 분배와 대체로 같은 평면성을 가지고 있다면 선호된다. 또한 펩티드는 외부단백질 가수분해 절단에 대한 민감성을 줄이기 위해 편리하게 N 또는 C

말단이 막히는 것이 이해될 것이다. 예를 들어 펩티드의 N말단 아미노그룹(amino group)은 카복시산(carboxylic acid)에 반응함으로써 보호되고, 펩티드의 C말단 카복시그룹(carboxyl group)은 아민(amine)에 반응함으로써 보호된다. 변형의 다른 예는 글리코실화와 인산화이다. 또 다른 가능성 있는 변형은 아르기닌(arginine,R)이나 리신(lysine,K)의 결사를 아민의 수소가 메틸렌 그룹(methylene group)으로 대체되는 것이다. (-NH₂ → NH(Me) 또는 N(Me)₂)

[0077] 또한 본 발명에 따라 펩티드 유사체는 인비보(in vivo)에서 펩티드의 반감기를 증가시키거나 감소시키는 펩티드 변종을 포함한다. 본 발명에 따라 사용된 펩티드의 반감기를 증가시킬 수 있는 유사체의 예는 펩티드의 펩토이드 유사체, 펩티드의 D-아미노산 파생물, 그리고 펩티드-펩토이드 혼성체(peptide-peptoid hybrid)를 포함한다. 본 발명에 따라 사용된 변종 펩티드의 추가의 실시에는 펩티드의 D-아미노산 형태를 구성한다. L-아미노산보다는 D-아미노산을 이용한 펩티드 준비가 관리의 빈도에 따라 관리될 필요가 있는 물질의 양을 감소시키면서 정상적인 대사과정에 의한 물질의 원치 않는 분해를 대단히 감소시킨다.

[0078] 본 발명에 의해 제공된 펩티드는 모체 단백질 사슬을 암호화한 1차 전사체(primary transcript)의 대체적 스플라이싱(alternative splicing)을 통해 발생한 메신저RNA(messengerRNA,mRNA)에 의해 암호화되는 모체 단백질의 스플라이스 변종으로부터 파생된 것이다. 펩티드는 또한 아미노산 돌연변이, 글리코실화된 변종과 알레르기항원의 적어도 MHC결합특성을 보유한 모체 단백질의 다른 전자쌍을 공유하는 파생물로부터 파생될 수 있다. 모범적인 파생물이 포함하는 분자들은 본 발명의 펩티드가 치환에 의해 또는 화학적, 효소적 또는 다른 적합한 방법에 의해 자연적으로 발생한 아미노산 이외의 성분으로 수정되는 분자들이다. 추가로 포함된 것은 각각 다른 진드기에서 발견된 모체 단백질의 자연변종이다. 이런 자연변종은 대립변종에 의해 암호화되거나 대체적인 스플라이싱 변종을 대표한다.

[0079] 상기 명시된 변종은 펩티드 합성 중에 또는 생산 후 변형, 또는 펩티드가 이 발명이 속한 분야에 잘 알려진 기법인 부위 특이적 돌연변이 유도기법, 임의돌연변이 유발기법, 효소적 절단 그리고/또는 핵산의 연장 등을 이용하여 재조합 될 때 준비된다.

[0080] 본 발명의 실시예에서, 여기 명시된 대로 일반적인 변종의 예는 하기와 같다:

[0081] - Bir01I의 변종은 Bir01F(FNYETEATSVIPAARK), Bir01G(FNYEIEATSVIPAARK) 또는 Bir01H(FNYEIETTSVIPAARK); 그리고/또는

[0082] - Bir02J의 변종은 Bir02E(PAARLFKAFILEGDTLIPK), Bir02G(PAARLFKAFILEGDNLIPK), Bir02I(PAARMFKAFILD) 또는 Bir02D(PAARMFKAFILDGDKLVPK); 그리고/또는

[0083] - Bir09의 변종은 Bir09A(GETLLRAVESYLLAHS), Bir09B(KEMGETLLRAVESYLLAHS) 또는 Bir09C(KEKGETLLRAVESYLLAHS); 그리고/또는

[0084] - Bir16B의 변종은 Bir16A(AERER1FKRFDANGEGK).

[0085]

[0086] SEQ ID NOS:1-80가 일반적으로 9개 아미노산의 핵심을 구성하는 T세포 항원결정부위를 포함하는 폴리펩티드 염기서열이고 이것이 주 조직적합 복합체(MHC) 클래스 II 결합에 필요한 최소의 필수적인 염기서열이라는 것을 이해하게 될 것이다. 그러나 SEQ ID NOS: 1-80는 또한 핵심부위 주변에 있는 추가 잔기도 포함할 수 있다. 그러므로 펩티드는 T세포 항원결정부위가 들어있는 지역을 포함하고 몇몇 잔기는 항원결정부위 기능에 영향을 끼치지 않고 수정될 수 있다. 더구나 예를 들면 SEQ ID NOS:1-80의 염기서열은 그것의 가용성이 향상되는 변화가 생길 수 있고 그 결과 SEQ ID NOS:1-80의 변종은 동일한 조건의 SEQ ID NOS:1-80의 상응하는 폴리펩티드보다 오히려 더욱 가용적일 수 있다. 펩티드의 가용성을 평가하기 위한 방법은 본 발명이 속한 기술 분야에서 잘 알려져 있고, 이 방법은 실시예 9에서 전형적으로 보여준다.

[0087] 향상된 가용성은 본 발명의 펩티드가 파생된 알레르기항원에 대한 피험자의 면역관용 유도에 이롭다. 가용성이 저조한 물질에 대한 투여는 바람직하지 않고 면역관용이 없는 염증반응을 불러 일으키기 때문이다. 펩티드의 용해도는 T세포 항원결정부위가 들어있는 부위 근처의 잔기를 변경함으로써 개선할 수 있다. 본 발명의 펩티드는 더욱 용해될 수 있도록 설계할 수 있으며 하기를 포함한다:

[0088] i)T 세포 항원결정부위 주변에 있는 펩티드 잔기쪽으로 N말단을: N말단 1?6개의 근접한 아미노산에 즉각 상응하는 1?6개의 근접한 아미노산이 펩티드가 파생한 단백질 배열의 상기 잔기쪽으로, 및/또는

- [0089] ii) T 세포 항원결정부위 주변에 있는 펩티드 잔기쪽으로 C말단을: C말단 1?6개의 근접한 아미노산에 즉각 상응하는 1?6개의 근접한 아미노산이 펩티드가 파생한 단백질 배열의 상기 잔기쪽으로, 및/또는
- [0090] iii) T세포 항원결정부위 주변에 있는 펩티드 잔기의 N말단과 C말단을: 아르기닌, 리신, 히스티딘, 글루탐산, 아스파르트산 중에서 선택된 적어도 1개의 아미노산을.
- [0091] 선택적으로, 펩티드는 추가적으로 하기와 같이 더 가용적으로 설계될 수 있다:
- [0092] i)펩티드의 음성 염기서열의 시스테인 잔기가 세린이나 2-아미노뷰티르산 (2-aminobutyric acid)으로 대체된다; 및/또는
- [0093] ii)T세포 항원결정부위를 구성하지 않는 펩티드의 N말단이나 C말단의 3개 아미노산의 소수성 잔기가 삭제된다; 및/또는
- [0094] iii)T세포 항원결정부위를 구성하지 않는 펩티드의 N말단이나 C말단의 4개 아미노산의 아르파르트산-글리신 염기서열을 구성하는 연속적인 2개의 아미노산이 삭제된다; 및/또는
- [0095] iv)하나 이상의 양성 전하를 띤 잔기가 펩티드의 N말단이나 C말단에 첨가된다.
- [0096] 가급적이면 본 발명의 펩티드와 변종은 T세포 증식을 적어도 20%의 T세포샘플에서 유발시킬 수 있는데, 각각의 샘플은 다양한 자작나무 알레르기 개체로부터 얻었다. 본 발명의 조성물은 가급적이면 30% 또는 그 이상의 세포증식을, 자작나무 알레르기에 걸린 개인의 패널로부터 얻은 T세포샘플에서 유발할 수 있다. 더욱 가급적이면, 조성물은 민감화된 개인의 패널로부터 얻은 샘플의 35% 또는 그 이상, 40% 또는 그 이상, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 그 이상의 세포증식을 유발할 수 있다. 자작나무 알레르기에 걸린 개인들의 패널에서 개인들의 수는 보다 큰 임의의 수, 예를 들어 적어도 2, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 50, 80 또는 적어도 100개이다.
- [0097] 본 발명의 펩티드, 변종과 조성물이 T세포증식을 유발하되 민감화된 개인으로부터 강화된 호염구 또는 비만세포증식에서 히스타민 방출을 이끌지 않는다면 그것은 선호된다. 약간의 히스타민 방출이 있을 수 있으나, 가급적이면 펩티드, 변종과 조성물은 유효한 양만큼의 히스타민이 방출되게 유발하지 않는다. 유효한 히스타민 방출은 개인의 백혈구 샘플이 인비트로(*in vitro*)에서 조성물에 의해 자극될 때 전체 유효한 백혈구 히스타민의 20% 또는 그 이상을 방출한다고 고려된다. 본 발명의 펩티드, 변종 또는 조성물은 개체의 백혈구 샘플이 인비트로(*in vitro*)에서 조성물에 의해 자극될 때 오히려 전체 유효한 백혈구 히스타민의 5% 미만, 4%미만, 3%미만, 2%미만 또는 1%미만의 방출을 유발한다. 정상인은 일반적으로 150나노그램/ 10^7 세포의 백혈구 히스타민을 함유한다.
- [0098] TCRs에 결합할 수 있는 적합한 펩티드 또는 변종은 경험적으로 얻거나, 알려진 기준에 따라 선택된다. 단일 펩티드 내부에 MHC항원 결합 홈에 결합하는데 공헌하는 어떤 잔기가 있거나 T세포 수용체의 초가변영역과 상호작용하는 다른 잔기가 있다(Allen et al(1987)Nature 327:713-5).
- [0099] T세포 수용체 상호작용에 공헌하는 잔기내부에 T세포 활성의 정해진 펩티드 잔기의 치환에 대한 의존도와 관련된 체계가 있는 것이 증명되었다. 다른 아미노산과 치환된 하나 또는 그 이상의 T세포 수용체 접촉 잔기를 가지는 펩티드를 이용함으로써 여러 그룹들이 T세포 활성의 과정에 대한 깊은 효과를 증명했다. Evavold & Allen은 (1991, Nature 252:1308-10) T세포 증식과 사이토카인 생산의 해리를 증명했다. 인비트로(*In vitro*)모델에서 헤모글로빈(I-E^k의 맥락에서)의 64-76 잔기에 특이적인 T세포 클론은 아스파르트산이나 글루탐산의 보존적인 치환이 일어나는 펩티드 유사체에 의해 검사받았다. 이 치환은 I-E^k에 결합하는 유사체의 능력을 그다지 방해하지 않는다.
- [0100] 하기 이 유사체의 T세포클론의 인비보(*in vivo*) 검사에서 B 세포 반응을 돋기 위한 클론의 능력과 마찬가지로 인터루킨 4(IL-4)구역이 유지됨에도 불구하고 증식은 발견되지 않았다. 그 다음의 연구에서 같은 그룹이 사이토카인 생산으로부터 T세포 매개 세포용해의 분리를 증명했다. 이 경우에서 후자가 악화되는 반면에 전자는 바뀌지 않은 채로 유지되었다. 인비보(*In vivo*)에서 바뀐 펩티드 리간드의 효과는 처음에 McDevitt과 동료들(Smiliek et al(1991)Proc Natl Acad Sci USA 88:9633-9637)에 의해 실험상의 알레르기에 걸린 뇌척수염(EAE:experimental allergic encephalomyelitis)의 쥐 모델에서 증명되었다. 이 모델에서 EAE는 수초염기성단백질(MBP:myelin base protein)의 뇌염 유발성 펩티드 Acl-11에 관련된 면역력에 의해 유도되었다. 4번 위치(리신)에서 알라닌 잔기로의 치환은 제한시키는 요소($A\alpha^uA\beta^u$)에 잘 결합했던 펩티드를 발생시켰지만, 이것은 민감한 PL/JxSJF1계통에서는 면역유전성이 없었고, 뿐만 아니라 뇌염 유발성 펩티드에 대한 면역효과 전이나 후에

투여할 때 EAE의 시작을 방지했다.

[0101] 유익하게도, 웨პ티드는 T세포증식과 탈감각화 유도에 알맞도록 설계된다. Metzler와 Wraith는 웨პ티드-MHC친화력을 증가시키는 치환이 일어나는 웨პ티드의 면역관용을 유도하는 능력이 향상되는 것을 증명했다 (Metzler & Wraith(1993) Int Immunol?:1159-65). 그 바뀐 웨პ티드 리간드는 Sloan-Lancaster et al(1993)Nature 363:156-9)에서 증명되었던 T세포 클론의 장기간의 깊은 면역성 결여를 야기할 수 있다.

[0102] 본 발명의 조성물은 알레르기항원에 민감해지는 개인의 후기단계반응을 유도할 수 있다. 용어 “후기단계반응”은 Allergy and Allergic Diseases(1997) A.B.Kay(Ed.)Blackwell Science, pp1113-1130)에서 발표된 의미를 포함한다. 후기단계반응은 어떤 후기단계반응(LPR)도 될 수 있다. 가급적이면, 웨პ티드는 후기 천식반응 또는 후기 피부염반응 또는 후기 피부반응 또는 후기 안구반응을 유도할 수 있다. 특정한 웨პ티드가 후기 천식반응(LPR)을 생기게 할 수 있는지 아닌지는 이 분야에서 잘 알려진 방법을 이용해 결정될 수 있다. 특히 선호되는 방법은 Cromwell O, Druham SR, Shaw RJ, Mackay J 그리고 Kay AB 등에 의해 명시되었다. 천식과 알레르기성 피부염에서 비만세포와 호염구로부터 자극실험과 매개체의 측정 (Provocation tests and measurements of mediators from mast cells and basophils in asthma and allergic rhinitis). In:Handbook of Experimental Immunology (4) 챕터 127, 에디터:Weir DM, 블랙웰 사이언티픽 퍼블리케이션, 1986.

[0103] 더구나 특히 본 발명의 개개의 웨პ티드와 변종은 알레르기항원에 민감해진 개체에게서 후기천식반응을 유도할 수 있다. 면역글로불린 E에 특이적 알레르기항원의 측정을 위해 개체가 알레르기항원에 민감해졌는지 아닌지를 알레르기항원 추출물 용액으로 하는 피부 찌르기 실험, 피부의 후기천식반응, 과거병력, 알레르기항원 검사 그리고 방사면역법(radioallergosorbent test;RAST)같은 잘 알려진 과정에 의해 결정된다. 특정한 개인이 치료로부터 이익을 얻을 것이라고 기대되는지 아닌지는 물리학자 기반의 예를 들어 그런 실험을 통해 결정된다.

[0104] 알레르기항원에 대해 개인을 탈감각화 또는 면역관용을 유도하는 것은 민감해진 개체들에게 있는 알레르기항원에 의해 적합하게 유도된, 알레르기 조직반응을 방해 또는 약화시키는 것을 의미한다. T세포는 선택적으로 활성화되었고 그 다음에 무반응하게 되는 것을 보여주었다. 더구나 면역결여나 이런 T세포의 제거는 특정 알레르기 항원에 대한 환자의 탈감각화를 이끈다. 탈감각화는 알레르기항원 또는 알레르기항원 파생의 웨პ티드의 두번째 이후의 투여에서 알레르기항원이나 알레르기항원 파생의 웨პ티드에 대한 반응의 감소, 또는 그 반응의 소멸을 나타낸다. 두 번째 투여는 탈감각화가 일어나도록 적절한 시간이 흐른 후에 진행될 수 있다. 이것은 하루에서 몇 주 사이의 기간이 걸린다. 2주의 간격이 선호된다.

[0105] 본 발명의 조성물이 자작나무 알레르기에 걸린 개인에게 후기천식반응(LPR)을 유도할 수 있을지라도 조성물이 환자를 치료하는데 사용될 때 인정되어야 한다. 충분히 낮은 농도의 조성물이 사용되어서 후기천식반응이 일어나는 것을 식별할 수 없지만 반응이 충분히 일어나 부분적으로 T세포를 탈감각화시켜서 다음 투여량이 주어지고 등등. 이런 방법으로 투여량은 점점 늘어나 완전 탈감각화를 줄 수 있으나 환자 중에 간혹 후기천식반응이 유도되지 않는 경우도 있다. 그럴지라도 조성물이나 웨პ티드는 투여된 것보다 높은 농도에서 작용할 수 있다.

[0106] 본 발명의 조성물은 특히 인구의 자작나무 알레르기 개인들 패널의 50% 또는 그 이상의 후기천식반응을 유도할 수 있다. 더 바람직하게는 조성물은 55% 또는 그 이상, 60% 또는 그 이상, 65% 또는 그 이상, 70% 또는 그 이상, 75% 또는 그 이상, 80% 또는 그 이상, 85% 또는 그 이상, 또는 90% 또는 그 이상의 민감화된 개인패널의 후기천식반응을 유도할 수 있다. 조성물이 패널의 몇 퍼센트에서 후기천식반응을 유도할 수 있는지 없는지가 이 분야에서 잘 알려진 기술에 의해 결정될 수 있다.

핵산과 벡터

[0108] 본 발명의 조성물과 산물을 만드는 개개의 웨პ티드는 직접적으로 투여되거나, 암호화된 염기서열의 발현에 의해 간접적으로 투여된다. 예를 들어 폴리뉴클레오티드는 본 발명의 웨პ티드(위에 명시된 웨პ티드들 중 하나같은)를 암호화하는 것으로 규정되어 있다. 그러므로 본 발명의 웨პ티드는 그것을 암호화 하고 그래서 발현할 수 있는 폴리뉴클레오티드로부터 생산되거나 폴리뉴클레오티드의 형태로 전달된다. 여기에 본 발명의 사용, 전달 또는 투여하기 위한 언급은 그것을 암호화하는 폴리뉴클레오티드로부터 발현을 거쳐 웨პ티드의 간접적인 사용, 전달 또는 투여를 포함하려는 의미이다.

[0109] 따라서, 본 발명은 발현되었을 때 면역관용에 의해 자작나무 알레르기를 방지 또는 치료하는데 쓰기 위한, 본 발명에 따른 조성물의 생산을 야기하는 적어도 하나의 폴리뉴클레오티드 염기서열으로 구성하여 면역관용에 의

해 자작나무에 대한 알레르기를 방지 또는 치료하기 위한 조성물을 제공한다.

[0110] 용어 “핵산분자”와 “폴리뉴클레오티드”는 여기에서 상호교환적으로 사용되고 뉴클레오티드의 여러 길이의 중합형태, 디옥시뉴클레오티드 이거나 리보뉴클레오티드 이거나 그것의 유사체를 나타낸다. 폴리뉴클레오티드의 비 한계 예는 유전자, 유전자 조각, 메신저 RNA(mRNA), cRNA, 재조합 폴리뉴클레오티드, 플라스미드, 백터, 단일DNA, 단일RNA, 핵산 프로브, 그리고 프라이머이다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 단일 또는 정제된 형태로 규정되어 있다. 선택된 폴리펩티드를 “암호화”한 핵산 염기서열은 적합한 조절 염기서열 조건 아래 놓였을 때 인비보에서 폴리펩티드로 전사되고(DNA경우) 번역되는(mRNA경우) 핵산분자이다. 암호염기서열의 경계는 5'말단(N)의 시작코돈과 3'말단(C)의 번역종결코돈에 의해 결정된다. 본 발명의 목적을 위해 핵산 염기서열은 바이러스, 원핵생물의 cDNA, 또는 진핵생물의 mRNA, 바이러스나 원핵생물 DNA또는 RNA의 유전서열을 포함할 수 있으나 제한되지는 않는다. 전사종결서열은 코딩서열의 3'에 위치한다.

[0111] 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 Sambrook et al (1989, Molecular Cloning- 실험 설명서(a laboratory manual);Cold Spring Harbor Press)의 예시에 설명된 것처럼 이 기술분야에서 잘 알려진 방법에 따라 합성될 수 있다.

[0112] 본 발명의 폴리뉴클레오티드 분자는 삽입되는 염기서열에 실시할 수 있게 연결된 조절 염기서열을 포함하는 발현 카세트(expression cassette)의 형태로 제공될 수 있고, 그러므로 목표대상의 인비보에서 본 발명의 웨პ티드 발현을 허용하면서 할 수 있다. 차례대로 이런 발현 카세트들은 전형적으로 핵산면역을 위한 반응물로서 적합하게 사용되는 백터(예를 들어 플라스미드나 재조합 바이러스백터)내부에서 제공된다. 이런 발현카세트는 숙주에 직접적으로 투여될 수 있다. 그 대신에 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 백터는 숙주로 투여된다. 오히려 폴리뉴클레오티드는 유전자 백터를 이용하여 준비 그리고 또는 투여된다. 적합한 백터는 충분한 양의 유전정보를 전달할 수 있고 본 발명의 웨პ티드 발현을 가능하게 하는 모든 백터이다.

[0113] 발현백터는 문자생물학 분야에서 관례대로 구성되고 예를 들어 플라스미드 DNA와 적합한 개시자, 프로모터, 인헨서, 그리고 다른 요소, 예를 들어 필수적인 아데노산중합반응 신호(polyadenylation signal)를 포함하고 그리고 본 발명의 웨პ티드의 발현을 가능하게 하기 위해 정확한 방향으로 배치된다. 다른 적합한 백터는 이 기술분야에서 숙련된 사람들에게 명백하다. 이 점에서 추가 예시에 의해 우리는 Sambrook et al을 참고한다.

[0114] 그러므로 본 발명의 폴리펩티드는 이런 백터를 세포로 전달하고 백터로부터 전사를 가능하게 함으로써 제공된다. 그러므로 본 발명은 또한 본 발명의 다양한 폴리펩티드를 암호화하는 넷 또는 그 이상의 폴리뉴클레오티드 염기서열로 구성되는, 면역관용을 통해서 알레르기 예방 또는 치료를 위한 이용 면에서 백터를 제공한다. 오히려 본 발명의 폴리뉴클레오티드나 백터에서 본 발명에서의 이용을 위해 숙주세포에 의해 암호화된 염기서열의 발현을 제공할 수 있는 조절 염기서열로 실시가능하게 연결되어 있다. 즉, 백터는 발현백터이다.

[0115] “실시가능하게 연결된”은 그렇게 명시된 구성요소들이 그것의 보통기능을 수행하기 위해 어디에서 설정되는지 요소들의 배열을 나타낸다. 그러므로 프로모터 같은 주어진(일정한) 조절 염기서열이 실시가능하게 연결된 핵산 염기서열은 적당한 효소가 존재할 때 그 염기서열의 발현을 가져올 수 있다. 프로모터는 염기서열과 인접해 있을 필요가 없다. 그것의 발현을 지시할 만큼 길기 때문이다. 그러므로 예를 들어 아직 번역되지 않았으나 전사된 염기서열이 프로모터 염기서열과 핵산 염기서열 사이에 끼어들 수 있고, 프로모터 염기서열이 여전히 암호화된 염기서열에 “실시가능하게 연결” 되어 있다고 고려될 수 있다.

[0116] 많은 발현시스템이 이 기술분야에서 설명되었는데, 각각은 일반적으로 유전자 또는 제어염기서열(control sequence)의 발현에 실시가능하게 연결된 흥미있는 뉴클레오티드 염기서열을 구성하는 백터로 이루어져 있다. 이 제어 염기서열은 전사 프로모터 염기서열과 전사 시작과 끝 염기서열을 포함한다. 본 발명의 백터는 예를 들어 플라스미드, 복제원점을 가진 바이러스 또는 파지백터, 선택적으로 상기에 언급한 폴리뉴클레오티드 발현 프로모터와 선택적으로 프로모터의 조절자이다. “플라스미드”는 염색체 외의 유전자 형태의 백터이다. 백터는 하나 또는 그 이상의 선택표지 유전자를 포함하는데 예를 들어 박테리아 플라스미드의 경우 앰피실린 저항 유전자 또는 곰팡이 진균(매개진균)에 대한 저항성 유전자이다. 백터는 인비트로(in vitro)에서 이용되는데 예를 들어 DNA 또는 RNA의 생산을 위해 아니면 숙주세포 예를 들어 포유류의 숙주세포로 유전자 도입하기 위해 이용된다. 백터는 또한 인비보(in vivo)에서 사용되기 위해 예를 들어 폴리펩티드의 인비보 발현이 가능하게 하기 위해 적용된다.

[0117] “프로모터”는 폴리펩티드를 암호화한 폴리뉴클레오티드의 전사를 개시하고 조절하는 뉴클레오티드 염기서열이다. 프로모터는 유도성 프로모터(프로모터에 실시가능하게 연결된 폴리뉴클레오티드 염기서열의 발현

이 분석물질, 공동인자, 조절단백질 등에 의해 유도되는 것), 억제성 프로모터(프로모터에 실시가능하게 연결된 폴리뉴클레오티드 염기서열발현이 분석물질, 공동인자, 조절 단백질 등에 의해 억제되는 것), 구성적인 프로모터를 포함한다. 용어 “프로모터” 또는 “컨트롤 엘리먼트”는 전체길이의 프로모터 지역과 이 지역들의 기능적인 부분(전사 또는 번역을 조절하는)을 포함하는 것으로 되어있다.

[0118] 본 발명에 따라 폴리뉴클레오티드, 발현카세트 또는 벡터는 추가로 신호펩티드 염기서열을 차지한다. 신호펩티드 염기서열은 일반적으로 신호펩티드가 발현될 경우에 프로모터와의 실시가능한 연결부위에 삽입되고 또한 프로모터와의 연결에서 암호화하는 염기서열에 의해 암호화된 폴리펩티드의 분비를 촉진한다.

[0119] 일반적으로 신호펩티드 염기서열은 10~30개 아미노산, 예를 들어 15~20개 아미노산의 펩티드를 암호화한다. 아미노산은 대부분 소수성을 나타낸다. 일반적인 상황에서 신호펩티드는 발현되는 세포의 소포체로 신호펩티드를 가지고 가면서 연장되는 폴리펩티드 사슬을 목표로 한다. 신호펩티드는 골지체를 통해 폴리펩티드의 분비를 가능하게 하면서 소포체에서 잘린다. 그러므로 본 발명의 펩티드는 개인내부의 세포로부터 발현과 그 세포들로부터의 분비에 의해 개인에게 주어진다.

[0120] 그 대신에 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 항원제시세포(APC)의 표면에서 MHC class II 분자에 의해 본 발명의 펩티드의 제시를 가능하게 하는 적합한 방식으로 발현된다. 예를 들어, 본 발명의 폴리뉴클레오티드, 발현카세트 또는 벡터는 항원제시세포의 목표가 되거나 암호화된 펩티드의 발현은 이런 세포 안에서 우선적으로 자극되거나 유발된다.

[0121] 실시예에서, 폴리뉴클레오티드, 발현카세트 또는 벡터가 아쥬반트(adjuvant)를 암호화하거나 그렇지 않으면 아쥬반트는 제공될 것이다. 여기에 사용된 대로 용어 ”아쥬반트”는 특별히 또는 일반적으로 항원특이적 면역반응을 변경, 강화, 전송, 재전송, 강화 또는 시작할 수 있게 하는 물질 또는 조성물을 나타낸다.

[0122] 흥미있는 폴리뉴클레오티드는 본 발명의 펩티드 생산의 인비트로(in vitro), 엑스비보(ex vivo) 또는 인비보(in vivo)에서 이용될 수 있다. 이런 폴리뉴클레오티드는 면역관용에 의해 알레르기 예방 또는 치료에 투여되거나 이용된다.

[0123] 유전자 전달의 방법은 이 분야기술에서 잘 알려져 있다. 예를 들어 미국특허 번호 5399346, 5580859, 5589466을 봐라. 핵산분자는 표준 근육 내(intramuscular) 또는 피부 내 주입(intradermal injection) 그리고 피부를 통한 분자 전달(transdermal particle delivery) 그리고 흡입(inhalation), 국소적으로 (topically) 또는 경구를 통해(by oral), 비강 내의(intranasal) 또는 점막의 (mucosal) 투여방식으로 수용자에게 직접 도입시킬 수 있다. 그 대신에 분자는 엑스비보에서 피험자로부터 제거된 세포내부로 도입될 수 있다. 예를 들어 본 발명의 폴리뉴클레오티드, 발현 카세트 또는 벡터는 개인의 엑스비보의 항원제시세포로 도입될 수 있다. 흥미있는 핵산분자를 포함하는 세포는 면역반응이 핵산분자에 의해 암호화된 펩티드에 대하여 증가할 수 있으므로 피험자에게 재도입될 수 있다. 핵산분자는 여기 일반적으로 “핵산분자백신”이라고 나타난 면역조치에 이용된다.

[0124] 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드, 벡터 또는 본 발명의 세포는 주로 단일형태로 존재한다. 그것들은 그것들의 의도적인 용도를 방해하지 않고 여전히 단일된 것으로 여겨지는 전달자 또는 희석액과 혼합될 수 있다. 그것은 또한 주로 정제된 형태이고 이 경우에 그것들은 일반적으로 적어도 90%, 예를 들어 적어도 95%, 98%, 99%의 단백질, 폴리뉴클레오티드, 세포들 또는 프레파라트(preparation)의 견조량을 구성할 것이다.

항원제시세포(Antigen presenting cells:APCs)

[0125] 본 발명은 표면에 본 발명의 펩티드를 제시하는 항원제시세포(APCs)집단을 생산하는 인비트로 방법을 포함하고, 이것은 대체로 치료에 이용된다. 이런 방법은 환자로부터 얻은 세포샘플을 가지고 엑스비보로 수행된다. 그러므로 이런 방법으로 생산된 항원제시세포(APCs)는 면역관용에 의해 자작나무 알레르기의 치료 및 예방에 이용될 수 있는 제약물질을 형성시킨다. 세포들은 개체의 면역계에 의해 수용되어야 한다. 왜냐하면 그것들은 그 개인로부터 파생되었기 때문이다. 그러므로 이 방법으로 생산된 세포의 원래 제공했던 개인에게로의 전달은 본 발명의 치료적인 실시예를 형성한다.

제제와 조성

[0126] 본 발명의 펩티드, 폴리뉴클레오티드, 벡터와 세포는 단독으로 또는 결합하여 개인에게 제공된다. 본 발명의 각

분자나 세포는 단일의, 대체로 단일의 정제된, 대체로 정제한 형태로 개인에게 제공된다. 예를 들어 본 발명의 웨პ티드는 다른 웨პ티드로부터 대체로 자유롭게 제공된다. 그 대신에 조성에서 넷 이상의 웨პ티드는 표준 웨პ티드 짹지음 시약을 이용하여 선호하는 항원결정부위를 포함하는 단일 웨პ티드를 제공하기 위해 화학적으로 함께 짹지어진다. 이런 웨პ티드는 개개의 웨პ티드에 따라 히스타민 방출의 부족을 확인하기 위해 호염구 히스타민 방출에 대해 검사된다. 추가의 실시예에서 조성의 넷 이상의 웨პ티드는 단일 웨პ티드사슬의 부분으로서, 즉 암호화된 폴리뉴클레오티드로부터 재조합 방법에 의해 제공받는다. 넷 이상의 웨პ티드는 인접하여 결합되거나 그 대신 적합한 링커에 의해 분리된다.

[0129] 본 발명에 따라 웨პ티드, 폴리뉴클레오티드 또는 조성물이 원시형태(raw form)로 제시되는 것이 가능한 반면에, 그것들을 제약 제제로서 제공하는 것이 바람직하다. 그러므로 추가의 본 발명의 양상에 따라 본 발명은 본 발명에 따라 하나 또는 그 이상의 약학적으로 허용가능한 담체 또는 희석액과 선택적으로 하나 이상의 다른 치료법의 구성요소와 함께 조성물, 백터 또는 산물을 구성하는 면역관용을 통해 자작나무 알레르기를 예방 또는 치료 용도의 제약 제제를 제공한다. 전달자는 제제의 다른 구성요소와 양립되는 것이 허용가능해야 하고 그것의 수용자에게 해롭지 않아야 한다. 일반적으로 주입을 위한 전달자와 최종 제제는 소독된 상태이고 발열물질이 없다. 바람직하게는 담체 또는 희석액은 싸이오글리세롤(thioglycerol) 또는 싸이오아니솔(thioanisole)이다.

[0130] 본 발명의 웨პ티드, 폴리뉴클레오티드 또는 세포를 구성하는 조성물의 제제가 표준 약품제제 화학과 합리적으로 숙련된 당업자에게 손쉽게 이용 가능한 방법론을 이용하여 실시될 수 있다.

[0131] 예를 들어 본 발명의 하나 또는 그 이상의 분자나 세포들을 포함하는 조성물은 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 첨가제나 매개체와 결합될 수 있다. 습윤제나 유화제, pH 완충제 같은 보조물질은 첨가제나 매개체 안에 존재할 수 있다. 이 첨가제, 매개체와 보조물질은 일반적으로 조성물을 받은 개체 안에서 면역 반응을 유도하지 않는 제약물질이고 이것은 유독한 독성효과 없이 투여된다. 약학적으로 허용가능한 첨가제는 수분, 염분, 폴리에틸렌글리콜(polyethyleneglycol), 히알루론산(hyaluronic acid), 글리세롤(glycerol), 싸이오글리세롤(thioglycerol), 에탄올(ethanol)같은 액체를 포함하지만 그것으로 제한되지는 않는다. 약학적으로 허용가능한 염은 또한 예를 들어 그 안에 하이드로클로라이드(hydrochloride), 하이드로브로마이드(hydrobromide), 인산염(phosphate), 황산염(sulfate) 같은 무기산염이 포함된다. 그리고 아세테이트(acetate), 프로피온 에스테르(propionate), 말론산(malonate), 벤조산염(benzoate) 같은 유기산염이 포함된다. 약학적으로 허용가능한 첨가제, 매개체 그리고 보조물질의 철저한 논의는 Remington's Pharmaceutical Sciences(Mack Pub.Co., N.J. 1991)에서 담고 있다.

[0132] 이런 조성물은 1회 투여량 또는 지속적인 투여량에 적합한 형태로 준비되고, 포장되거나 판매된다. 주입가능한 조성물은 앰플이나, 방부제가 포함된 다회용 용기에 담아 단위용량의 형태로 준비, 포장, 판매된다. 조성물은 기름기가 많은 부유액, 용액, 유화액이나 수용매개체, 반죽, 주입할 수 있는 지효성 약제나 생분해성의 제제를 포함하나 그것으로 제한되지 않는다. 이런 조성물은 하나 이상의 추가적인 구성요소 즉, 서스펜션, 안정화제, 분산제를 포함하나, 그것으로 제한되지 않는다. 비경구투여를 위한 조성물의 실시예에서 유효성분은 적합한 매개체(소독한 발열물질 없는 수분)와 재구성된 조성물의 비경구투여보다 앞서 재구성을 위한 건조상태로(파우더나 작은 알갱이) 제공된다. 약학적인 조성은 소독된 주입가능한 수용액이나 기름기가 함유된 서스펜션 용액의 형태로 준비, 포장, 판매된다. 이 서스펜션 또는 용액은 잘 알려진 기술에 따라 만들어지고 유효성분에 추가하여 여기에 명시한 분산제, 습윤제, 서스펜션제 같은 추가의 구성요소를 포함할 수 있다. 이 소독한 주입가능한 제제는 예를 들면 수분이나 1,3-부테인디올(1,3-butane diol)같은 무독성의 비경구적으로 투입할 수 있는 희석액이나 용액을 이용하여 준비된다. 다른 가능한 희석액이나 용액은 링거액, 등장식염용액, 합성한 모노/디글리세리드 같은 고정유를 포함하지만 그것으로 제한되지는 않는다.

[0133] 다른 비경구적으로 투여가능한 유용한 조성물은 미정질 형태의, 리보솜 제제의 또는 생분해성 고분자 시스템의 요소로서 유효성분을 구성하는 것을 포함한다. 지효성의 또는 이식을 위한 조성물은 유화액, 이온교환수지, 조금 녹는 중합체, 또는 조금 녹는 염 같은 약학적으로 허용가능한 중합의 또는 소수성 물질을 구성한다.

[0134] 그 대신 본 발명의 웨პ티드나 폴리뉴클레오티드는 미립자의 담체로 압축되고 흡수되며 그와 관련되어 있다. 적합한 미립자 담체는 폴리(락티드)와 폴리(락티드코글리코라이드)로부터 파생된 폴리(락티드코글리코라이드)(PLG) 극미립자 뿐만 아니라 폴리메틸크릴산 메틸 중합체로부터 파생된 것을 포함한다. 예 Jeffery등 (1993) Pharm.Res. 10:362-368을 봐라. 다른 미립자 시스템과 중합체는 이 분자들의 변형뿐만 아니라 예를 들어 폴리리신, 폴리아르기닌, 폴리오르니틴, 스페르민, 스페르미딘 같은 고분자로 또한 이용될 수 있다.

[0135] 여기에 언급한 웨პ티드, 폴리뉴클레오티드, 세포의 제제는 물질의 상태와 전달방법 같은 요소들에 따라

달라진다. 이 물질들은 입을 통해서(정체, 캔디, 수용성 또는 지용성 서스펜션, 분산형 파우더 또는 작은 알갱이), 국소적으로, 비경구적으로, 피하로, 흡입을 통해, 정맥주사로, 근육내로, 피부 내로, 경피로, 혀 밑으로, 코 안으로, 구강으로 투입기술에 의해 다양한 복용량 형태로 투여될 것이다. 또한 좌약으로 투여되기도 한다. 의사는 각각의 특정한 개인마다 필요로 하는 투여경로를 결정할 수 있어야 할 것이다.

[0136] 본 발명의 제제의 조성물은 역반응을 유발하지 않고 효과를 나타내기 위해 적합한 농도의 각 웨პ티드/폴리뉴클레오티드/세포를 구성할 것이다. 일반적으로 조성물에서 각 웨პ티드의 농도는 0.03~200nmol/ml 범위내일 것이다. 더욱 바람직하게는 0.3~200 nmol/ml 범위내, 3~180 nmol/ml, 10~150 nmol/ml, 50~200 nmol/ml, 30~120 nmol/ml 범위내 이다. 조성 또는 제제는 95%나 98%이상의 순도 또는 적어도 99% 순도를 가져야 한다.

[0137] 본 발명의 어느 면에서는 아쥬반트가 본 발명의 폴리웨პ티드/폴리뉴클레오티드/세포와의 결합에 이용된다. 가급적이면 아쥬반트는 본 발명의 폴리웨პ티드/폴리뉴클레오티드/세포의 효과를 증가시키거나 또는 그 반대의 경우를 일으키기에 충분한 양이 투여된다. 아쥬반트 또는 다른 치료물질은 본 발명의 분자의 효과를 증가시키는 물질이다. 예를 들어 그 다른 물질은 면역조정분자이거나 본 발명의 웨პ티드 또는 세포에 대한 반응을 강화시키는 아쥬반트일 것이다.

[0138] 그러므로 실시예에서 본 발명의 웨პ티드, 폴리뉴클레오티드, 세포 또는 조성물은 하나 이상의 다른 치료물질과 결합하여 치료에 이용된다. 그물질은 분리되어, 동시에, 연속적으로 투여된다. 그 물질은 같거나 각기 다른 조성으로 투여된다. 따라서 본 발명의 방법에서 피험자는 또한 추가의 치료물질에 의해서 치료된다.

[0139] 그러므로 본 발명의 분자 그리고/또한 세포 그리고/또한 하나 이상의 다른 치료분자들을 구성하는 조성물이 만들어진다. 그렇지 않으면 본 발명의 조성물은 결합된 치료제의 일부로서 하나 이상의 다른 치료조성물을 가지고 동시에, 연속적으로 또는 분리되어 이용된다.

[0140] 아쥬반트의 비 제한 예는 비타민 D, 라파마이신(rapamycin)과 텍사메타손 (dexamethasone), 플루티카손 (fluticasone), 부데소니드(budesonide), 모메타솔 (mometasone), 베클로메타손(beclomethasone), 히드로코르티손(hydrocortisone), 코르티손 아세테이트(cortisone acetate), 프레드니손(prednisone), 프레드니솔론 (prednisolone), 메틸프레드니솔론(methylprednisolone), 베타메타손 (betamethasone), 트리암시놀론 (triamcinolone) 같은 글루코코티코이드 스테로이드를 포함한다. 선호되는 글루코코티코이드는 텍사메타손이다.

치료방법과 치료대상

[0142] 본 발명은 상기에 언급한 알레르기항원에 탈감각화 또는 면역관용을 할 수 있는 웨პ티드, 폴리뉴클레오티드, 백터와 세포에 관한 것이고, 그러므로 자작나무 알레르기의 예방, 치료에 유용하다. 본 발명은 면역관용에 의해 자작나무에 대한 알레르기를 예방, 치료하기 위한 용도의 조성, 산물, 백터와 제제를 제공한다. 또한 본 발명은 자작나무 알레르기에 걸린 개인을 면역관용화 또는 탈감각화 시키는 방법-상기에 명시한 대로 본 발명의 폴리웨პ티드/폴리뉴클레오티드/세포를 단독으로 또는 결합으로 투여하는 것을 구성하는 방법-을 제공한다.

[0143] 본 발명의 조성 또는 제제로 치료 또는 제공받을 대상은 가급적이면 인간이다. 치료받는 개인이 알레르기항원에 민감하게 될 위험에 있거나 또는 의심될 경우에 있어서 알레르기항원에 민감한 것으로 알려지는 것이 이해될 것이다. 개인은 이 기술분야에서 잘 알려진 기술을 이용하여 여기에 명시된 대로 감작(sensitisation)에 대해 테스트될 수 있다. 그 대신에 개인은 자작나무에 대한 알레르기의 가족병력을 가지고 있을 수 있다. 자작나무에의 감작을 알아보기 위해 개인을 테스트하는 것은 불필요하다. 왜냐하면 개인은 자작나무에 노출되었을 때 알레르기 증상을 드러내기 때문이다. 예를 들어 노출에 의해 자작나무 식물, 자작나무 식물로부터 파생된 물질이나 생산품, 상기 중 하나라도 포함하거나 구성하는 물질이나 생산품에 근접성을 의미한다. 자작나무 식물로부터 파생된 물질이나 생산품은 일반적으로 자작나무 꽃가루이다. 위에 명시된 대로 근접에 의해 제품으로부터 10미터 또는 그 미만, 5미터 또는 그 미만, 2미터 또는 그 미만, 1미터 또는 그 미만, 0미터를 의미한다. 알레르기의 증상은 가려운 눈, 콧물이 흐르는 것, 호흡곤란, 빨갛게 가려운 피부 또는 발진을 포함할 수 있다.

[0144] 치료대상은 어느 나이 대라도 상관없다. 그러나 가급적이면 개인은 연령대가 1~90, 5~60, 10~40의 연령대 또는 더 가급적이면 18~35에 있다.

[0145] 가급적이면 치료대상은 코카시안(Caucasian) 인구를 대표하는 빈도 내에 MHC 대립인자 빈도를 가진 집단에서 얻는다. [표 1]에 11가지 일반적인 DRB1 대립군에 대한 참조인구 대립빈도를 나타내었다(데이터는 HLA Facts Book, Parham and Barber에서 발췌하였음).

[0146]

<표 1>

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
참조 인구 %	9.4	11.1	12.8	13.2	3.7	13.4	2.3	10.2	3.2	10.7	3.6

[0147]

[0148]

참조빈도는 표시된 빈도나 수치가 평균값임을 보고하는 여러 번의 연구 분석에 의해 얻었다. 그러므로 가급적이면 치료대상은 [표1](적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 모든 대립인자 같은)에 나타난 대립인자에 대한 참조 인구로서 동등한 MHC 대립빈도를 가지는 인구, 예를 들어 이 수치에서 플러스, 마이너스 1, 2, 3, 5, 10, 15 또는 20%의 범위 내에서 얻는다.

[0149]

가급적이면 개인은 하기의 DRB1 대립인자가:

[0150]

4-적어도 9%

[0151]

7 -적어도 10%

[0152]

11-적어도 8%

[0153]

의 대립빈도의 인구로부터 얻는다.

[0154]

개인은 자작나무 알레르기를 적어도 2주, 1달, 6달, 1년 또는 5년 동안 가지고 있었다. 개인은 알레르기에 의해 유발된 발진, 코막힘, 비루 그리고/또는 기침으로 고통 받는다. 개인은 자작나무 알레르기를 치료하는 다른 조성물/화합물을 투여받고 있을 수도 없을 수도 있다. 개인은 다음과 같은 자리적인 장소에 산다.

[0155]

-온대성, 북풍의 또는 북극기후, 그리고/또는:

[0156]

-일반적인 토양 pH 3.5~7.5 범위 내

[0157]

개인은 일반적으로 특정 계절에 자작나무 꽃가루 알레르기로 고통 받는다. 일반적으로 자작나무의 꽃을 피우는 철에 해당하는 계절은 봄이고 특히 이른 봄(예를 들어 북반구에서 4월부터 5월까지)이다. 알레르기에 걸린 개인은 일반적으로 *Betula*속에 속하는 나무, 예를 들어 *Betula pendula* 또는 *Betula pubescens* 의 자작나무 꽃가루에 알레르기 반응을 보인다.

[0158]

결합 면역요법

[0159]

많은 개인들이 알레르기에 걸리거나 여러 폴리펩티드 항원에 탈감각화를 요하게 되었기 때문에 본 발명은 다양한 항원에 알레르기 반응을 일으키는 개인들을 탈감각화 시키는 수단을 제공한다. 개인에게 첫 폴리펩티드항원 또는 알레르기항원으로 유도되었던 "면역관용"은 개인에게 면역관용적 환경을 만들 수 있고, 다른 항원에 대한 면역관용을 방지하기 위해서 다른 항원에 대한 부적합한 면역반응을 억제할 수 있다.

[0160]

이 발견은 여러가지 알레르기항원에 알레르기 반응을 일으키는 개인들이 매우 줄어든 시간 안에 치료될 수 있고, 어떤 항원은(땅콩)에는 심각하게 알레르기 반응을 일으키지만 다른 항원(고양이비듬)에는 더욱 부드럽게 알레르기 반응을 보이는 개인들은, 더욱 부드러운 항원에 대한 면역관용이 밝혀지고 그 다음에 이러한 면역관용적 환경이 나머지 다른, 극도의 항원에 면역관용을 제공하는데 이용되는 점에서 치료로부터 이익을 얻을 수 있다. 게다가 관련없는 항원이나 알레르기항원에 민감해 지거나 그렇지 않으면 면역성이 있는 자가면역 장애로부터 고통받는 개인들은 관련없는 항원이나 알레르기항원에 대한 면역관용이 처음으로 밝혀지고 그 다음에 이 면역관용적인 환경이 자가면역장애와 관련있는 자가항원에 면역관용을 제공하는데 사용되는 점에서 치료요법으로 이익을 얻을 수 있다.

[0161]

그러므로 이 방법은 상기 명시한 대로 자작나무 알레르기와 하나 또는 그 이상의 다른 폴리펩티드 항원에 걸린 개인을 자작나무 알레르기항원에 탈감각화 시키는 것을 위해 제공한다. 첫 단계로, 방법은 개인에 조성물/산물/제제(주요 조성)를 본 발명에 따라 여기에 명시한 대로 투여하는 것을 수반한다. 그리고 자작나무 알레르기항원에 대해 반응을 덜 보이는 상태를 발생시키기에 충분한 방법으로 투여가 수행된다. 일단 자작나무 알레르기항원

에 대하여 반응을 덜 보이는 상태가 밝혀지면 또는 적어도 탈감각화를 향해 변화가 발생하면 방법은 개인을 민감해지게 만드는 2번째, 다른 폴리펩티드 항원으로 구성된 2차 조성물의 투여를 수반한다. 2번째 조성물의 투여는 1차 조성물의 사용에 의해 형성된 면역관용적 환경의 이익을 얻기 위해 이 방법으로 수행되는데, 2번째의 다른 폴리펩티드 항원에 면역관용을 일으키는 것이 현재 가능하다. 2차 조성물은 1차 조성물과 함께 투여되거나 자작나무 항원의 더 큰 조각과 함께 투여된다. “공동투여”는 동시에 또는 공존하여 투여한다는 의미이다. 예를 들어 2가지 물질이 같은 조성물 안에 존재할 때, 또는 분리된 조성으로 다른 시간대에 폴리펩티드 항원이 전달되는 것 뿐만 아니라 거의 같은 시간대지만 다른 장소에서 분리된 조성물로 투입되는 것을 말한다. 예를 들어 2차 조성이 같거나 또는 다른 장소에서 1차 조성의 전달 전이나 뒤에 전달된다. 두 전달 사이의 시간대는 약 몇 초에서 약 몇 분, 몇 시간, 심지어 며칠까지 범위를 잡을 수 있다. 게다가 각기 다른 전달 방법이 이용될 수 있다.

[0162] 2차 폴리펩티드 항원은 가급적이면 자작나무 알레르기항원과 다른 알레르기항원이다. 본 발명의 방법에 사용하기 위한 적합한 알레르기항원은 물론 알려진 방법을 이용해서 얻거나 생산할 수 있다. 적합한 알레르기항원의 종류들은 다음을 포함하되, 다음으로 제한되지는 않는다; 먼지 진드기 알레르기항원, 꽃가루, 동물비듬(특히 고양이비듬), 풀 알레르기항원, 곰팡이, 먼지, 항생물질, 곤충침독, 그리고 환경의 다양한 요소(화학물질과 금속물질 포함), 약물과 음식알레르기항원. 일반적인 알레르기항원은 미루나무, 포풀러나무, 물푸레나무, 자작나무, 단풍나무, 오크나무, 느릅나무, 히코리나무, 피칸나무를 포함한다. 그리고 일반적인 식물 알레르기항원은 쑥, 돼지풀, 창질경이, 수영, 명아주의 알레르기항원을 포함한다. 그리고 식물접촉 알레르기항원은 옻나무, 덩굴 옻나무, 쇠기풀을 포함한다. 그리고 일반적인 풀 알레르기항원은 독보리, 티모시, 존슨, 베뮤다, 김의털, 블루그라스 알레르기항원을 포함한다. 그리고 일반적인 알레르기항원은 알터나리아, 붉은 곰팡이, 호르모텐드룸, 아스페르길루스, 마이크로폴리스포라, 텔곰팡이, 호열성 방선균류 같은 곰팡이로부터 얻을 수 있다. 그리고 상피 알레르기항원은 집먼지나 유기먼지(일반적으로 곰팡이 기원의), 날개, 개 비듬 같은 동물 출처로부터 얻을 수 있다. 일반적인 음식 알레르기항원은 우유와 치즈(매일), 달걀, 밀, 견과(땅콩), 해산물(조개류), 완두콩, 콩 그리고 글루텐 알레르기항원을 포함한다. 일반적인 환경과 관련된 알레르기항원은 금속(니켈과 금), 화학물질(포름알데히드, 트리니트로페놀 그리고 테레빈유), 라텍스, 고무, 섬유(면 또는 울), 삼베, 머리염색제, 화장품, 세제 그리고 향수 알레르기항원을 포함한다. 일반적인 약물 알레르기항원은 국부마취약과 살리실산염을 포함한다. 그리고 일반적인 곤충 알레르기항원은 벌, 말벌 그리고 개미침, 그리고 바퀴벌레 칼릭스 알레르기항원을 포함한다. 특히 잘 특징지어진 알레르기항원은 다음을 포함하되, 다음으로 제한되지 않는다: 주요 고양이 알레르기항원 Fel d1, 벌침 인지질 가수분해효소 A2(PLA)(Akdis et al.(1996) *J.Clin.Invest.* 98:1676-1683), 다항원 결정부위의 재조합 풀알레르기항원 rKBG 8.3 (Cao et al.(1997) *Immunology* 90:46-51). 이들과 다른 적합한 알레르기항원은 상업적으로 이용가능하고 손쉽게 하기 알려진 기법에 따라 추출로 준비될 수 있다.

[0163] 가급적이면 2차 폴리펩티드 알레르기항원은 전체 나무꽃가루 알레르기 또는 알레르기 염기서열 리스트와 아래의 데이터베이스 검색번호로부터 선택된 항원조각이다. NCBI는 미국국가생물공학센터이고 미국국립보건원의 산하기관이다. 찾고자 하는 데이터로의 접근은 NCBI 웹사이트는 www.ncbi.nlm.nih.gov/이다. 알레르기항원 염기서열과 데이터베이스 검색번호(NCBI Entrez 검색번호)는 하기와 같다:

[0164] 올리브 나무

[0165] 올리브 염기서열

[0166] 416610 Ole e1

[0167] EDIPQPPVSQFHIQQVYCDTCRAGFITELSEFIGASRLQCKDKENGDTVTEVGYTRAEGLYSMLVERDHKNEFCEITLISSGRKDCNEIPTEGWAKPS LKFKLNTVNGTTRTVNPLGFFKKEALPKCAQVYNKLGMYPPNM

[0168] 나무 알레르기항원(주로 자작나무) 염기서열:

[0169] 130975 Bet v2

[0170] MSWQTYVDEHLMCIDGQASNSLASAIVGHDGSVWAQSSSFQFKPQEITGIMKDFEEPGLAPLGLHLGGIKYMDIQGEAGAVIRGKKGSGGITIKKTGQA

LVFGIYEEPVTPGQCNMVVERLGDLIDQGL

[0171] 1942360 Bet v2

[0172] MSWQTYVDEHLMCDIDGQGEELAASAIVGHDSVWAQSSFPQFKPQEITGIMKDFEEPGLAPLGLHLGGIKYMIQGEAGAVIRGKKGS GG ITIKKTGQA
LVFGIYEEPVTPGQCNMVVERLGDLIDQGL

[0173] 166953 Bet v2

[0174] MSWQTYVDEHLMCDIDGQASNSLASAIVGHDSVWAQSSFPQFKPQEITGIMKDFEEPGLAPLGLHLGGIKYMIQGEAGAVIRGKKGS GG ITIKKTGQA
LVFGIYEEPVTPGQCNMVVERLGDLIDQGL

[0175] 541814 Bet v2

[0176] MSWQTYVDEHLMCDIDGQASNSLASAIVGHDSVWAQSSFPQFKPQEITGIMKDFEEPGLAPLGLHLGGIKYMIQGEAGAVIRGKKGS GG ITIKKTGQA
LVFGIYEEPVTPGQCNMVVERLGDLIDQGL

[0177] 2488678 Bet V2

[0178] MSWQTYVDEHLMCDIDGQASNSLASAIVGHDSVWAQSSFPQFKPQEITGIMKDFEEPGLAPLGLHLGGIKYMIQGEAGAVIRGKKGS GG ITIKKTGQA
LVFGIYEEPVTPGQCNMVVERLGDLIDQGL

[0179] 1829894 Bet v2

[0180] MSWQTYVDEHLMCDIDGQASNSLASAIVGHDSVWAQSSFPQFKPQEITGIMKDFEEPGLAPLGLHLGGIKYMIQGEAGAVIRGKKGS GG ITIKKTGQA
LVFGIYEEPVTPQCNMVVERLGDLIDQGL

[0181] 1168696 Bet v3

[0182] MPCSTEAMEKAGHGASTRRKRSLSNSSFRLRSESLTRLRRIFDLFDKNDGIITVDELSRALNLLGLETDLESELESTVKSFTREGNIGLQFEDFISLHQSL
NDSYFAYGGEDEDNEEDMRKSILSQEEADSFGGFKVFDEGDGYISARELQMVLGKLGFSEGSEIDRVEKMIVSVDSDNRDGRVDFFEFKDMMRSLVRSS

[0183] 809536 Bet v4

[0184] MADDHPQDKAERERIFKRFDANGDGKISAALGEALKTLGSITPDEVKHMMAEIDTDGDGFISFQEFTDFGRANRGLLKDVA KIF

[0185] 543675 Que a I -Quercus alba=오크나무(조각)

[0186] GVFTXESQETSVIAPAXLFKALFL

[0187] 543509 Car b I -Carpinus betulus=서어나무(조각)

[0188] GVFNYEAETPSVIAPARLFQSYLDGDKLIPKVAPQAIXK

[0189] 543491 Aln g I -Alnus glutinosa=오리나무(조각)

[0190] GVFNYEAETPSVIPAARLFKAFILDGDKLLPKVAPEAVSSVENI

[0191] 1204056 루비스코

[0192] VQCMQVWPPLGLKKFETLSYPLSSEQLAKEVDYLLRKNLIPCLEFELEHGFVYREHNRSPGYYDGRYWTMWKPMFCVSSQLKELEECKKAYPSAFIRI
IGFDDK

[0193] 추가의 나무 알레르기 항원 염기서열(NCBI entrez 검색번호):

[0194] 131919; 128193; 585564; 1942360; 2554672; 2392209; 2414158; 1321728; 1321726; 1321724; 1321722;
1321720; 1321718; 1321716; 1321714; 1321712; 3015520; 2935416; 464576; 1705843; 1168701; 1168710;
1168709; 1168708; 1168707; 1168706; 1168705; 1168704; 1168703; 1168702; 1842188; 2564228; 2564226;
2564224; 2564222; 2564220; 2051993; 1813891; 1536889; 534910; 534900; 534898; 1340000; 1339998;
2149808; 66207; 2129477; 1076249; 1076247; 629480; 481805; 81443; 1361968; 1361967; 1361966; 1361965;
1361964; 1361963; 1361962; 1361961; 1361960; 1361959; 320546; 629483; 629482; 629481; 541804; 320545;
81444; 541814; 629484; 474911; 452742; 183487; 298737; 298736; 1584322; 1584321; 584320; 1542873;
1542871; 1542869; 1542867; 1542865; 1542863; 1542861; 1542859; 1542857; 1483232; 1483230; 1483228;
558561; 551640; 488605; 452746; 452744; 452740; 452738; 452736; 452734; 452732; 452730; 452728;
450885; 17938; 17927; 17925; 17921; 297538; 510951; 289331; 289329; 166953.

[0195] 삼나무 염기서열

[0196] 493634 Cry j IB 전구체

[0197] MDSPLVALLVFSVIGSCFSDPIDSCWRGDSNWAQNRMKLADCAVGFGSSTMGGKGGLYTVTNSDDDPVNPPGTLRYGATRDRPLWIIIFSGNMNIKLKM
PMYIAGYKTFDGRGAQVYIGNGPCVFIKRVSNVIHGLHLYGCSTSVLGNVLINESFGVEPVHPQDGALTLRTATNIWIDHNSFSNSSDGLVDVLTSTG
VTISNNLFFNHHKVMSLGHDDAYSDDKSMKVTVAFNQFGPNCQRMPRARYGLVHVANNNTDPWTIYAIGGSSNPTILSEGSFTAPNESYKKQVTIRIGCKT
SSSCSNWWQSTQDVFYNGAYFVSSGKYEGGNITYKKEAFNVENGATPHLTQNAGVLTCSLSKRC

[0198] 493632 Cry j IA 전구체

[0199] MDSPLVALLVFSVIGSCFSDPIDSCWRGDSNWAQNRMKLADCAVGFGSSTMGGKGGLYTVTNSDDDPVNPPGTLRYGATRDRPLWIIIFSGNMNIKLK
MPMYIAGYKTFDGRGAQVYIGNGPCVFIKRVSNVIHGLHLYGCSTSVLGNVLINESFGVEPVHPQDGALTLRTATNIWIDHNSFSNSSDGLVDVTLSTT
GVTISNNLFFNHHKVMSLGHDDAYSDDKSMKVTVAFNQFGPNCQRMPRARYGLVHVANNNYDPWTIYAIGGSSNPTILSEGSFTAPNESYKKQVTIRIGC
KTSSCSNWVWQSTQDVFYNGAYFVSSGKYEGGNITYKKEAFNVENGATPQLTKNAGVLTCSLSKRC

[0200] 1076242 Cry j II 전구체- 일본 삼나무

[0201] MAMKLIAPMALFLAMQLIIMAAEDQSAQIMLDSEVYKLRNSRLRKVEHSRHDAINIFNVEKYGAVGDGHKDCTEAFSTAWQAACKNPSAMLLVPGSKKFV
VNNLFFNGPCQPHFTFKVDGIIAAYQNPASWKNNRIWLQFAKLTGFTLMKGVIDGQGKQWWAGQCKWNGREICNDRDRPTAIKFDFSTGLIIQGLKLMNS
PEFHVLFGNCEGVKIIGISITAPRDSPTDGIDIFASKNFHQKNTIGTGDDCVAIGTGSNIVIEDLICPGHGISINGLRENSRAEVSYHVNGAKFID
TQNGLRIKWTQGGSGMASHIYENVEMINSENPILINQFYCTSASACQNQRSQAVIQDVTYKNIRGTSASPSAKRKESSHKHPKTMVENMRAYDKGNRTR
ILLGSRPPNCTNKCHGSCPKAKLIVHRIIMPQEYYPQRWICSCHGKIYHIP

[0202] 1076241 Cry j II 단백질- 일본 삼나무

[0203] MAMKFIAPMAFVAMQLIIMAAEDQSAQIMLDSDIEQYLRNSRLRKVEHSRHDAINIFNVEKYGAVGDGHKDCTEAFSTAWQAACKKPSAMLLVPGNKKFV
VNNLFFNGPCQPHFTFKVDGIIAAYQNPASWKNNRIWLQFAKLTGFTLMKGVIDGQGKQWWAGQCKWNGREICNDRDRPTAIKFDFSTGLIIQGLKLMNS

PEFHVLFGNCEGVKIIGISITAPRDSPTDGIDIFASKNFHLQKNTIGTGDDCVAIGTGSNIVIEDLICPGHGSIGSLGRENSRAEVSYVHNGAKFID
TQNGLRIKTWQGGSGMASHIYENVENINSENPILINQFYCTSASACQNQRSAVQIQDVTYKNIRTSATAAAIQLKCSDSMPCKDISLKLTSGKIASCLNDN
ANGYFSGHVIPACKNLSPSAKRKESKSHKHPKTVMVKNMGAYDKGNRTRILLGSRPPCTNKCHGCSPCKAKLVIVHRIMPQEYYPQRWMCSRHGKIYHP

[0204] 541803 Cry j I 전구체-일본 삼나무

MDSPCLVALLVLSFVIGSCFSNDPIDS CWRGDSNWAQNRMLADCAVGFGSSTMGGKGGLYTWTNSDDDPVNPPGTLRYGATRDRPLWIIFSGNMNIKLMP
MYIAGYKTFDGRGAQVYIGNGGPCVFIKRVSNVIHGLHLYGCSTSVLGNVLINESFGVEPVHPQDGDALTLRTATNIWIDHNSFSNSSDGLVDVTLSSSTGV
TISNNLFFNHHKVMLLGHDAYSDDKSMKVTVAFNQFGPNCGQRMPRARYGLVHVANNYDPWTIYAIGGSSNPTILSEGSFTAPNESYKKQVTIRIGCKT
SSSCSNWWQSTQDFYNGAYFVSSGKYEGGNIYTKKEAFNVENGNA TPQLTKNAGVLTCSLSKRC

[0206] 541802 Cry j I 전구체-일본 삼나무

MDSPCLVALLVLSFVIGSCFSNDPIDS CWRGDSNWAQNRMLADCAVGFGSSTMGGKGGLYTWTNSDDDPVNPPGTLRYGATRDRPLWIIFSGNMNIKMP
MYIAGYKTFDGRGAQVYIGNGGPCVFIKRVSNVIHGLHLYGCSTSVLGNVLINESFGVEPVHPQDGDALTLRTATNIWIDHNSFSNSSDGLVDVTLSSSTGV
TISNNLFFNHHKVMSLGHDDAYSDDKSMKVTVAFNQFGPNCGQRMPRARYGLVHVANNYDPWTIYAIGGSSNPTILSEGSFTAPNESYKKQVTIRIGCKT
SSSCSNWWQSTQDFYNGAYFVSSGKYEGGNIYTKKEAFNVENGNA TPQLTKNAGVLTCSLSKRC

전달방법

[0209] 본 발명의 조성물이 일단 만들어지면 인비보(in vivo) 상태에서 피험자에게 다양한 경로와 기법을 이용해서 전달될 수 있다. 예를 들어 조성물은 종래의 바늘과 주사기를 이용하거나 액체분출주사를 이용하거나 패치를 이용하거나 주입가능한 용액, 서스펜션, 유화액으로서 제공될 수 있고, 비경구의(parenteral), 피하의(subcutaneous), 상피의(epidermal), 피내의(intradermal), 근육내의(intramuscular), 동맥내의(intraarterial), 복강내의(intraperitoneal), 정맥주사(intravenous injection)를 통해 투여될 수 있다. 조성물은 피부나 점막조직에 국소적으로, 비음으로(nasally), 기도 내로(intratracheally), 창자로(intestinal), 직장으로(rectally), 또는 질 동맥(vaginally)으로 투여될 수 있고, 호흡 또는 폐 투여에 적합한 미세분리된 스프레이로 제공받을 수 있다. 다른 투여방식은 구강투여, 좌약방식, 혀밀 투여 그리고 능동적 또는 수동적인 경피전달기법(transdermal delivery technique) 등을 포함한다.

[0210] 본 발명의 웹티드가 투여되는 지점은 적합한 항원제시세포와 접촉할 수 있는, 그리고 개인의 T세포와 접촉할 기회가 있는 신체의 어느 부위에 투여하는 것이 선호된다. 항원제시세포가 투여되는 지점은 개인의 적합한 T세포와 접촉할 수 있고, 활성화시킬 수 있는 신체의 어느 부위에 항원제시세포를 투여하는 것이 선호된다.

전달요법

[0212] 웹티드/폴리뉴클레오티드/세포(다수의 웹티드를 포함하는 조성물처럼)의 투여는 상기에 명시한 것처럼 어느 적합한 방법에 의해 행해진다. 웹티드의 적합한 양은 경험적으로 그러나 일반적으로 하기에 주어진 범위내에서 결정된다. 각 웹티드의 1회성투여는 환자에게 유익한 영향을 끼치기에 충분하다. 그러나 웹티드가 1회 이상 투여된다면 유익할 수 있다는 점이 이해될 것이다. 이 경우 일반적인 투여요법은 예를 들어 6개월마다 2~4주동안 1주에 1~2회, 또는 4~6개월마다 일주일동안 하루에 한번이다. 이해된 대로 각 웹티드, 폴리뉴클레오티드, 웹티드와 폴리뉴클레오티드의 결합은 환자에게 단독으로 아니면 결합하여 투여된다.

[0213] 투여량은 조성물의 상태, 투여의 경로 그리고 투여요법의 계획이나 시간을 포함하는 많은 요소들에 따라 달라진다. 본 발명의 분자의 적합한 양은 투여할 때마다 15 μ g까지, 20 μ g까지, 25 μ g까지, 30 μ g까지, 50 μ g까지, 100 μ g까지, 500 μ g까지 또는 그 이상까지 순서이다. 적합한 양은 15 μ g이지만 적어도 1ng, 적어도 2ng, 적어도 5ng, 적어도 50ng, 적어도 100ng, 적어도 500ng, 적어도 1g, 적어도 10g이다. 본 발명의 분자들에 대하여 사용된 양은 예를 들어 1mg까지, 2mg까지, 3mg까지, 4mg까지, 5mg까지 또는 그 이상까지 높아진다. 이 양은 선택된 경로에 의해 투여하기 위한 적합한 양을 허용하는 농도의 액체 제제로 제공된다.

[0214] **키트**

본 발명은 키트 형태로 용기에 담겨 포장된, 본 발명의 치료에 사용하기 적합하다고 여기에 명시된 요소의 조성과 관련이 있다. 이 키트는 본 발명의 치료를 허용하는 일련의 요소를 구성한다. 예를 들어 키트는 본 발명의 하나 이상의 다른 웨티드, 폴리뉴클레오티드, 세포, 또는 본 발명의 하나 이상의 웨티드, 폴리뉴클레오티드, 세포 그리고 하나 이상의 추가적인, 동시에 투여하기에 적합한 아니면 순차적이거나 분리된 투여에 적합한 치료물질을 구성한다. 키트는 선택적으로 다른 적합한 시약 또는 설명과 기타 같은 종류의 것을 포함한다.

[0216] 본 발명은 하기 실시예에 의해 설명된다:

[0217] **실시예1**

[0218] **MHC class II 결합조사**

이 연구의 목적은 8개의 가장 일반적인 인간 MHC class II HLA-DRB1* 알로타입에 강한 친화력을 가진 웨티드의 뚜렷한 패널을 확인하기 위함이다. 주요 자작나무 알레르기항원 Bet v1, Bet v2, Bet v3, Bet v4, Bet v6에 결합하는 웨티드를 확인하기 위하여 상업적으로 허용가능한 EpiMatrix 알고리즘(EpiVax 주식회사)을 이용하여 인 실리코적 접근이 수행되었다. 이는 MHC class II HLA-DR분자의 결합 홈 내부에 수용될 가능성이 있는 염기서열로부터 만들어진 웨티드의 생명정보학 분석연구이다.

EpiMatrix는 어떤 폴리웨티드 서열에서 8개 아미노산씩 오버랩핑하면서 각기 선택된 MHC분자에 결합할 가능성을 계산하여 9개 아미노산 잔기서열의 등급을 매기는 매트릭스에 기초한 알고리즈다(De Groot et al., AIDS Research and Human Retroviruses 13:539-41(1997)). 개발되는 매트릭스 모디프의 절차는 Schafer et al., Vaccine 16:1880-4(1998)에서 발표되었다. 이 예에서 HLA DR1, DR3, DR4, DR7, DR8, DR11, DR13, DR15에 결합 가능성이 평가되었다. 추정상의 MHC리간드는 단백질 염기서열에서 각 9량체 프레임을 스코어링함으로써 선택되었다. 이 스코어는 각 MHC대립인자에 결합한다고 알려진 아미노산 염기서열의 매트릭스에 9량체의 염기서열을 비교하는 데서 나왔다. 소급적용되는 연구는 EpiMatrix가 발표된 MHC리간드를 정확하게 예측함을 증명하였다 (Jesdale et al., in Vaccine '97(Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y.,(1997))). 여러 MHC분자에 결합하는 웨티드의 성공적인 예측이 사실로 확인되었다.

[0221] 각 알레르기항원에 대한 EpiMatrix자료는 하기과 같이 표시된다:

[0222] 각 대립인자와 8개의 대립인자의 히트개수의 결합(Z)점수와 9량체 웨티드자료를 오버랩핑함으로써(상위 5%의 예상 결합제에 동등하거나 그보다 더 큰 Z점수):또는

[0223] 데이터베이스의 여러 염기서열을 분석한 것으로부터 도출된 데이터가 단백질의 모든 변종에 대한 결합의 개요를 제공하기 위해 "모이게"된다는 클러스터 리포트로써.

[0224] "EpiMatrix 히트"는 그 염기서열 내에 8개 대립인자에 대한 높은 예측 Z 결합점수를 나타내는 반면에 "EpiMatrix 클러스터 스코어"는 클러스터 길이에 대하여 정상화된 히트의 개수로부터 파생되었다. 그러므로 클러스터 스코어는 무작위의 웨티드 기준에 관련지어 MHC결합하는 특성의 합계에서 초과량 또는 부족량이다. 10¹⁰ 상의 클러스터 스코어는 넓은 MHC 결합특성을 나타내는 것으로 간주된다.

[0225] EpiMatirx 분석은 Bet v1의 이소폼으로 알려진 전체염기서열 위에서 수행되었고, 아래 리스트는 그에 상응하는 NCBI 검색번호이다.

[0226] Bet v1 L P43185; Bet v1 E P43178;

[0227] Bet v1 M/N P43186; Bet v1 D/H P43177;

[0228] Bet v1 K P43184; Bet v1 C P43176;

[0229] Bet v1 J P43183; Bet v1 B P45431;

[0230] Bet v1 G P43180; Bet v1 A P15494;

[0231] Bet v1 F/I P43179;

[0232] EpiMatrix분석은 또한 [표2]에서 검색번호에 의해 색인이 있는 추가의 잘 알려진 Bet v1 염기서열에서 수행되었다.

[0233] 이 분석들은 주요 펩티드(그리고 그것의 주변 염기서열)가 좋은 MHC classII 결합을 하는 것으로 예측되는 상기의 염기서열로부터 파생되었음을 확인했다. 이 염기서열들이 하기 표 1과 2에 표시된다. 표시된 대로 확인된 많은 펩티드들이 다양한 Bet v1 이소폼들 사이에서 매우 보존되어있다.

[0234] 표1과 2에서:

[0235] “주요 염기서열의 잔기들”은 분석된 염기서열 내에서 펩티드의 위치를 말해준다. 주요 펩티드(굵게 강조된 중간의 아미노산)는 분석 중에 확인되었던 실제의 결합 염기서열을 정의한다. 측면(N말단과 C말단, 굵은 글씨 아님)을 안정시키는 것은 주요 염기서열을 이용하는데 포함되고 일반적으로 펩티드의 제조를 돋는데 필요하다. “히트의 숫자”는 염기서열 내 테스트된 모든 MHC타입과의 결합 친화력이 높게 예측된 숫자를 나타낸다. “EpiMatrix 클러스터 스코어”는 클러스터의 길이를 정상화하는 히트의 숫자로부터 파생되었다. 그러므로 클러스터 스코어는 무작위의 펩티드 표준과 상대적인 MHC 결합특성의 예측된 합계에서 초과량 또는 부족량이다. 10이상의 스코어(score)는 넓은 MHC결합 특성을 나타낸다고 간주된다.

[0236] 표 1-Bet v1

임력 서열	서열내 잔기들 (플랭크포함)	염기 서열	소수성	EpiMatrix 히트 (플랭크 불포함)	EpiMatrix 클러스터 스코어 (플랭크 불포함)	펩티드 ID 번호	서열 ID 번호
P43185	<u>13 - 28</u>	VIPAAARMFKAFI L DGD	0.78	6	11.3	P1	1
P15494	<u>100 - 114</u>	SNEIKIVATPDGGSI	0.03	7	15.57	P2	2
P43176	<u>100 - 114</u>	CNEIKIVATPDGGSI	0.25	7	15.57	P3	3
P43177	<u>100 - 114</u>	SNEIKIVATPDGGCV	0.23	7	15.57	P4	4
P43178	<u>100 - 116</u>	SNEIKIVATPNGGSILK	0.02	10	20.13	P5	5
P43179	<u>100 - 116</u>	SNEIKIVATPNNGSILK	0.02	10	20.13	P6	
P43180	<u>100 - 114</u>	SNEIKIVATPDGGCV	0.23	7	15.57	P7	
P43183	<u>100 - 116</u>	SNEIKIVATPNNGSILK	0.02	10	20.13	P8	
P43184	<u>100 - 114</u>	CNEIKIVATPDGGSI	0.25	7	15.57	P9	
P43185	<u>100 - 114</u>	SNEIKIVATPDGGCV	0.23	7	15.57	P10	
P43186	<u>100 - 114</u>	CNEIKIVATPDGGSI	0.25	7	15.57	P11	
P45431	<u>100 - 114</u>	CNEIKIVATPDGGSI	0.25	7	15.57	P12	
P43178	<u>112 - 126</u>	GSILKINNNKYHTKGD	-1.08	6	12.34	P13	
P43179	<u>112 - 126</u>	GSILKINNNKYHTKGD	-1.08	6	12.34	P14	
P43183	<u>112 - 126</u>	GSILKINNNKYHTKGD	-1.08	6	12.34	P15	
P15494	<u>142 - 160</u>	ETLLRAVESYLLAHSDAYN	-0.09	8	12.06	P16	6
P43176	<u>142 - 160</u>	EALLRAVESYLLAHSDAYN	0.04	8	12.06	P17	7
P43177	<u>142 - 160</u>	ETLLRAVESYLLAHSDAYN	-0.09	8	12.06	P18	
P43178	<u>142 - 160</u>	ETLLRAVESYLLAHSDAYN	-0.09	8	12.06	P19	
P43179	<u>142 - 160</u>	ETLLRAVESYLLAHSDAYN	-0.09	8	12.06	P20	
P43180	<u>142 - 160</u>	ETLLRAVESYLLAHSDAYN	-0.09	8	12.06	P21	
P43183	<u>142 - 160</u>	ETLLRAVESYLLAHSDAYN	-0.09	8	12.06	P22	
P43184	<u>142 - 160</u>	EALLRAVESYLLAHSDAYN	0.04	8	12.06	P23	
P43185	<u>142 - 160</u>	ETLLRAVESYLLAHSDAYN	-0.09	8	12.06	P24	
P43186	<u>142 - 160</u>	EALLRAVESYLLAHSDAYN	0.04	8	12.06	P25	
P45431	<u>142 - 160</u>	EALLRAVESYLLAHSDAYN	0.04	8	12.06	P26	

[0237]

[0238] <표 1A>

[0239] EpiMatrix분석 Bet v1 염기서열 P15494는 여러 HLA DR대립인자 결합부위를 예측했다: FNYETETTSVIPAARLFKAFLDGDNLF(4-31).

프레임 시작	AA 염기서열	프레임 정지	DRB1*01 01 Z-Score	DRB1*03 01 Z-Score	DRB1*04 01 Z-Score	DRB1*07 01 Z-Score	DRB1*08 01 Z-Score	DRB1*11 01 Z-Score	DRB1*13 01 Z-Score	DRB1*15 01 Z-Score	히트
4	FNYETETTS	12	.96	1.29	1.58	-.42	.10	.93	-.21	.27	0
5	NYETETTSV	13	.32	-.86	.59	.81	-1.32	-.80	-.75	.22	0
6	YETETTSVI	14	2.15	1.37	2.25	1.72	1.09	1.15	-.03	.70	3
7	ETETTSVIP	15	-.11	-1.34	.48	.58	-.89	-.60	-.84	-.03	0
8	TETTSVIPA	16	.16	-1.10	.97	.51	-.86	-.69	-.48	.04	0
9	ETTSVIPAA	17	-.04	.16	.64	-.18	-.89	.43	-.39	-.17	0
10	TTSVIPAAR	18	.64	.66	-.12	-.56	.14	.47	.50	-.43	0
11	TSVIPAARL	19	1.52	-.44	.23	.47	-.63	.28	-.96	-.33	0
12	SVIPAARLF	20	.69	-.06	-.07	1.07	-.44	.25	1.05	-.20	0
13	VIPAARLFK	21	.67	2.00	.65	.50	1.21	1.32	1.98	1.21	2
14	IPAARLFKA	22	.55	1.17	.00	-.28	.32	.16	1.27	1.60	0
15	PAARLFKAF	23	-1.29	-1.65	-1.57	.28	-.29	-.88	-.32	-.58	0
16	AARLFKAFT	24	1.13	1.39	-.25	-.68	1.25	1.50	1.32	-.06	0
17	ARLFKAFTL	25	2.12	.89	.25	1.84	1.11	.18	1.54		3
18	RLFKAFILD	26	-1.54	-.90	-1.35	-.86	1.38	-1.29	-.38	-.67	0
19	LFKAFILDG	27	.86	1.13	1.48	.68	.94	.39	1.14	1.37	0
20	FKAFILDGD	28	-.17	.58	.09	-.43	1.90	.24	.30	.96	1
21	KAFILDGDN	29	-.49	-1.35	-.67	-.69	-.59	-.02	-2.05	.29	0
22	AFILDGDNL	30	1.32	-.28	-.21	.67	-.85	-.69	-.80	.30	0
23	FILDGDNLF	31	-.02	2.27	1.73	1.07	.47	-.09	-.22	.74	2

[0240]

표 2-Bet v1

일력 서열	서열내 잔기들 (플랭크포함)	염기 서열	소수성	EpiMatrix 히트 (플랭크 불포함)	EpiMatrix 클러스터 스코어 (플랭크 불포함)	펩티드 ID 번호	서열 ID 번호
CAA04829	1 - 16	GVFNYEIGATSVI PAA	0.84	7	11.23	P27	8
2122374C	14 - 34	IAPARLFKSFVLDADNLIPKV	0.62	9	13.67	P28	9
ABC41588	97 - 111	CNEIKLVATPDGGST	-0.15	7	15.45	P29	10
ABC41605	97 - 111	SKEIKIAAAPDGGSII	0.01	6	13.05	P30	11
ABC41615	97 - 111	SNEIKIVATEPDGGCI	0.25	7	15.57	P31	12
ABC41617	97 - 111	CNEIKLVATPDGGSI	0.20	7	15.45	P32	13
ABC41596	97 - 113	CNEIKIVAAPGGGSILK	0.54	9	17.42	P33	14
ABC41602	97 - 113	CNEIKIVPAPGGGSILK	0.34	9	16.98	P34	15
ABC41609	97 - 113	SYEIKIVAAPGGGSILK	0.48	9	17.42	P35	16
1QMR_A	99 - 113	SNEIKIVATGDGGSI	0.11	5	10.32	P36	17
CAA96546	100 - 114	CNEIKIVAAAPDGGSII	0.41	7	14.59	P37	18
CAA96547	100 - 114	SNEIKIVATPDGRSI	-0.25	7	15.57	P38	19
CAA07324	100 - 114	SNEIKLVATPDGGSI	-0.02	7	15.45	P39	20
CAA07327	100 - 114	CNEIKIVATPDGGCV	0.45	7	15.57	P40	21
CAA07318	100 - 114	SNEIKIVTTTPDGGCV	0.06	7	15.57	P41	22
AAD26561	100 - 114	SNEIKIVATPDGGPI	-0.03	7	15.57	P42	23
ABC41589	109 - 125	GSILKIRNKYHTKGDHE	-1.41	9	15.34	P43	24
ABC41609	139 - 150	AGLFKAVENYLV	0.82	5	10.95	P44	25
ABC41583	139 - 150	ETLLRAVESYLL	0.58	6	13.44	P45	26
ABC41589	139 - 150	EALLRAVESYLL	0.78	6	13.44	P46	27
ABC41602	139 - 150	EALFRAVESYLL	0.70	7	16.84	P47	28
CAA96544	139 - 156	EKAVGLLKAVESYLLAHS	0.43	7	12.67	P48	29
CAA07319	141 - 160	GETLLRAVEGYLLAHSDAYN	-0.09	8	11.13	P49	30
AAD26561	142 - 156	ETLLRAVESYPLAHS	-0.05	6	13.44	P50	31
2122374C	142 - 160	AGLFKAVENYLVAHFNAYN	0.02	10	15.5	P51	32
CAA96539	142 - 160	ETLLRAVERYLLAHSDAYN	-0.29	10	18.69	P52	33
2122374A	142 - 160	EALFRAVESYLLAHSDAYN	-0.02	9	15.46	P53	34

[0242]

실시예2

[0243]

상기 EpiMatrix분석은 Bet v3 의 잘 알려진 이소폼의 전체 염기서열에 의해 수행되었다. 이 분석은 MHC class II

결합을 잘 하는 것으로 예측된 위의 염기서열로부터 파생된 주요 펩티드(그리고 그것의 측면 염기서열)을 확인했다. 이 염기서열은 하기 [표3]에 표시하였다. [표3]의 제목과 노트는 상기 [표1]의 경우와 같다.

[0245] 표 3- Bet v3

입력 서열	서열내 잔기들 (플랭크포함)	염기 서열	소수성	EpiMatrix 히트 (플랭크 불포함)	EpiMatrix 클러스터 스코어 (플랭크 불포함)	펩티드 ID 번호	서열 ID 번호
P43187	188 - 205	VDFFEFKDMMRSVLVRSS	0.16	10	14.02	P54	35

[0246] [0247] P43187의 잔기 80~94의 염기서열, TVKSFTREGNIGLQF(펩티드ID NO: P55, 서열 ID NO: 36)도 MHC class II 결합을 잘 하는 것으로 예측된다. Bet v3의 다른 자작나무 알레르기 항원 염기서열의 추가적인 인실리코분석은 여기에 표시된다:

[0248] <표 3A>

[0249] Bet v3 염기서열 GI1168696_SPP43187의 EpiMatrix 분석은 여러 HLA DR 대립인자 결합 부위 SLNTLRLRRIFDLFDK(35-50)를 예측했다.

프레임 시작	염기 서열	끝	DRB1*01	DRB1*0	DRB1*0	DRB1*07	DRB1*08	DRB1*1	DRB1*13	DRB1*15	히트
			01 Z-Score	301 Z-Score	401 Z-Score	01 Z-Score	01 Z-Score	101 Z-Score	01 Z-Score	01 Z-Score	
35	SLNTLRLRR	43	.28	.97	-.38	.38	.64	.53	1.73	.68	1
36	LNTLRLRRI	44	1.30	.87	-.15	.46	.82	1.35	1.41	.17	0
37	NTLRLRRIF	45	-.24	.12	-1.52	.43	1.21	1.13	1.42	-.47	0
38	TLRLRRIFD	46	.47	.40	-.46	.42		.66	.49	-.34	1
39	LRLRRIFDL	47	1.09	.83	.08		1.68	.31	1.94		4
40	RLRRIFDLF	48	-1.83	-.86	-1.40	-.38	-.94	-1.34	-.63	-.87	0
41	LRRIFDLFD	49	.84	.60	1.39	.46	1.41	.88	.39	1.55	0
42	RRIFDLFDK	50	-.31	.38	-.31	-.58	.85	.33	1.05	1.61	0

[0250] [0251] 실시예3

[0252] 상기 EpiMatrix 분석은 Bet v4의 이소폼으로 알려진 전체 염기서열에서 수행되었다(NCBI 검색번호: Q39419, CAA73147). 이 분석은 MHC class II 결합을 잘 하는 것으로 예측되었던 위의 염기의 염기서열로부터 파생된 주요 펩티드(그리고 그것의 주변 염기서열)를 확인했다. 이 염기서열은 하기 [표4]에 표시된다. [표4]의 제목과 노트는 [표1]의 것과 같다.

[0253] 표 4- Bet v4

입력 서열	서열내 잔기들 (플랭크 포함)	염기 서열	소수성	EpiMatrix 히트 (플랭크 불포함)	EpiMatrix 클러스터 스코어 (플랭크 불포함)	펩티드 ID 번호	서열 ID 번호
Q39419	10 - 27	AERERIFKRFKDANGDGKI	-1.19	8	13.83	P56	37
Q39419	67 - 81	FTDFGRANRGLLKDV	-0.38	7	13.49	P57	38
CAA73147	67 - 81	FTDFARANRGLLKDV	-0.23	7	13.53	P58	39

[0254] [0255] 실시예4

[0256] 상기 EpiMatrix 분석은 Bet v6의 이소폼으로 알려진 전체 염기서열에서 수행되었다(NCBI 검색번호: O65002). ♂

분석은 MHC classII 결합을 잘 하는 것으로 예측되었던 위의 염기의 염기서열로부터 파생된 주요 펩티드(그리고 그것의 주변 염기서열)를 확인했다. 이 염기서열은 하기 [표5]에 표시된다. [표5]의 제목과 노트는 [표1]의 것과 같다.

[0257] 표 5- Bet v6

입력 서열	서열내 잔기들 (플랭크 포함)	염기 서열	소수성	EpiMatrix 히트 (플랭크 불포함)	EpiMatrix 클러스터 스코어 (플랭크 불포함)	펩티드 ID 번호	서열 ID 번호
065002	43 - 63	PVKGKLVEKFKGLGVTLHGD	0.04	9	14.09	P59	40
065002	67 - 90	HESLVKAFKQVDVVVISTVGHLQLA	0.52	11	15.54	P60	41
065002	149 - 170	YVSSNFFAGYFLPTLAQPGLTS	0.46	10	12.92	P61	42
065002	258 - 274	PINVILAINHSVVFVKGD	0.83	7	10.54	P62	43

[0258]

실시예5

[0260] 상기 EpiMatrix 분석은 Bet v7의 이소폼으로 알려진 전체 염기서열에서 수행되었다(NCBI 검색번호: CAC84116). 이 분석은 MHC classII 결합을 잘 하는 것으로 예측되었던 위의 염기의 염기서열로부터 파생된 주요 펩티드(그리고 그것의 주변 염기서열)를 확인했다. 이 염기서열은 하기 [표6]에 표시된다. [표6]의 제목과 노트는 [표1]의 것과 같다.

[0261] 표 6-Bet v7

입력 서열	서열내 잔기들 (플랭크 포함)	염기 서열	소수성	EpiMatrix 히트 (플랭크 불포함)	EpiMatrix 클러스터 스코어 (플랭크 불포함)	펩티드 ID 번호	서열 ID 번호
CAC84116	34 - 48	AENFRALCTGEKGNG	-0.77	5	10.46	P63	44

[0262]

[0263] 실시예5A

[0264] Bet v2의 다른 자작나무 알레르기항원 염기서열의 추가적인 인실리코분석이 여기에 표시된다:

<표 6A>

[0266] EpiMatrix 분석 Bet v2 염기서열 GI1942360_PDB1CQA는 여러 HLA DR대립인자 결합부위를 예측했다: SVWAQSSSFPQFKPQEITGIMK(33-54)

프레임 시작	염기서열	끝	DRB1*01 01 Z-Score	DRB1*0 301 Z-Score	DRB1*0 401 Z-Score	DRB1*07 01 Z-Score	DRB1*08 01 Z-Score	DRB1*1 101 Z-Score	DRB1*13 01 Z-Score	DRB1*15 01 Z-Score	히트
33	SVWAQSSSF	41	.75	.40	1.04	1.19	-.29	-.22	-.17	.71	0
34	VWAQSSFP	42	.90	.82	1.31	.46	-.02	.21	.64	1.01	0
35	WAQSSSFPQ	43	1.70	.36	2.24		1.23	1.44	.12	1.53	3
36	AQSSSFPQF	44	-.65	.38	-.28	-.01	-1.26	-.18	-.18	-.56	0
37	QSSFPQFK	45	-.31	.01	.24	.04	-1.01	.00	-1.52	-.51	0
38	SSFPQFKP	46	-.45	-.73	-1.50	-1.02	-.04	-.76	-.02	.21	0
39	SSFPQFKPQ	47	-.10	-2.37	-.57	.24	-.52	-.64	-1.22	-.98	0
40	SFPQFKPQE	48	-.23	1.11	-.75	-1.69	1.34	.47	1.32	-.32	0
41	FPQFKPQEI	49	1.55	.73	.67	.99	.88	.49	.09	2.02	1
42	PQFKPQEIT	50	-.26	.27	-.85	.12	1.00	.28	.59	-.60	0
43	QFKPQEITG	51	-1.28	-.42	-.84	-.60	-.27	-1.13	.23	.00	0
44	FKPQEITGI	52	1.94	1.68	1.69	1.76	.07	.45	1.37	1.43	4
45	KPQEITGIM	53	.15	.15	.32	.12	-.39	.10	-1.15	-.26	0
46	PQEITGIMK	54	-.06	-1.11	-.06	-.24	-1.55	-.85	-1.48	-.15	0

[0267]

<표 6B>

[0268]

EpiMatrix분석 Bet v2 염기서열 GI1942360_PDB1CQA는 여러 HLA DR대립인자 결합부위를 예측했다: IKYMIQGEAGAVIRGKKGS GG(72-93)

프레임 시작	염기서열	끝	DRB1*01 01 Z-Score	DRB1*0 301 Z-Score	DRB1*0 401 Z-Score	DRB1*07 01 Z-Score	DRB1*08 01 Z-Score	DRB1*1 101 Z-Score	DRB1*13 01 Z-Score	DRB1*15 01 Z-Score	히트
72	IKYMIQGE	80	1.21	1.60	1.25	.49	1.87	1.30	-.52	.97	1
73	KYMIQGEA	81	.45	.63	-.35	.37	.56	1.73	.28	.53	1
74	YMIQGEAG	82	1.68	.22	1.47	.98	.61	1.06	-.37	.26	1
75	MVIQGEAGA	83	1.49	2.23	1.51	-.42	1.07	1.87	2.27	.85	3
76	VIQGEAGAV	84	1.12	1.46	-.18	1.12	-.11	.16	-.07	2.02	1
77	IQGEAGAVI	85		1.64	1.28	.54	.46	.67	.50	.86	1
78	QGEAGAVI	86	.56	.61	-.43	-.01	-.68	-1.08	.29	.12	0
79	GEAGAVIRG	87	.02	.36	.41	-.45	-.52	-1.38	-.79	.28	0
80	EAGAVIRGK	88	-.12	-.55	.17	-.08	-.44	.08	-.23	-1.21	0
81	AGAVIRGKK	89	-.65	.95	-1.14	.00	.75	1.71	.58	.53	1
82	GAVIRGKKG	90	.82	-1.39	-.20	-.20	-.70	-.26	-1.31	.08	0
83	AVIRGKKGS	91	-.08	.16	-.55	-.21	1.97	1.49	1.43	1.07	1
84	VIRGKKGS	92	.10		-.64	-.90	1.35	1.18	.92	1.79	2
85	IRGKKGS GG	93	1.18	1.05	.64	.02	2.09	.95	1.11	1.83	2

[0270]

실시예6

[0271]

실시예1~5A에서 수행된 분석들에 근거하여, 표7에서 표시된 하기 펩티드들은 그 다음의 분석시험에서 검사를 위해 설계되었다. 설계과정은 용해도와 다른 물리화학적 특성을 강화시키기 위한 순수 염기서열의 변형을 포함했다. 예를 들어 Bir12A에 대하여 모체의 62-77R의 잔기는 모체 염기서열의 66-77잔기에 상응하고 용해도를 향상시키기 위해 C말단에 R잔기를 추가한 Bir12A의 염기서열을 나타낸다. 이와 유사하게, Bir01F, G, H, I에 대하여 모체의 4-18K잔기는 모체 염기서열의 4-18 잔기에 상응하고 용해도를 향상시키기 위해 C 말단에 K잔기를 추가한 염기서열을 나타낸다.

[0273]

<표 7>

펩티드	염기 서열	잔기들	서열 ID 번호
BIR01F	FNYEITEATSVIPAARK	4-18K (P43185) Bet v1	45
BIR01G	FNYEIEATSVIPAARK	4-18K (P43179) Bet v1	46
BIR01H	FNYEIEETTSVIPAARK	4-18K (P43177) Bet v1	47
BIR01I	FNYEETTSVIPAARK	4-18K (P15494) Bet v1	48
BIR02D	PAARMFKAFILDGDKLVPK	15-33(P43185) Bet v1	49
BIR02E	PAARLFKAFILEGDLTIPK	15-33 (P43184) Bet v1	50
BIR02G	PAARLFKAFILEGDNLTIPK	15-33 (P41380) Bet v1	51
BIR02I	PAARMFKAFILD	15-26 (P41385) Bet v1	52
BIR02J	PAARMFKAFILEGDKLVPK	D to E variant of BIR02D	53
BIR04	PGTIKKISFPEGFPKYV	51-68 (P43185) Bet v1	54
BIR05	SPFKYVKERVDEVVDHA	63-78 (P43186) Bet v1	55
BIR05A	FPFKYVKDRVDEVVDHT	63-78 (P43185) Bet v1	56
BIR06	ANFKYSYSMIEGGALGD	78-94(P43186) Bet v1	57
BIR06B	TNFKYSYSVIEGGPVGD	78-94 (P43183) Bet v1	58
BIR06D	TNFKYNYSVIEGGPIG	78-93 (P) Bet v1	59
BIR07	SNEIKIVATPDGGSILK	100-116 Bet v1	60
BIR07A	SNEIKIVATPNGGSILK	100-116 Bet v1	61
BIR07B	SNEIKIVATPQGGSILK	100-116 Bet v1	62
BIR07C	SNEIKIVATPEGGSILK	100-116 Bet v1	63
BIR07D	SNEIKIVATPGGGSILK	100-116 Bet v1	64
BIR08	GSILKINNKYHTKGD	112-126 Bet v1	65
BIR08A	SILKISNKYHTKGD	113-125 (P43186) Bet v1	66
BIR09	ETLLRAVESYLLAHSDAY	142-159 Bet v1	67
BIR09A	GETLLRAVESYLLAHS	141-156 Bet v1	68
BIR09B	KEMGETLLRAVESYLLAHS	138-156 Bet v1	69
BIR09C	KEKGETLLRAVESYLLAHS	M to K variant of above	70
BIR10	GSQLAQSSSFQPK	33-45 (P25816) Bet v2	71
BIR11	FPQFKPQEITGIMK	41-54 (AAB44348) Bet v2	72
BIR12A	PTGMFVAGAKYMV1QGR	62-77R (P35079) Ph1 p12	73
BIR12B	AKYMV1QGEPEGRVIRGK	70-86 (P35079) Ph1 p12	74
BIR13	GIKYMVIQGEAGAVIRGK	71-88 (AAB44348) Bet v2	75
BIR14	EAGAVIRGKKKGSGGIT	80-95 (P25816) Bet v2	76
BIR15	SLNTLRLRRIFDLFDTK	35-50 Bet v3	77
BIR16A	AERERIFKRFKDANGEGK	10-26 D to E variant Bet v4	78
BIR16B	AERERIFKRFDAGGEKG	N to G variant of above	79
BIR17	VKGKLVEKFKGGLGVTLHNG	44-62 Bet v6	80

[0274]

실시예7

[0275]

인비트로(in vitro) 결합 분석 연구

[0276]

주 조직적합 복합체 분자(MHC)클래스 II에 잠재적으로 결합한다고 확인된 펩티드는 수용성, 산성인 환경에서의 용해도에 대해 사전에 검사되었고, 펩티드는 인비트로 MHC class II 결합분석시험에서 테스트되었다.

[0277]

방법

[0278]

이용된 분석방법은 경쟁적 MHC class II 결합분석시험으로, 여기에서 각 펩티드는 조사된 각각의 인간 MHC 클래스II 알로타입으로부터 알려진 컨트롤 바인더 (control binder)를 치환하는 능력을 분석한다. 이 연구에서 이용된 알로타입과 컨트롤 펩티드는 일반적으로 하기와 같이 표시된다.

[0279]

인비트로 결합분석에서 이용된 컨트롤 펩티드

알로타입	대조군 펩티드	염기서열
DRB1*0301	Myco. tuberculosis/leprae hsp 65 2-16	AKTIAYDEEARRGLE
DRB1*1101	Influenza haemagglutinin 307-319	PKYVKQNTLKLAT
DRB1*1501	Human myelin basic protein 85-99	ENPVVHFFKNIVTPR

[0280]

표1~7의 각 펩티드는 경쟁분석에서 분석되고 컨트롤 펩티드와 비교하여 상대적인 결합이 검사되었다. 경쟁적 분

석의 특성 때문에 각 펩티드의 데이터는 컨트롤 펩티드에 대한 자신의 억제 중간값(half maximal inhibitory concentration; IC₅₀) 비율로 결정된다. 컨트롤 펩티드에 동등한 억제 중간값(IC₅₀)을 가지는 펩티드는 동일한 결합친화력을 가지는 반면에, 그 비율 이하의 펩티드는 높은 친화력을 가지고 그 비율 이상의 펩티드는 낮은 친화력을 가진다.

[0283] 수용액에서 용해도는 효과적인 치료물질이 될 펩티드로서 필수적인 기준이다. 그러므로 용해도 검사의 결과로서 여러 결합의 소수성이 강한 아미노산 잔기의 높은 빈도를 가진 소수성 펩티드가 제외될 것이다. 이것은 하나 이상과 결합하는 HLA-DRB1* 바인더의 특징이다. 하나 이상의 MHC class II 알로타입에 결합하는 펩티드가 확인된다. 이러한 펩티드가 주 조직적 복합체 분자(MHC)구조의 상동관계를 통해 테스트되지 않았던 유사한 알로타입에 결합하는 능력이 있을 거라고 예상된다.

실시예8

[0285] 다음의 방법은 실시예7의 동일한 펩티드에 적용된다.

세포증식 분석

[0287] 세포증식 실험은 말초혈단핵세포(PBMC's)(140×10^6 의 세포가 테스트되기 위한 파라미터로서 필요하다)에 수행된다. 증식은 방사선 동위원소 3중수소-티미딘의 결합에 의해 측정된다. 더 자세히는 $100\mu\text{l}$ 의 적합한 항원 또는 펩티드 농축을 96 웰 플레이트의 적합한 웰에 분배한다. 그다음에 플레이트는 5% CO₂를 포함하는 가습 인큐베이터(humidified 5% CO₂ incubator)에 넣어 37°C에서 최대 4시간동안 놓아둔다. 위에 명시한 대로 단일 말초혈단핵세포는 상온의 완전배지에서 2×10^6 세포/ml농도로 준비된다. 그 다음에 세포수용액 $100\mu\text{l}$ 가 항원/펩티드를 포함하는 96 웰 플레이트의 각 웰 속으로 분배된다. 그 다음에 플레이트는 6~8일 동안 배양된다. 배양액에는 $10\mu\text{l}$ 3중수소-티미딘 농축액을 각 웰에 추가함으로써 삼중수소 티미딘이 더해진다. 그 다음에 플레이트는 인큐베이터로 돌아가서 8~16시간동안 놓아둔다. 그 다음에 배양액이 세포수집기를 이용해 수집된다. 전조된 필터 매트(dried filter mat)는 적합한 베타 신틸레이션 카운터(beta scintillation counter)를 이용하여 센다.

[0288] 펩티드를 포함하는 웰의 계산은 배지만 포함하는 웰과 통계상으로 비교된다. 한도가 없는 맨-휘트니 검정(Mann-Whitney test)이 이용된다. 같은 통계적인 실험이 모든 피험자를 위해 이용된다. 배지만 있는 웰과 펩티드로 유도한 웰의 중요한 통계적 차이는 펩티드에 의한 말초혈단핵세포의 긍정적인 자극으로써 간주된다.

사이토카인 방출 분석시험

[0290] 36개 펩티드는 작은 크기(대략 1회크기 10mg, 비GMP)로 제조되었다. 각 펩티드의 순도는 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)로 검사한 결과 적어도 95%였다. 펩티드와 컨트롤(음성 컨트롤은 배지이고 양성 컨트롤은 포도상균 장독소 B 25ng/ml와 전체의 자작나무 알레르기항원 추출물 100μg/ml)을 포함하는 96 웰 컬처 플레이트는 미리 준비되어 -20°C에 실험 전날 보관되었다. 200mg/ml농도의 펩티드를 포함하는 부피 $100\mu\text{l}$ 의 웰에 펩티드가 추가되었다. 그 $100\mu\text{l}$ 세포의 다음번의 추가는 100mg/ml의 최종 실험농도를 만들어냈다.

[0291] 말초혈액단핵세포(PBMCs)는 밀도기울기 원심분리에 의해 혜파린처리된 혈액으로부터 격리되었다. 그 다음에 5×10^6 세포/ml PBMC 부유액 중의 $100\mu\text{l}$ 의 부분표본은 각 웰에 더해지고 플레이트들은 5% CO²를 포함하는 가습 인큐베이터 37°C에 5일동안 놓아두었다. 자극 다음으로, 배양 상청액($100\mu\text{l}$)이 다중비드분석에 의해 테스트됨으로써 수집되었다.

[0292] 다중 사이토카인비드분석(인터루킨 10(IL-10), IL-13, 인터페론 감마 (IFN-g))이 제조사의 지시에 따라 해동한 배양 상청액에 수행되었다. 각 배양 상청액 샘플에 대한 단일 측정이 수행되었다. 다중분석이 완료한 후 개개의 사이토카인 레벨은 분석에서 생긴 표준곡선으로부터 보간함(interpolation)으로써 결정되었다. 양성결과는 IL-13과 IFN-g분석에서 $100\text{pg}/\mu\text{l}$ 이상의 값이 나오거나 IL-10분석에 대해 기본값의 4배가 넘는 값이 나올 때이다. 테스트한 47개의 자작나무 알레르기기에 걸린 피험자 중에서 응답자의 수는 펩티드마다 3개 사이토카인으로 계산되었다. 인터루킨 13 (IL-13)이나 IFN-g의 결과는 표9에 요약되어 있다.

[0293]

<표 8>

[0294]

%응답자는 각 웨티드가 인터루킨 13(IL-13)이나 인터페론(IFN)-g을 상기 100pg/ μ l한계점으로 유도한 피험자의 비율을 나타낸다.

웨티드	%피험자	웨티드	%피험자
Bir02J	48	Bir15	27
Bir01I	42	Bir16B	27
Bir01F	38	Bir01H	25
Bir12B	38	Bir06D	25
Bir01G	33	Bir07B	25
Bir04	33	Bir07D	25
Bir09	33	Bir10	25
Bir02E	31	Bir14	25
Bir02G	31	Bir17	25
Bir02I	31	Bir05A	23
Bir07	31	Bir06	23
Bir07C	31	Bir07A	23
Bir09A	31	Bir13	23
Bir09B	31	Bir06B	19
Bir11	31	Bir08A	19
Bir16A	31	Bir05	17
Bir02D	29	Bir08	17
Bir09C	27	Bir12A	17

[0295]

높은 비율의 피험자 중 양성 반응을 유도한 웨티드는 백신에 포함시키기에 바람직하다. 표시한 대로 가장 성취가 높은 웨티드는 Bir02J, Bir01I, Bir12B였다. 백신의 중요성은 이상적으로 이 웨티드들을 포함해야 한다는 것이다. 두 번째로 성취가 높은 웨티드는 Bir02J, Bir1I, Bir12B의 주요 혼합물에 추가된 Bir04와 Bir09였다. 세 번째로 성취가 높은 웨티드는 Bir07, Bir07C, Bir1I, Bir16A였다. 이 그룹에서 추가되는 웨티드는 범위를 더 증가시키기 위해 백신 혼합물에 더하여진다. Bir15는 네 번째로 성취가 높은 웨티드였고 또한 백신 혼합물에 추가되었다. 다양한 종류의 다른 웨티드에 관하여 선호의 순서대로 Bir01F, 01G, 01H는 Bir01I의 유용한 변종이다; Bir02E, 02G, 02I, 끝으로 02D는 Bir02J의 유용한 변종이다; Bir09A, 09B, 끝으로 09C는 Bir09의 유용한 변종이다; 그리고 Bir16B는 Bir16A의 유용한 변종이다. 그러므로 가능한한 선호하는 혼합은 Bir02J, Bir01I, Bir12B, Bir04, Bir09, Bir07C, 그리고 Bir16A를 포함한다. Bir11과 Bir15도 또한 포함되고, 그 대신 Bir07C, Bir16A는 교체된다.

[0297]

IL-10방출에 관하여 IL-13, IFN-g생산에 관한 상기 3개 웨티드 중 하나로서 위 목록에 있는 Bir01I는 IL-10반응을 개인당 49%로 유도했다. Bir02I 역시 IL-10생산을 개인당 높은 비율(43%)로 유도했다. 강력한 IL-10 유도성 웨티드의 포함은 백신접종 후에 면역관용의 유도를 돋는다.

[0298]

실시예9- 용해도 검사

[0299]

A) 도입

[0300]

표9-1

[0301]

용해도 테스트에 포함될 자작나무 웨티드

펩티드	염기서열	몰질량 (Da)	아미노산 길이	이론상의 등전점(pI)
BIR01I	FNYETETTSVIPAARK	1825.92	16	6.14
BIR02I	PAARMFKAFILD	1378.74	12	9.18
BIR02J	PAARMFKAFILEGDKLVPK	2130.26	19	9.72
BIR04	PGTIKKISFPEGFPFKYV	2054.12	18	9.56
BIR07C	SNEIKIVATPEGCSILK	1754.98	17	5.86
BIR09	ETLLRAVESYLLAHSDAY	2050.04	18	4.65
BIR09B	KEMGETLLRAVESYLLAHS	2146.11	19	5.50
BIR12B	AKYMWVIQGEPGRVIRGK	1901.07	17	10.28
BIR16A	AERERIFKRFDANGEGK	2022.04	17	8.63

[0302]

[0303] B) 용해도 검사

[0304]

260mM 트레할로스를 포함하고 pH 3.0~7.0 범위에 걸치며 2mM 염산(HCl)에 의해 변형된 용액이 더해져서 일련의 매트릭스가 부록 2에 나타난 대로 준비되었다. 각 9개 웨티드의 용해도는 부록 1에 따라 각 매트릭스에서 평가되었다. 용해도가 초기에 성취되는 경우 그 이후에 용액으로부터 침전된 웨티드를 제외하고 적절한 양의 추가적인 매트릭스가 대략 200 μM의 용해도를 성취하기 위해 추가되었다.

[0305]

사용된 자작나무 참조 웨티드의 세부사항은 표 9-2에 나타냈다. 모든 웨티드는 Bachem AG, Bubendorf, 스위스에서 제조되었다.

[0306] 표 9-2

[0307] 자작나무 웨티드의 세부사항

펩티드	제조번호	몰질량(Da)	펩티드 순도 (%)	펩티드 함량 (%)
BIR1I	1028882	1827.03	99.2	87.1
BIR02I	1028883	1379.69	99.1	86.2
BIR02J	1028884	2131.61	97.4	84.1
BIR04	1028885	2055.45	98.1	88.3
BIR07C	1029310	1756.03	97.9	89.8
BIR09	1028886	2051.28	97.5	86.9
BIR09B	1029311	2147.48	97.3	89.4
BIR12B	1028887	1902.30	97.3	85.9
BIR16A	1028888	2023.24	98.4	88.1

[0308]

[0309] C) 결과

[0310] 검사된 용해도 결과는 아래 표 9-3에서 9-8까지 나타냈다.

[0311] 표 9-3

[0312]

2mM 염산과 260mM 트레할로스 이수화물, pH 2.65

2mM 염산			펩티드 질량 (ng) 있는 그대로	필요한 부피 (mL)	용해도 (mg/mL) 있는 그대로	용해도 (mg/mL)	용해도 (μmol/mL)
펩티드	내용	24시간 후 용해도					
BIR11	완전히 용해됨	완전히 용해됨	0.975	50	19.50	16.849	9.222
BIR021	완전히 용해됨	완전히 용해됨	1.175	50	23.50	20.075	14.550
BIR02J	완전히 용해됨	완전히 용해됨	1.180	50	23.60	19.332	9.069
BIR04	완전히 용해됨	완전히 용해됨	1.025	50	20.50	17.758	8.639
BIR07C	완전히 용해됨	완전히 용해됨	1.148	100	11.48	10.093	5.747
BIR09	완전히 용해됨 필터 잔여물	완전히 용해됨 필터 잔여물	1.147	1250	0.92	0.777	0.379
BIR09B	완전히 용해됨	완전히 용해됨	1.220	100	12.20	10.612	4.942
BIR12B	완전히 용해됨	완전히 용해됨	1.022	100	10.22	8.542	4.490
BIR16A	완전히 용해됨	완전히 용해됨	1.243	50	24.86	21.551	10.652

[0313]

표 9-4a

[0315]

10mM 구연산나트륨과 260mM 트레할로스 이수화물, pH 3.01

구연산염 완충제 pH 3.0			펩티드 질량 (ng) 있는 그대로	필요한 부피 (μL)	용해도 (mg/mL) 있는 그대로	용해도 (mg/mL)	용해도 (μmol/mL)
펩티드	내용	24시간 후 용해도					
BIR11	완전히 용해됨	완전히 용해됨	1.071	650	1.65	1.424	0.779
BIR021	완전히 용해됨	완전히 용해됨	1.112	1100	1.01	0.864	0.626
BIR02J	100mL에서 완전히 용해, 3mL에서 24시간후에 재용해됨	첨전됨, 재용해.	1.150	3000	0.38	0.314	0.147
BIR04	완전히 용해됨	완전히 용해됨	1.129	50	22.58	19.559	9.516
BIR07C	완전히 용해됨	완전히 용해됨	1.108	850	1.30	1.146	0.653
BIR09	1.5mL에서 용해되지 않음, 용해될 때까지 3mL로 희석시킴	용해되지 않음	1.111	3000	0.37	0.314	0.153
BIR09B	완전히 용해됨	완전히 용해됨	1.162	100	11.62	10.108	4.707
BIR12B	완전히 용해됨	완전히 용해됨	1.094	200	5.47	4.572	2.403
BIR16A	완전히 용해됨	완전히 용해됨	1.076	150	7.17	6.219	3.074

[0316]

표 9-4b

[0318]

10mM 구연산나트륨과 260mM 트레할로스 이수화물, pH 3.99

구연산염 완충제 pH 4.0			펩티드 질량 (ng) 있는 그대로	필요한 부피 (μL)	용해도 (mg/mL) 있는 그대로	용해도 (mg/mL)	용해도 (μmol/mL)
펩티드	내용	24시간 후 용해도					
BIR11	완전히 용해됨	완전히 용해됨	1.026	450	2.28	1.970	1.078
BIR021	탁한 용액 속에 띠있는 물질 있음	용해되지 않음	1.051	3000	0.35	0.299	0.217
BIR02J	150mL에서 완전히 용해됨 3mL에서 24시간후에 용해됨	첨전됨 재용해됨	1.155	3000	0.39	0.315	0.148
BIR04	완전히 용해됨	완전히 용해됨	1.018	50	20.36	17.636	8.580
BIR07C	투명한 용액 속에 띠있는 물질 있음	투명한 용액 속에 띠있는 물질 있음	1.126	3000	0.38	0.330	0.188
BIR09	탁한 용액 속에 띠있는 물질 있음	탁한 용액 속에 띠있는 물질 있음	1.074	3000	0.36	0.303	0.148
BIR09B	완전히 용해됨	완전히 용해됨	1.140	100	11.40	9.916	4.618
BIR12B	완전히 용해됨	완전히 용해됨	1.032	100	10.32	8.626	4.534
BIR16A	완전히 용해됨	완전히 용해됨	1.123	150	7.49	6.490	3.208

[0319]

[0320]

표 9-5

[0321]

10mM 구연산나트륨과 260mM 트레할로스 이수화물, pH 5.02

구연산염 완충제 pH 5.0			펩티드 질량 (ng/mL) '있는 그대로'	필요한 부피 (μL) '있는 그대로'	용해도 (mg/mL)	용해도 (mg/mL)	용해도 (μmol/mL)
펩티드	내용	24시간 후 용해도					
BIR11	완전히 용해됨	완전히 용해됨	1.036	450	2.30	1.989	1.089
BIR021	탁한 응액속에 떠있는 물질 있음	완전히 용해됨	1.085	3000	0.36	0.309	0.224
BIR02J	150mL에서 완전히 용해됨 3mL에서 24시간 후에 재용해됨	침전됨 재용해됨	1.029	3000	0.34	0.281	0.132
BIR04	완전히 용해됨	완전히 용해됨	1.076	50	21.52	18.641	9.069
BIR07C	완전히 용해됨	완전히 용해됨	1.167	1350	0.86	0.760	0.433
BIR09	투명한 응액속에 떠있는 물질 있음	투명한 응액속에 떠있는 물질 있음	1.115	3000	0.37	0.315	0.154
BIR09B	완전히 용해됨	완전히 용해됨	1.275	100	12.75	11.091	5.165
BIR12B	완전히 용해됨	완전히 용해됨	1.167	200	5.84	4.877	2.564
BIR16A	완전히 용해됨	완전히 용해됨	1.158	50	23.16	20.077	9.923

[0322]

표 9-6

[0324]

10mM 구연산나트륨과 260mM 트레할로스 이수화물, pH 6.01

구연산염 완충제 pH 6.0			용해도 질량 (mg/m) '있는 그대로'	필요한 부피 (μL) '있는 그대로'	용해도 (mg/m)	용해도 (mg/mL)	용해도 (μmol/mL)
펩티드	내용	24시간 후 용해도					
BIR11	완전히 용해됨	완전히 용해됨	1.117	150	7.45	6.434	3.522
BIR021	뿌연 응액속에 떠있는 물질있음	뿌연 응액속에 떠있는 물질있음	1.143	3000	0.38	0.325	0.236
BIR02J	100mL에서 완전히 용해됨 3mL에서 24시간 후에 재용해됨	침전됨 재용해됨	1.172	3000	0.39	0.320	0.150
BIR04	완전히 용해됨 필터 잔해물의 증거	완전히 용해됨 필터 잔해물	1.011	100	10.11	8.758	4.261
BIR07C	350mL에서 완전히 용해됨 3mL에서 24시간 후에 재용해됨	침전됨 재용해됨	1.045	3000	0.35	0.306	0.174
BIR09	완전히 용해됨	완전히 용해됨	1.084	1050	1.03	0.875	0.426
BIR09B	완전히 용해됨	완전히 용해됨	1.230	250	4.92	4.280	1.993
BIR12B	완전히 용해됨 필터 잔해물의 증거	완전히 용해됨 필터 잔해물	1.026	450	2.28	1.906	1.002
BIR16A	완전히 용해됨	완전히 용해됨	1.293	50	25.86	22.418	11.080

[0325]

표 9-7

[0326]

[0327] 10mM 인산이수소칼륨과 260mM 트레할로스 이수화물, pH 6.03

인산 완충제 pH 6.0			펩티드 질량(ng/mL) *있는 그대로*	필요한 부피(µL)	용해도(ng/mL) *있는 그대로*	용해도(ng/mL)	용해도(µmol/mL)
펩티드	내용	24시간 후 용해도					
BIR11	완전히 용해됨	완전히 용해됨	1.107	50	22.14	19.130	10.470
BIR021	완전히 용해됨	완전히 용해됨	1.145	100	11.45	9.781	7.089
BIR021	완전히 용해됨	완전히 용해됨	1.112	100	11.12	9.109	4.273
BIR04	완전히 용해됨	완전히 용해됨	0.986	100	9.86	8.541	4.155
BIR07C	25mL에서 완전히 용해됨 3mL에서 24시간후에 재용해됨	첨전됨 재용해됨	1.245	3000	0.42	0.365	0.208
BIR09	투명한 용액속에 떠있는 물질 있음	투명한 용액속에 떠있는 물질 있음	1.037	3000	0.35	0.293	0.143
BIR09B	100mL에서 완전히 용해됨 3mL에서 24시간후에 재용해됨	첨전됨 재용해됨	1.086	3000	0.36	0.315	0.147
BIR12B	완전히 용해됨	완전히 용해됨	1.192	50	23.84	19.926	10.474
BIR16A	완전히 용해됨	완전히 용해됨	1.077	50	21.54	18.673	9.229

[0328]

표 9-8

[0330] 10mM 인산이수소칼륨과 260mM 트레할로스 이수화물, pH 7.03

인산 완충제 pH 7.0			펩티드 질량(ng/mL) *있는 그대로*	필요한 부피(µL)	용해도(ng/mL) *있는 그대로*	용해도(ng/mL)	용해도(µmol/mL)
펩티드	내용	24시간후 용해도					
BIR11	완전히 용해됨	완전히 용해됨	1.039	50	20.78	17.955	9.827
BIR021	완전히 용해됨	완전히 용해됨	1.190	100	11.90	10.163	7.368
BIR021	완전히 용해됨	완전히 용해됨	1.231	100	12.31	10.084	4.730
BIR04	완전히 용해됨	완전히 용해됨	1.075	50	21.50	18.624	9.061
BIR07C	완전히 용해됨	완전히 용해됨	1.005	150	6.70	5.890	3.354
BIR09	완전히 용해됨	완전히 용해됨	1.138	750	1.52	1.286	0.627
BIR09B	완전히 용해됨	완전히 용해됨	1.085	50	21.70	18.876	8.790
BIR12B	완전히 용해됨	완전히 용해됨	1.031	50	20.62	17.234	9.060
BIR16A	완전히 용해됨	완전히 용해됨	1.099	50	21.98	19.055	9.418

[0331]

실시예9-부록1

펩티드 용해도 연구

용해도 방법론

[0335] 제제 매개체가 준비되었고 pH측정이 실시되었다.

[0336] * 펩티드의 질량측정

[0337] -대략 1mg이 각 측정에 필요하다.

[0338] -재료들은 그 이후의 용해도 평가에 적합한 용기로 예를 들어 투명한 유리 액체크로마토그래프(HPLC) 유리병(나사마개 포함)으로 제공되었다.

[0339] * 용해도 평가(각 매트릭스에 대하여)

[0340] -매트릭스의 부분표본(50~100~L)이 필요한대로 추가되었다.

[0341] -펩티드 용해도는 외관검사에 의해 이해되었다.

[0342] -용액의 각 부분표본의 추가 후에 샘플특징의 서술이 기록되었다.

[0343] -용해도 외관평가가 24시간 후에 반복되었다.

[0344] * 펩티드가 용액에서 침전되었던 곳에서 24시간 후에 최종농도 대략 0.2mM (200nmol/mL는 거의 0.35mg/mL와 같다)을 만들기 위해 추가적인 완충제가 추가되었다.

[0345] * 펩티드 용해도의 계산(초기의 평가)

[0346] -질량을 측정한 분말의 절대적인 양을 근거로 하여

[0347] -펩티드 분자량과 펩티드 함량과 순도를 이용하여 어느 몰 농도의 용해도를 얻게 되는지 결정

[0348] 계산

$$\text{용해도 } mg/mL \text{ '있는 그대로' } = \frac{\text{질량}(mg)}{\text{회석액}(\mu L)} \times 1000$$

$$\text{용해도 } mg/mL = \frac{\text{질량}(mg)}{\text{회석액}(\mu L)} \times 1000 \times \% \text{ 함량} \times \% \text{ 순도}$$

$$\text{용해도 } \mu mol/mL = \frac{\text{질량}(mg)}{\text{회석액}(\mu L)} \times 1000 \times \% \text{ 함량} \times \% \text{ 순도} \times \frac{1}{\text{몰 질량}} \times 1000$$

[0352] 실시예9-부록2

[0353] 초기용해도와 안정화검사를 위한 완충액

[0354] 각 매트릭스는 10mM 농도의 완충제로 준비되었다. 각 완충제는 260mM 트레할로스 이수화물(화학식량 378.3)을 포함했다.

[0355] 매트릭스의 준비

[0356] 나타낸 과정은 각 완충제마다 100mL의 준비를 위해서이나, 대체의 부피는 양을 조절함으로써 준비될 수 있다.

[0357] * 0.1M 구연산나트륨 농축액과 인산이수소칼륨이 준비됨

[0358] * 트레할로스 이수화물 260mM의 당량이 78-80mL의 종류한 탈이온수를 포함하는 적합한 혼합그릇에 옮겨지고 용해될 수 있음

[0359] * 10mL의 적합한 0.1M 완충제를 혼합그릇에 넣고 저어줌.

[0360] * 매트릭스의 pH는 2mM의 염산이나 0.1M의 수산화나트륨을 필요한대로 첨가함으로써 원하는 값으로 조정함.

[0361] * 용액은 최종적으로 100g으로 회석되었고 pH는 재측정되었다.

[0362] 초기용해도와 안정화검사를 위한 완충제, 완충염 또는 pH 조정제/pH로 나타냈다:

[0363] 2mM 염산과 260mM 트레할로스 이수화물/pH 2.65

[0364] 10mM 시트르산나트륨과 260mM 트레할로스 이수화물/pH 3.01

[0365] 10mM 시트르산나트륨과 260mM 트레할로스 이수화물/pH 3.99

[0366] 10mM 시트르산나트륨과 260mM 트레할로스 이수화물/pH 5.02

[0367] 10mM 시트르산나트륨과 260mM 트레할로스 이수화물/pH 6.01

[0368] 10mM 인산이수소칼륨과 260mM 트레할로스 이수화물/pH 6.03

[0369] 10mM 시트르산나트륨과 260mM 트레할로스 이수화물/pH 7.03

실시예10-히스타민 방출분석

[0371] 본 분석의 목적은 치료하는 동안 알레르기 반응을 야기하는 히스타민이 방출되는 백혈구(조직 비만세포의 대리로서)를 활성화시킬 수 있는 조성물을 확인하기 위함이다. 빈번하게 히스타민 방출을 유도하는 웨티드혼합을 포함하는 조성물은 백신으로 이용하기에는 부적합한 것으로 간주된다.

[0372] 히스타민 방출은 호염구의 표면에 인접한 특이적인 면역글로불린(Ig)E분자들의 가교를 필요로 한다. 평가된 웨티드는 작았고(11~18개 아미노산길이) 그러므로 전체분자에서 면역글로불린E 결합 항원결정부위의 형태를 유지할 수 있게 해주는 중요한 4차 구조를 없어야 한다. 게다가 용액 속에서 웨티드 단량체는 면역글로불린E에 결합해 있음에도 불구하고 인접한 면역글로불린E분자와 교차결합 할 수 없어야한다.

[0373] 자작나무 알레르기에 걸린 피험자의 신선한 말초혈액으로부터 히스타민 방출이 평가되었다. 말초혈액 호염구는 분석에 실용적이지 않은 조직 비만세포의 대리로서 이용되었다. 혈액은 인비트로에서 상기 실시예1~9의 결과에 근거하여 적합하다고 확인된 웨티드 혼합물과 배양되었다. 특히 하기 혼합물이 분석되었다.

[0374] 혼합물1- BIR01I, BIR02J, BIR04, BIR12B, BIR16A, BIR07C

[0375] 혼합물2- BIR01I, BIR02J, BIR04, BIR12B, BIR16A, BIR07C, BIR09

[0376] 혼합물3- BIR01I, BIR02J, BIR04, BIR12B, BIR16A, BIR07C, BIR09B

[0377] 혼합물4- BIR01I, BIR02I, BIR04, BIR12B, BIR16A, BIR07C

[0378] 혼합물5- BIR01I, BIR02I, BIR04, BIR12B, BIR16A, BIR07C, BIR09

[0379] 혼합물6- BIR01I, BIR02I, BIR04, BIR12B, BIR16A, BIR07C, BIR09B

[0380] 자작나무 알레르기항원 추출물에 대한 반응으로 히스타민 방출은 각 피험자마다 호염구 민감성을 확인하기 위해 측정되었다. 세포를 2번 냉동/해동시킴으로써 발생시킨 양성 대조군은 전체 히스타민 방출을 대표하면서 각 분석마다 포함되었다. 자연스러운 히스타민 방출을 위한 음성 대조군은 오직 완충제의 세포만 배양함으로써 발생되었다.

[0381] 분석은 제조사의 지시에 따라 Immunotech Histamine Release Immunoassay 키트를 이용해 수행되었다. 마이크로 티트리 플레이트 웰(microtitre plate well)에서 웨티드 혼합물과 알레르기항원, 완충제와 함께 혈액 호염구의 인비트로검사에 이어 상청액이 제거되고 샘플 안의 히스타민이 아실 히스타민으로 바뀌었다. 아실화된 샘플은 경쟁적 아실 히스타민 효소면역분석법(ELISA)에 의해 테스트되었다.

[0382] 웨티드 혼합물은 5로그10 범위(1~10,000ng/mL)를 넘는 히스타민 방출을 유도하는 능력에 대해 분석되었다. 분석된 농도범위는 치료기간 동안 성취된 이론적인 인비보 웨티드의 양에 근거하여 선택되었다. 예를 들어 5L의 혈액에 들어가는 각 웨티드 투여량 31 μ g(대략 3nmol/peptide 등가물)은 그 결과 히스타민 방출 분석 투여량의 하위권범위에서 6ng/mL의 혈액농도를 야기했다.

[0383] 단일측정이 각 회석액마다 수행되었다. 효소면역분석법(ELISA) 완료 후에 개개의 히스타민 레벨은 효소면역분석에서 발생한 표준곡선으로부터 보간함으로서 결정되었다. 샘플의 결과는 회석될 수 있도록 조정되었다. 웨티드/알레르기항원 조제용 물질의 둘 이상의 연이은 회석액이 냉동/해동된 양성 대조군(15%이상의 양성 대조군)에서 본 총 히스타민 방출의 15%이상을 유도했을 경우, 또는 양성 대조군의 15%이상의 단일값이 측정된 최대 농도에서 성취된 경우, 이것이 “양성 히스타민 방출”로 간주되었다.

[0384] 총 40가지 히스타민 방출 분석이 연구기간동안 완료되었다. 이를 중에 5가지분석은 적합한 품질관리(Quality Control;QC) 컨트롤을 만족시키는데 실패했기 때문에 거절되었다. 예를 들어 음성 대조군 웰에서 배지를 포함한 완충제에서의 매우 높은 레벨(15% 이상의 양성 대조군)의 자연적인 방출때문이다.

[0385] 테스트된 혼합물은 모두 높은 히스타민 방출 특성을 보였다. 연구 결과는 하기에 요약되었다: (WA=알레르기항원 전체)

혼합물	펩티드농도 : $\mu\text{g}/\text{ml}$	히스타민방출 평균%	혼합물	펩티드농도 : $\mu\text{g}/\text{ml}$	히스타민방출 평균%
1	10	1%	5	10	2%
1	1	2%	5	1	2%
1	0.1	3%	5	0.1	2%
1	0.01	3%	5	0.01	2%
1	0.001	2%	5	0.001	2%
2	10	2%	6	10	3%
2	1	2%	6	1	2%
2	0.1	3%	6	0.1	1%
2	0.01	3%	6	0.01	1%
2	0.001	2%	6	0.001	2%
3	10	4%	WA	10	65%
3	1	2%	WA	1	38%
3	0.1	3%	WA	0.1	38%
3	0.01	2%	WA	0.01	42%
3	0.001	2%	WA	0.001	43%
4	10	2%			
4	1	2%			
4	0.1	2%			
4	0.01	1%			
4	0.001	1%			

[0386]

상기 염기서열의 상세한 설명

[0387]

SEQ ID NOS:1-80은 [표1] 내지 [표8]에 정리된대로 본 발명의 폴리펩티드 염기서열을 제공한다. SEQ ID NOS:1-34와 45-70은 Bet v1에서 파생된 펩티드들에 상응한다. SEQ ID NOS:71-76은 Bet v2에서 파생된 펩티드들에 상응한다. SEQ ID NOS:35,36과 77은 Bet v3에서 파생된 펩티드들에 상응한다. SEQ ID NOS:37-39,78과 79는 Bet v4에서 파생된 펩티드들에 상응한다. SEQ ID NOS:40-43과 80은 Bet v6에서 파생된 펩티드들에 상응한다. SEQ ID NO:44는 Bet v7에서 파생된 펩티드에 상응한다.

서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Circassia Ltd.

<120> PEPTIDES FOR VACCINE AGAINST BIRCH ALLERGY

<130> N110180A

<140> PCT/GB11/000206

<141> 2011-02-15

<150> GB 1002559.1

<151> 2010-02-15

<160> 102

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 16

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 1

Val Ile Pro Ala Ala Arg Met Phe Lys Ala Phe Ile Leu Asp Gly Asp

1	5	10	15
---	---	----	----

<210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213>

> Betulaceae

<400> 2

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

1	5	10	15
---	---	----	----

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 3

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

1	5	10	15
---	---	----	----

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 4

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

1	5	10	15
---	---	----	----

<210> 5

<211> 17

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 5

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

1	5	10	15
---	---	----	----

Lys

<210> 6

<211> 19

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 6

Glu Thr Leu Leu Arg Ala Val Glu Ser Tyr Leu Leu Ala His Ser Asp

1 5 10 15

Ala Tyr Asn

<210> 7

<211> 19

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 7

Glu Ala Leu Leu Arg Ala Val Glu Ser Tyr Leu Leu Ala His Ser Asp

1 5 10 15

Ala Tyr Asn

<210> 8

<211> 16

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 8

Gly Val Phe Asn Tyr Glu Ile Gly Ala Thr Ser Val Ile Pro Ala Ala

1 5 10 15

<210> 9

<211> 21

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 9

Ile Ala Pro Ala Arg Leu Phe Lys Ser Phe Val Leu Asp Ala Asp Asn

1 5 10 15

Leu Ile Pro Lys Val

<210> 10

<211> 15

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 10

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

1 5 10 15

<210> 11

<211> 15

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 11

Ser Lys Glu Ile Lys Ile Ala Ala Ala Pro Asp Gly Gly Ser Ile

1 5 10 15

<210> 12

<211> 15

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 12

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

1 5 10 15

<210> 13

<211> 15

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 13

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

1 5 10 15

<210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 14

Cys Asn Glu Ile Lys Ile Val Ala Ala Pro Gly Gly Ser Ile Leu

1 5 10 15

Lys

<210> 15

<211> 17

<212> PRT

<213>

> Betulaceae

<400> 15

Cys Asn Glu Ile Lys Ile Val Pro Ala Pro Gly Gly Ser Ile Leu

1 5 10 15

Lys

<210> 16

<211> 17

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 16

Ser Tyr Glu Ile Lys Ile Val Ala Ala Pro Gly Gly Ser Ile Leu

1 5 10 15

Lys

<210> 17

<211> 15

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 17

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

1 5 10 15

<210> 18

<211> 15

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 18

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

1	5	10	15
---	---	----	----

<210> 19

<211> 15

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 19

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

1	5	10	15
---	---	----	----

<210> 20

<211> 15

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400>

20

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

1	5	10	15
---	---	----	----

<210> 21

<211> 15

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 21

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

1	5	10	15
---	---	----	----

<210> 22

<211> 15

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 22

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

1	5	10	15
---	---	----	----

<210> 23

<211> 15

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 23

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

1	5	10	15
---	---	----	----

<210> 24

<211> 17

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 24

Gly Ser Ile Leu Lys Ile Arg Asn Lys Tyr His Thr Lys Gly Asp His

1	5	10	15
---	---	----	----

Glu

<210> 25

<211> 12

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 25

Ala Gly Leu Phe Lys Ala Val Glu Asn Tyr Leu Val

1	5	10
---	---	----

<210> 26

<211> 12

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 26

Glu Thr Leu Leu Arg Ala Val Glu Ser Tyr Leu Leu

1	5	10
---	---	----

<210> 27

<211> 12

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 27

Glu Ala Leu Leu Arg Ala Val Glu Ser Tyr Leu Leu

1	5	10
---	---	----

<210> 28

<211> 12

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 28

Glu Ala Leu Phe Arg Ala Val Glu Ser Tyr Leu Leu

1 5 10

<210> 29

<211> 18

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 29

Glu Lys Ala Val Gly Leu Leu Lys Ala Val Glu Ser Tyr Leu Leu Ala

1 5 10 15

His Ser

<210> 30

<211> 20

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 30

Gly Glu Thr Leu Leu Arg Ala Val Glu Gly Tyr Leu Leu Ala His Ser

1 5 10 15

Asp Ala Tyr Asn

20

<210> 31

<211> 15

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 31

Glu Thr Leu Leu Arg Ala Val Glu Ser Tyr Pro Leu Ala His Ser

1 5 10 15

<210> 32

<211> 19

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 32

Ala Gly Leu Phe Lys Ala Val Glu Asn Tyr Leu Val Ala His Pro Asn

1 5 10 15

Ala Tyr Asn

<210> 33

<211> 19

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 33

Glu Thr Leu Leu Arg Ala Val Glu Arg Tyr Leu Leu Ala His Ser Asp

1 5 10 15

Ala Tyr Asn

<210> 34

<211> 19

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 34

Glu Ala Leu Phe Arg Ala Val Glu Ser Tyr Leu Leu Ala His Ser Asp

1 5 10 15

Ala Tyr Asn

<210> 35

<211> 18

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 35

Val Asp Phe Phe Glu Phe Lys Asp Met Met Arg Ser Val Leu Val Arg

1 5 10 15

Ser Ser

<210> 36

<400> 36

000

<210> 37

<211> 18

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 37

Ala Glu Arg Glu Arg Ile Phe Lys Arg Phe Asp Ala Asn Gly Asp Gly

1	5	10	15
---	---	----	----

Lys Ile

<210> 38

<211> 15

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 38

Phe Thr Asp Phe Gly Arg Ala Asn Arg Gly Leu Leu Lys Asp Val

1	5	10	15
---	---	----	----

<210> 39

<211> 15

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 39

Phe Thr Asp Phe Ala Arg Ala Asn Arg Gly Leu Leu Lys Asp Val

1	5	10	15
---	---	----	----

<210> 40

<211> 21

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 40

Pro Val Lys Gly Lys Leu Val Glu Lys Phe Lys Gly Leu Gly Val Thr

1 5 10 15

Leu Leu His Gly Asp

20

<210> 41

<211> 24

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 41

His Glu Ser Leu Val Lys Ala Phe Lys Gln Val Asp Val Val Ile Ser

1 5 10 15

Thr Val Gly His Leu Gln Leu Ala

20

<210> 42

<211> 22

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 42

Tyr Val Ser Ser Asn Phe Phe Ala Gly Tyr Phe Leu Pro Thr Leu Ala

1 5 10 15

Gln Pro Gly Leu Thr Ser

20

<210> 43

<211> 17

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 43

Pro Ile Asn Val Ile Leu Ala Ile Asn His Ser Val Phe Val Lys Gly

1 5 10 15

Asp

<210> 44

<211> 15

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 44

Ala Glu Asn Phe Arg Ala Leu Cys Thr Gly Glu Lys Gly Asn Gly

1	5	10	15
---	---	----	----

<210> 45

<211> 16

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 45

Phe Asn Tyr Glu Thr Glu Ala Thr Ser Val Ile Pro Ala Ala Arg Lys

1	5	10	15
---	---	----	----

<210> 46

<211> 16

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 46

Phe Asn Tyr Glu Ile Glu Ala Thr Ser Val Ile Pro Ala Ala Arg Lys

1	5	10	15
---	---	----	----

<210> 47

<211> 16

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 47

Phe Asn Tyr Glu Ile Glu Thr Thr Ser Val Ile Pro Ala Ala Arg Lys

1	5	10	15
---	---	----	----

<210> 48

<211> 16

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 48

Phe Asn Tyr Glu Thr Glu Thr Thr Ser Val Ile Pro Ala Ala Arg Lys

1	5	10	15
---	---	----	----

<210> 49

<211> 19

<212> PRT

<213>

Betulaceae

<400> 49

Pro Ala Ala Arg Met Phe Lys Ala Phe Ile Leu Asp Gly Asp Lys Leu

1 5 10 15

Val Pro Lys

<210> 50

<211> 19

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 50

Pro Ala Ala Arg Leu Phe Lys Ala Phe Ile Leu Glu Gly Asp Thr Leu

1 5 10 15

Ile Pro Lys

<210> 51

<211> 19

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 51

Pro Ala Ala Arg Leu Phe Lys Ala Phe Ile Leu Glu Gly Asp Asn Leu

1 5 10 15

Ile Pro Lys

<210> 52

<211> 12

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 52

Pro Ala Ala Arg Met Phe Lys Ala Phe Ile Leu Asp

1 5 10

<210> 53

<211> 19

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 53

Pro Ala Ala Arg Met Phe Lys Ala Phe Ile Leu Glu Gly Asp Lys Leu

1 5 10 15

Val Pro Lys

<210> 54

<211>

> 18

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 54

Pro Gly Thr Ile Lys Lys Ile Ser Phe Pro Glu Gly Phe Pro Phe Lys

1 5 10 15

Tyr Val

<210> 55

<211> 16

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 55

Ser Pro Phe Lys Tyr Val Lys Glu Arg Val Asp Glu Val Asp His Ala

1 5 10 15

<210> 56

<211> 16

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 56

Phe Pro Phe Lys Tyr Val Lys Asp Arg Val Asp Glu Val Asp His Thr

1 5 10 15

<210> 57

<211> 17

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 57

Ala Asn Phe Lys Tyr Ser Tyr Ser Met Ile Glu Gly Gly Ala Leu Gly

1 5 10 15

Asp

<210> 58

<211> 17

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 58

Thr Asn Phe Lys Tyr Ser Tyr Ser Val Ile Glu Gly Gly Pro Val Gly

1 5 10 15

Asp

<210> 59

<211

> 16

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 59

Thr Asn Phe Lys Tyr Asn Tyr Ser Val Ile Glu Gly Gly Pro Ile Gly

1 5 10 15

<210> 60

<211> 17

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 60

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

1 5 10 15

Lys

<210> 61

<211> 17

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 61

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

1 5 10 15

Lys

<210> 62

<211> 17

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 62

Ser Asn Glu Ile Lys Ile Val Ala Thr Pro Gln Gly Gly Ser Ile Leu

1 5 10 15

Lys

<210> 63

<211> 17

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 63

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

1 5 10 15

Lys

<210

> 64

<211> 17

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 64

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

1 5 10 15

Lys

<210> 65

<211> 15

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 65

Gly Ser Ile Leu Lys Ile Asn Asn Lys Tyr His Thr Lys Gly Asp

1 5 10 15

<210> 66

<211> 14

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 66

Ser Ile Leu Lys Ile Ser Asn Lys Tyr His Thr Lys Gly Asp

1 5 10

<210> 67

<211> 18

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 67

Glu Thr Leu Leu Arg Ala Val Glu Ser Tyr Leu Leu Ala His Ser Asp

1 5 10 15

Ala Tyr

<210> 68

<211> 16

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 68

Gly Glu Thr Leu Leu Arg Ala Val Glu Ser Tyr Leu Leu Ala His Ser

1 5 10 15

<210> 69

<211> 19

<212>

PRT

<213> Betulaceae

<400> 69

Lys Glu Met Gly Glu Thr Leu Leu Arg Ala Val Glu Ser Tyr Leu Leu

1 5 10 15

Ala His Ser

<210> 70

<211> 19

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 70

Lys Glu Lys Gly Glu Thr Leu Leu Arg Ala Val Glu Ser Tyr Leu Leu

1 5 10 15

Ala His Ser

<210> 71

<211> 14

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 71

Gly Ser Val Trp Ala Gln Ser Ser Ser Phe Pro Gln Phe Lys

1 5 10

<210> 72

<211> 14

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 72

Phe Pro Gln Phe Lys Pro Gln Glu Ile Thr Gly Ile Met Lys

1 5 10

<210> 73

<211> 17

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 73

Pro Thr Gly Met Phe Val Ala Gly Ala Lys Tyr Met Val Ile Gln Gly

1 5 10 15

Arg

<210> 74

<211> 17

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 74

Ala Lys Tyr Met Val Ile Gln Gly Glu Pro Gly Arg Val Ile Arg Gly

1 5 10 15

Lys

<210> 75

<211> 18

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 75

Gly Ile Lys Tyr Met Val Ile Gln Gly Glu Ala Gly Ala Val Ile Arg

1 5 10 15

Gly Lys

<210> 76

<211> 16

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 76

Glu Ala Gly Ala Val Ile Arg Gly Lys Gly Ser Gly Gly Ile Thr

1 5 10 15

<210> 77

<211> 16

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 77

Ser Leu Asn Thr Leu Arg Leu Arg Arg Ile Phe Asp Leu Phe Asp Lys

1	5	10	15
---	---	----	----

<210> 78

<211> 17

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 78

Ala Glu Arg Glu Arg Ile Phe Lys Arg Phe Asp Ala Asn Gly Glu Gly

1	5	10	15
---	---	----	----

Lys

<210> 79

<211> 17

<212>

PRT

<213> Betulaceae

<400> 79

Ala Glu Arg Glu Arg Ile Phe Lys Arg Phe Asp Ala Gly Gly Glu Gly

1	5	10	15
---	---	----	----

Lys

<210> 80

<211> 19

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 80

Val Lys Gly Lys Leu Val Glu Lys Phe Lys Gly Leu Gly Val Thr Leu

1	5	10	15
---	---	----	----

Leu His Gly

<210> 81

<211> 15

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis / leprae

<400> 81

Ala Lys Thr Ile Ala Tyr Asp Glu Glu Ala Arg Arg Gly Leu Glu

1 5 10 15

<210> 82

<211> 13

<212> PRT

<213> Influenza virus

<400> 82

Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr

1 5 10

<210> 83

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 83

Glu Asn Pro Val Val His Phe Phe Lys Asn Ile Val Thr Pro Arg

1 5 10 15

<210> 84

<211> 145

<212> PRT

<213> Oleaceae

<400> 84

Glu Asp Ile Pro Gln Pro Pro Val Ser Gln Phe His Ile Gln Gly Gln

1 5 10 15

Val Tyr Cys Asp Thr Cys Arg Ala Gly Phe Ile Thr Glu Leu Ser Glu

20 25 30

Phe Ile Pro Gly Ala Ser Leu Arg Leu Gln Cys Lys Asp Lys Glu Asn

35 40 45

Gly Asp Val Thr Phe Thr Glu Val Gly Tyr Thr Arg Ala Glu Gly Leu

50 55 60

Tyr Ser Met Leu Val Glu Arg Asp His Lys Asn Glu Phe Cys Glu Ile

65	70	75	80
Thr Leu Ile Ser Ser Gly Arg Lys Asp Cys Asn Glu Ile Pro Thr Glu			
85	90	95	
Gly Trp Ala Lys Pro Ser Leu Lys Phe Lys Leu Asn Thr Val Asn Gly			
100	105	110	
Thr Thr Arg Thr Val Asn Pro Leu Gly Phe Phe Lys Lys Glu Ala Leu			
115	120	125	
Pro Lys Cys Ala Gln Val Tyr Asn Lys Leu Gly Met Tyr Pro Pro Asn			
130	135	140	
Met			
145			
<210> 85			
<211> 133			
<212> PRT			
<213> Betulaceae			
<400> 85			
Met Ser Trp Gln Thr Tyr Val Asp Glu His Leu Met Cys Asp Ile Asp			
1	5	10	15
Gly Gln Ala Ser Asn Ser Leu Ala Ser Ala Ile Val Gly His Asp Gly			
20	25	30	
Ser Val Trp Ala Gln Ser Ser Phe Pro Gln Phe Lys Pro Gln Glu			
35	40	45	
Ile Thr Gly Ile Met Lys Asp Phe Glu Glu Pro Gly His Leu Ala Pro			
50	55	60	
Thr Gly Leu His Leu Gly Gly Ile Lys Tyr Met Val Ile Gln Gly Glu			
65	70	75	80
Ala Gly Ala Val Ile Arg Gly Lys Lys Gly Ser Gly Gly Ile Thr Ile			
85	90	95	
Lys Lys Thr Gly Gln Ala Leu Val Phe Gly Ile Tyr Glu Glu Pro Val			
100	105	110	
Thr Pro Gly Gln Cys Asn Met Val Val Glu Arg Leu Gly Asp Tyr Leu			
115	120	125	

Ile Asp Gln Gly Leu

130

<210> 86

<211> 133

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 86

Met Ser Trp Gln Thr Tyr Val Asp Glu His Leu Met Cys Asp Ile Asp

1	5	10	15
---	---	----	----

Gly Gln Gly Glu Glu Leu Ala Ala Ser Ala Ile Val Gly His Asp Gly

20	25	30
----	----	----

Ser Val Trp Ala Gln Ser Ser Ser Phe Pro Gln Phe Lys Pro Gln Glu

35	40	45
----	----	----

Ile Thr Gly Ile Met Lys Asp Phe Glu Glu Pro Gly His Leu Ala Pro

50	55	60
----	----	----

Thr Gly Leu His Leu Gly Gly Ile Lys Tyr Met Val Ile Gln Gly Glu

65	70	75	80
----	----	----	----

Ala Gly Ala Val Ile Arg Gly Lys Lys Gly Ser Gly Gly Ile Thr Ile

85	90	95
----	----	----

Lys Lys Thr Gly Gln Ala Leu Val Phe Gly Ile Tyr Glu Glu Pro Val

100	105	110
-----	-----	-----

Thr Pro Gly Gln Cys Asn Met Val Val Glu Arg Leu Gly Asp Tyr Leu

115	120	125
-----	-----	-----

Ile Asp Gln Gly Leu

130

<210> 87

<211> 133

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 87

Met Ser Trp Gln Thr Tyr Val Asp Glu His Leu Met Cys Asp Ile Asp

1	5	10	15
---	---	----	----

Gly Gln Ala Ser Asn Ser Leu Ala Ser Ala Ile Val Gly His Asp Gly

20 25 30

Ser Val Trp Ala Gln Ser Ser Ser Phe Pro Gln Phe Lys Pro Gln Glu

35 40 45

Ile Thr Gly Ile Met Lys Asp Phe Glu Glu Pro Gly His Leu Ala Pro

50 55 60

Thr Gly Leu His Leu Gly Gly Ile Lys Tyr Met Val Ile Gln Gly Glu

65 70 75 80

Ala Gly Ala Val Ile Arg Gly Lys Lys Gly Ser Gly Gly Ile Thr Ile

85 90 95

Lys Lys Thr Gly Gln Ala Leu Val Phe Gly Ile Tyr Glu Glu Pro Val

100 105 110

Thr Pro Gly Gln Cys Asn Met Val Val Glu Arg Leu Gly Asp Tyr Leu

115 120 125

Ile Asp Gln Gly Leu

130

<210> 88

<211> 133

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 88

Met Ser Trp Gln Thr Tyr Val Asp Glu His Leu Met Cys Asp Ile Asp

1 5 10 15

Gly Gln Ala Ser Asn Ser Leu Ala Ser Ala Ile Val Gly His Asp Gly

20 25 30

Ser Val Trp Ala Gln Ser Ser Ser Phe Pro Gln Phe Lys Pro Gln Glu

35 40 45

Ile Thr Gly Ile Met Lys Asp Phe Glu Glu Pro Gly His Leu Ala Pro

50 55 60

Thr Gly Leu His Leu Gly Gly Ile Lys Tyr Met Val Ile Gln Gly Glu

65 70 75 80

Ala Gly Ala Val Ile Arg Gly Lys Lys Gly Ser Gly Gly Ile Thr Ile

85 90 95

Lys Lys Thr Gly Gln Ala Leu Val Phe Gly Ile Tyr Glu Glu Pro Val
 100 105 110
 Thr Pro Gly Gln Cys Asn Met Val Val Glu Arg Leu Gly Asp Tyr Leu
 115 120 125

Ile Asp Gln Gly Leu

130

<210> 89

<211> 133

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 89

Met Ser Trp Gln Thr Tyr Val Asp Glu His Leu Met Cys Asp Ile Asp
 1 5 10 15
 Gly Gln Ala Ser Asn Ser Leu Ala Ser Ala Ile Val Gly His Asp Gly
 20 25 30
 Ser Val Trp Ala Gln Ser Ser Phe Pro Gln Phe Lys Pro Gln Glu
 35 40 45

Ile Thr Gly Ile Met Lys Asp Phe Glu Glu Pro Gly His Leu Ala Pro
 50 55 60
 Thr Gly Leu His Leu Gly Gly Ile Lys Tyr Met Val Ile Gln Gly Glu
 65 70 75 80
 Ala Gly Ala Val Ile Arg Gly Lys Lys Gly Ser Gly Gly Ile Thr Ile
 85 90 95
 Lys Lys Thr Gly Gln Ala Leu Val Phe Gly Ile Tyr Glu Glu Pro Val
 100 105 110

Thr Pro Gly Gln Cys Asn Met Val Val Glu Arg Leu Gly Asp Tyr Leu
 115 120 125
 Ile Asp Gln Gly Leu
 130
 <210> 90
 <211> 133

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 90

Met Ser Trp Gln Thr Tyr Val Asp Glu His Leu Met Cys Asp Ile Asp

1 5 10 15

Gly Gln Ala Ser Asn Ser Leu Ala Ser Ala Ile Val Gly His Asp Gly

20 25 30

Ser Val Trp Ala Gln Ser Ser Ser Phe Pro Gln Phe Lys Pro Gln Glu

35 40 45

Ile Thr Gly Ile Met Lys Asp Phe Glu Glu Pro Gly His Leu Ala Pro

50 55 60

Thr Gly Leu His Leu Gly Gly Ile Lys Tyr Met Val Ile Gln Gly Glu

65 70 75 80

Ala Gly Ala Val Ile Arg Gly Lys Lys Gly Ser Gly Gly Ile Thr Ile

85 90 95

Lys Lys Thr Gly Gln Ala Leu Val Phe Gly Ile Tyr Glu Glu Pro Val

100 105 110

Thr Pro Gly Gln Cys Asn Met Val Val Glu Arg Leu Gly Asp Tyr Leu

115 120 125

Ile Asp Gln Gly Leu

130

<210> 91

<211> 205

<212> PRT

<213> Betulaceae

<400> 91

Met Pro Cys Ser Thr Glu Ala Met Glu Lys Ala Gly His Gly His Ala

1 5 10 15

Ser Thr Pro Arg Lys Arg Ser Leu Ser Asn Ser Ser Phe Arg Leu Arg

20 25 30

Ser Glu Ser Leu Asn Thr Leu Arg Leu Arg Arg Ile Phe Asp Leu Phe

35 40 45

Asp Lys Asn Ser Asp Gly Ile Ile Thr Val Asp Glu Leu Ser Arg Ala
 50 55 60
 Leu Asn Leu Leu Gly Leu Glu Thr Asp Leu Ser Glu Leu Glu Ser Thr
 65 70 75 80

Val Lys Ser Phe Thr Arg Glu Gly Asn Ile Gly Leu Gln Phe Glu Asp
 85 90 95
 Phe Ile Ser Leu His Gln Ser Leu Asn Asp Ser Tyr Phe Ala Tyr Gly
 100 105 110
 Gly Glu Asp Glu Asp Asp Asn Glu Glu Asp Met Arg Lys Ser Ile Leu
 115 120 125
 Ser Gln Glu Glu Ala Asp Ser Phe Gly Gly Phe Lys Val Phe Asp Glu
 130 135 140

Asp Gly Asp Gly Tyr Ile Ser Ala Arg Glu Leu Gln Met Val Leu Gly
 145 150 155 160
 Lys Leu Gly Phe Ser Glu Gly Ser Glu Ile Asp Arg Val Glu Lys Met
 165 170 175
 Ile Val Ser Val Asp Ser Asn Arg Asp Gly Arg Val Asp Phe Phe Glu
 180 185 190
 Phe Lys Asp Met Met Arg Ser Val Leu Val Arg Ser Ser
 195 200 205
 <210> 92

<211> 85
 <212> PRT
 <213> Betulaceae
 <400> 92

Met Ala Asp Asp His Pro Gln Asp Lys Ala Glu Arg Glu Arg Ile Phe
 1 5 10 15
 Lys Arg Phe Asp Ala Asn Gly Asp Gly Lys Ile Ser Ala Ala Glu Leu
 20 25 30
 Gly Glu Ala Leu Lys Thr Leu Gly Ser Ile Thr Pro Asp Glu Val Lys
 35 40 45

His Met Met Ala Glu Ile Asp Thr Asp Gly Asp Gly Phe Ile Ser Phe

50	55	60
Gln Glu Phe Thr Asp Phe Gly Arg Ala Asn Arg Gly Leu Leu Lys Asp		
65	70	75
Val Ala Lys Ile Phe		
	85	

<210> 93

<211> 24

<212> PRT

<213> Quercus alba

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (17)..(17)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 93

Gly Val Phe Thr Xaa Glu Ser Gln Glu Thr Ser Val Ile Ala Pro Ala

1	5	10	15
---	---	----	----

Xaa Leu Phe Lys Ala Leu Phe Leu

20

<210> 94

<211> 40

<212> PRT

<213> Carpinus betulus

<220><221> misc_feature

<222> (39)..(39)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 94

Gly Val Phe Asn Tyr Glu Ala Glu Thr Pro Ser Val Ile Pro Ala Ala

1	5	10	15
---	---	----	----

Arg Leu Phe Lys Ser Tyr Val Leu Asp Gly Asp Lys Leu Ile Pro Lys

20	25	30
Val Ala Pro Gln Ala Ile Xaa Lys		
35	40	
<210> 95		
<211> 44		
<212> PRT		
<213> Alnus glutinosa		
<400> 95		
Gly Val Phe Asn Tyr Glu Ala Glu Thr Pro Ser Val Ile Pro Ala Ala		
1	5	10
Arg Leu Phe Lys Ala Phe Ile Leu Asp Gly Asp Lys Leu Leu Pro Lys		
20	25	30
Val Ala Pro Glu Ala Val Ser Ser Val Glu Asn Ile		
35	40	
<210> 96		
<211> 110		
<212> PRT		
<213> Betula pendula		
<220>		
<223> Rubisco		
<400> 96		
Val Gln Cys Met Gln Val Trp Pro Pro Leu Gly Leu Lys Lys Phe Glu		
1	5	10
Thr Leu Ser Tyr Leu Pro Pro Leu Ser Ser Glu Gln Leu Ala Lys Glu		
20	25	30
Val Asp Tyr Leu Leu Arg Lys Asn Leu Ile Pro Cys Leu Glu Phe Glu		
35	40	45
Leu Glu His Gly Phe Val Tyr Arg Glu His Asn Arg Ser Pro Gly Tyr		
50	55	60
Tyr Asp Gly Arg Tyr Trp Thr Met Trp Lys Leu Pro Met Phe Gly Cys		
65	70	75
Asn Asp Ser Ser Gln Val Leu Lys Glu Leu Glu Glu Cys Lys Lys Ala		
85	90	95

Tyr Pro Ser Ala Phe Ile Arg Ile Ile Gly Phe Asp Asp Lys

100	105	110
-----	-----	-----

<210> 97

<211> 373

<212> PRT

<213> Pinaceae

<400> 97

Met Asp Ser Pro Cys Leu Val Ala Leu Leu Val Phe Ser Phe Val Ile

1	5	10	15
---	---	----	----

Gly Ser Cys Phe Ser Asp Asn Pro Ile Asp Ser Cys Trp Arg Gly Asp

20	25	30
----	----	----

Ser Asn Trp Ala Gln Asn Arg Met Lys Leu Ala Asp Cys Ala Val Gly

35	40	45
----	----	----

Phe Gly Ser Ser Thr Met Gly Gly Lys Gly Asp Leu Tyr Thr Val

50	55	60
----	----	----

Thr Asn Ser Asp Asp Pro Val Asn Pro Pro Gly Thr Leu Arg Tyr

65	70	75	80
----	----	----	----

Gly Ala Thr Arg Asp Arg Pro Leu Trp Ile Ile Phe Ser Gly Asn Met

85	90	95
----	----	----

Asn Ile Lys Leu Lys Met Pro Met Tyr Ile Ala Gly Tyr Lys Thr Phe

100	105	110
-----	-----	-----

Asp Gly Arg Gly Ala Gln Val Tyr Ile Gly Asn Gly Gly Pro Cys Val

115	120	125
-----	-----	-----

Phe Ile Lys Arg Val Ser Asn Val Ile Ile His Gly Leu Tyr Leu Tyr

130	135	140
-----	-----	-----

Gly Cys Ser Thr Ser Val Leu Gly Asn Val Leu Ile Asn Glu Ser Phe

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

Gly Val Glu Pro Val His Pro Gln Asp Gly Asp Ala Leu Thr Leu Arg

165	170	175
-----	-----	-----

Thr Ala Thr Asn Ile Trp Ile Asp His Asn Ser Phe Ser Asn Ser Ser

180	185	190
-----	-----	-----

Asp Gly Leu Val Asp Val Thr Leu Thr Ser Thr Gly Val Thr Ile Ser
 195 200 205
 Asn Asn Leu Phe Phe Asn His His Lys Val Met Ser Leu Gly His Asp
 210 215 220
 Asp Ala Tyr Ser Asp Asp Lys Ser Met Lys Val Thr Val Ala Phe Asn
 225 230 235 240
 Gln Phe Gly Pro Asn Cys Gly Gln Arg Met Pro Arg Ala Arg Tyr Gly

 245 250 255
 Leu Val His Val Ala Asn Asn Asn Tyr Asp Pro Trp Thr Ile Tyr Ala
 260 265 270
 Ile Gly Gly Ser Ser Asn Pro Thr Ile Leu Ser Glu Gly Asn Ser Phe
 275 280 285
 Thr Ala Pro Asn Glu Ser Tyr Lys Lys Gln Val Thr Ile Arg Ile Gly
 290 295 300
 Cys Lys Thr Ser Ser Cys Ser Asn Trp Val Trp Gln Ser Thr Gln

 305 310 315 320
 Asp Val Phe Tyr Asn Gly Ala Tyr Phe Val Ser Ser Gly Lys Tyr Glu
 325 330 335
 Gly Gly Asn Ile Tyr Thr Lys Lys Glu Ala Phe Asn Val Glu Asn Gly
 340 345 350
 Asn Ala Thr Pro His Leu Thr Gln Asn Ala Gly Val Leu Thr Cys Ser
 355 360 365
 Leu Ser Lys Arg Cys
 370
 <210
 > 98
 <211> 374
 <212> PRT
 <213> Pinaceae
 <400> 98
 Met Asp Ser Pro Cys Leu Val Ala Leu Leu Val Leu Ser Phe Val Ile
 1 5 10 15
 Gly Ser Cys Phe Ser Asp Asn Pro Ile Asp Ser Cys Trp Arg Gly Asp

20	25	30
Ser Asn Trp Ala Gln Asn Arg Met Lys Leu Ala Asp Cys Ala Val Gly		
35	40	45
Phe Gly Ser Ser Thr Met Gly Gly Lys Gly Asp Leu Tyr Thr Val		
50	55	60
Thr Asn Ser Asp Asp Asp Pro Val Asn Pro Ala Pro Gly Thr Leu Arg		
65	70	75
Tyr Gly Ala Thr Arg Asp Arg Pro Leu Trp Ile Ile Phe Ser Gly Asn		
85	90	95
Met Asn Ile Lys Leu Lys Met Pro Met Tyr Ile Ala Gly Tyr Lys Thr		
100	105	110
Phe Asp Gly Arg Gly Ala Gln Val Tyr Ile Gly Asn Gly Pro Cys		
115	120	125
Val Phe Ile Lys Arg Val Ser Asn Val Ile Ile His Gly Leu His Leu		
130	135	140
Tyr Gly Cys Ser Thr Ser Val Leu Gly Asn Val Leu Ile Asn Glu Ser		
145	150	155
Phe Gly Val Glu Pro Val His Pro Gln Asp Gly Asp Ala Leu Thr Leu		
165	170	175
Arg Thr Ala Thr Asn Ile Trp Ile Asp His Asn Ser Phe Ser Asn Ser		
180	185	190
Ser Asp Gly Leu Val Asp Val Thr Leu Ser Ser Thr Gly Val Thr Ile		
195	200	205
Ser Asn Asn Leu Phe Phe Asn His His Lys Val Met Leu Leu Gly His		
210	215	220
Asp Asp Ala Tyr Ser Asp Asp Lys Ser Met Lys Val Thr Val Ala Phe		
225	230	235
Asn Gln Phe Gly Pro Asn Cys Gly Gln Arg Met Pro Arg Ala Arg Tyr		
245	250	255
Gly Leu Val His Val Ala Asn Asn Asn Tyr Asp Pro Trp Thr Ile Tyr		
260	265	270

Ala Ile Gly Gly Ser Ser Asn Pro Thr Ile Leu Ser Glu Gly Asn Ser
 275 280 285
 Phe Thr Ala Pro Asn Glu Ser Tyr Lys Lys Gln Val Thr Ile Arg Ile
 290 295 300
 Gly Cys Lys Thr Ser Ser Cys Ser Asn Trp Val Trp Gln Ser Thr

 305 310 315 320
 Gln Asp Val Phe Tyr Asn Gly Ala Tyr Phe Val Ser Ser Gly Lys Tyr
 325 330 335
 Glu Gly Gly Asn Ile Tyr Thr Lys Lys Glu Ala Phe Asn Val Glu Asn
 340 345 350
 Gly Asn Ala Thr Pro Gln Leu Thr Lys Asn Ala Gly Val Leu Thr Cys
 355 360 365
 Ser Leu Ser Lys Arg Cys
 370

<210> 99
 <211> 514
 <212> PRT
 <213> Cryptomeria japonica
 <400> 99

Met Ala Met Lys Leu Ile Ala Pro Met Ala Phe Leu Ala Met Gln Leu
 1 5 10 15
 Ile Ile Met Ala Ala Ala Glu Asp Gln Ser Ala Gln Ile Met Leu Asp
 20 25 30
 Ser Val Val Glu Lys Tyr Leu Arg Ser Asn Arg Ser Leu Arg Lys Val
 35 40 45

Glu His Ser Arg His Asp Ala Ile Asn Ile Phe Asn Val Glu Lys Tyr

 50 55 60
 Gly Ala Val Gly Asp Gly Lys His Asp Cys Thr Glu Ala Phe Ser Thr
 65 70 75 80
 Ala Trp Gln Ala Ala Cys Lys Asn Pro Ser Ala Met Leu Leu Val Pro
 85 90 95
 Gly Ser Lys Lys Phe Val Val Asn Asn Leu Phe Phe Asn Gly Pro Cys

100	105	110
Gln Pro His Phe Thr Phe Lys Val Asp Gly Ile Ile Ala Ala Tyr Gln		
115	120	125
Asn Pro Ala Ser Trp Lys Asn Asn Arg Ile Trp Leu Gln Phe Ala Lys		
130	135	140
Leu Thr Gly Phe Thr Leu Met Gly Lys Gly Val Ile Asp Gly Gln Gly		
145	150	155
Lys Gln Trp Trp Ala Gly Gln Cys Lys Trp Val Asn Gly Arg Glu Ile		
165	170	175
Cys Asn Asp Arg Asp Arg Pro Thr Ala Ile Lys Phe Asp Phe Ser Thr		
180	185	190
Gly Leu Ile Ile Gln Gly Leu Lys Leu Met Asn Ser Pro Glu Phe His		
195	200	205
Leu Val Phe Gly Asn Cys Glu Gly Val Lys Ile Ile Gly Ile Ser Ile		
210	215	220
Thr Ala Pro Arg Asp Ser Pro Asn Thr Asp Gly Ile Asp Ile Phe Ala		
225	230	235
Ser Lys Asn Phe His Leu Gln Lys Asn Thr Ile Gly Thr Gly Asp Asp		
245	250	255
Cys Val Ala Ile Gly Thr Gly Ser Ser Asn Ile Val Ile Glu Asp Leu		
260	265	270
Ile Cys Gly Pro Gly His Gly Ile Ser Ile Gly Ser Leu Gly Arg Glu		
275	280	285
Asn Ser Arg Ala Glu Val Ser Tyr Val His Val Asn Gly Ala Lys Phe		
290	295	300
Ile Asp Thr Gln Asn Gly Leu Arg Ile Lys Thr Trp Gln Gly Ser		
305	310	315
Gly Met Ala Ser His Ile Ile Tyr Glu Asn Val Glu Met Ile Asn Ser		
325	330	335
Glu Asn Pro Ile Leu Ile Asn Gln Phe Tyr Cys Thr Ser Ala Ser Ala		
340	345	350

Cys Gln Asn Gln Arg Ser Ala Val Gln Ile Gln Asp Val Thr Tyr Lys

355 360 365

Asn Ile Arg Gly Thr Ser Ala Thr Ala Ala Ile Gln Leu Lys Cys

370 375 380

Ser Asp Ser Met Pro Cys Lys Asp Ile Lys Leu Ser Asp Ile Ser Leu

385 390 395 400

Lys Leu Thr Ser Gly Lys Ile Ala Ser Cys Leu Asn Asp Asn Ala Asn

405 410 415

Gly Tyr Phe Ser Gly His Val Ile Pro Ala Cys Lys Asn Leu Ser Pro

420 425 430

Ser Ala Lys Arg Lys Glu Ser Lys Ser His Lys His Pro Lys Thr Val

435 440 445

Met Val Glu Asn Met Arg Ala Tyr Asp Lys Gly Asn Arg Thr Arg Ile

450 455 460

Leu Leu Gly Ser Arg Pro Pro Asn Cys Thr Asn Lys Cys His Gly Cys

465 470 475 480

Ser Pro Cys Lys Ala Lys Leu Val Ile Val His Arg Ile Met Pro Gln

485 490 495

Glu Tyr Tyr Pro Gln Arg Trp Ile Cys Ser Cys His Gly Lys Ile Tyr

500 505 510

His Pro

<210> 100

<211> 514

<212> PRT

<213> Cryptomeria japonica

<400> 100

Met Ala Met Lys Phe Ile Ala Pro Met Ala Phe Val Ala Met Gln Leu

1 5 10 15

Ile Ile Met Ala Ala Ala Glu Asp Gln Ser Ala Gln Ile Met Leu Asp

20 25 30

Ser Asp Ile Glu Gln Tyr Leu Arg Ser Asn Arg Ser Leu Arg Lys Val

35	40	45
----	----	----

Glu His Ser Arg His Asp Ala Ile Asn Ile Phe Asn Val Glu Lys Tyr
 50 55 60
 Gly Ala Val Gly Asp Gly Lys His Asp Cys Thr Glu Ala Phe Ser Thr
 65 70 75 80
 Ala Trp Gln Ala Ala Cys Lys Lys Pro Ser Ala Met Leu Leu Val Pro
 85 90 95
 Gly Asn Lys Lys Phe Val Val Asn Asn Leu Phe Phe Asn Gly Pro Cys
 100 105 110

Gln Pro His Phe Thr Phe Lys Val Asp Gly Ile Ile Ala Ala Tyr Gln
 115 120 125
 Asn Pro Ala Ser Trp Lys Asn Asn Arg Ile Trp Leu Gln Phe Ala Lys
 130 135 140
 Leu Thr Gly Phe Thr Leu Met Gly Lys Gly Val Ile Asp Gly Gln Gly
 145 150 155 160
 Lys Gln Trp Trp Ala Gly Gln Cys Lys Trp Val Asn Gly Arg Glu Ile
 165 170 175

Cys Asn Asp Arg Asp Arg Pro Thr Ala Ile Lys Phe Asp Phe Ser Thr
 180 185 190
 Gly Leu Ile Ile Gln Gly Leu Lys Leu Met Asn Ser Pro Glu Phe His
 195 200 205
 Leu Val Phe Gly Asn Cys Glu Gly Val Lys Ile Ile Gly Ile Ser Ile
 210 215 220
 Thr Ala Pro Arg Asp Ser Pro Asn Thr Asp Gly Ile Asp Ile Phe Ala
 225 230 235 240

Ser Lys Asn Phe His Leu Gln Lys Asn Thr Ile Gly Thr Gly Asp Asp
 245 250 255
 Cys Val Ala Ile Gly Thr Gly Ser Ser Asn Ile Val Ile Glu Asp Leu
 260 265 270
 Ile Cys Gly Pro Gly His Gly Ile Ser Ile Gly Ser Leu Gly Arg Glu
 275 280 285

Asn Ser Arg Ala Glu Val Ser Tyr Val His Val Asn Gly Ala Lys Phe

290 295 300

Ile Asp Thr Gln Asn Gly Leu Arg Ile Lys Thr Trp Gln Gly Gly Ser

305 310 315 320

Gly Met Ala Ser His Ile Ile Tyr Glu Asn Val Glu Met Ile Asn Ser

325 330 335

Glu Asn Pro Ile Leu Ile Asn Gln Phe Tyr Cys Thr Ser Ala Ser Ala

340 345 350

Cys Gln Asn Gln Arg Ser Ala Val Gln Ile Gln Asp Val Thr Tyr Lys

355 360 365

Asn Ile Arg Gly Thr Ser Ala Thr Ala Ala Ile Gln Leu Lys Cys

370 375 380

Ser Asp Ser Met Pro Cys Lys Asp Ile Lys Leu Ser Asp Ile Ser Leu

385 390 395 400

Lys Leu Thr Ser Gly Lys Ile Ala Ser Cys Leu Asn Asp Asn Ala Asn

405 410 415

Gly Tyr Phe Ser Gly His Val Ile Pro Ala Cys Lys Asn Leu Ser Pro

420 425 430

Ser Ala Lys Arg Lys Glu Ser Lys Ser His Lys His Pro Lys Thr Val

435 440 445

Met Val Lys Asn Met Gly Ala Tyr Asp Lys Gly Asn Arg Thr Arg Ile

450 455 460

Leu Leu Gly Ser Arg Pro Pro Asn Cys Thr Asn Lys Cys His Gly Cys

465 470 475 480

Ser Pro Cys Lys Ala Lys Leu Val Ile Val His Arg Ile Met Pro Gln

485 490 495

Glu Tyr Tyr Pro Gln Arg Trp Met Cys Ser Arg His Gly Lys Ile Tyr

500 505 510

His Pro

<210> 101

<211> 373

<212> PRT

<213> Cryptomeria japonica

<400> 101

Met Asp Ser Pro Cys Leu Val Ala Leu Leu Val Leu Ser Phe Val Ile

1 5 10 15

Gly Ser Cys Phe Ser Asp Asn Pro Ile Asp Ser Cys Trp Arg Gly Asp

20 25 30

Ser Asn Trp Ala Gln Asn Arg Met Lys Leu Ala Asp Cys Ala Val Gly

35 40 45

Phe Gly Ser Ser Thr Met Gly Gly Lys Gly Asp Leu Tyr Thr Val

50 55 60

Thr Asn Ser Asp Asp Asp Pro Val Asn Pro Pro Gly Thr Leu Arg Tyr

65 70 75 80

Gly Ala Thr Arg Asp Arg Pro Leu Trp Ile Ile Phe Ser Gly Asn Met

85 90 95

Asn Ile Lys Leu Lys Met Pro Met Tyr Ile Ala Gly Tyr Lys Thr Phe

100 105 110

Asp Gly Arg Gly Ala Gln Val Tyr Ile Gly Asn Gly Pro Cys Val

115 120 125

Phe Ile Lys Arg Val Ser Asn Val Ile Ile His Gly Leu His Leu Tyr

130 135 140

Gly Cys Ser Thr Ser Val Leu Gly Asn Val Leu Ile Asn Glu Ser Phe

145 150 155 160

Gly Val Glu Pro Val His Pro Gln Asp Gly Asp Ala Leu Thr Leu Arg

165 170 175

Thr Ala Thr Asn Ile Trp Ile Asp His Asn Ser Phe Ser Asn Ser Ser

180 185 190

Asp Gly Leu Val Asp Val Thr Leu Ser Ser Thr Gly Val Thr Ile Ser

195 200 205

Asn Asn Leu Phe Phe Asn His His Lys Val Met Leu Leu Gly His Asp

210 215 220

Asp Ala Tyr Ser Asp Asp Lys Ser Met Lys Val Thr Val Ala Phe Asn

225 230 235 240

Gln Phe Gly Pro Asn Cys Gly Gln Arg Met Pro Arg Ala Arg Tyr Gly

245 250 255

Leu Val His Val Ala Asn Asn Asn Tyr Asp Pro Trp Thr Ile Tyr Ala

260 265 270

Ile Gly Gly Ser Ser Asn Pro Thr Ile Leu Ser Glu Gly Asn Ser Phe

275 280 285

Thr Ala Pro Asn Glu Ser Tyr Lys Lys Gln Val Thr Ile Arg Ile Gly

290 295 300

Cys Lys Thr Ser Ser Cys Ser Asn Trp Val Trp Gln Ser Thr Gln

305 310 315 320

Asp Val Phe Tyr Asn Gly Ala Tyr Phe Val Ser Ser Gly Lys Tyr Glu

325 330 335

Gly Gly Asn Ile Tyr Thr Lys Lys Glu Ala Phe Asn Val Glu Asn Gly

340 345 350

Asn Ala Thr Pro Gln Leu Thr Lys Asn Ala Gly Val Leu Thr Cys Ser

355 360 365

Leu Ser Lys Arg Cys

370

<210> 102

<211> 374

<212> PRT

<213> Cryptomeria japonica

<400> 102

Met Asp Ser Pro Cys Leu Val Ala Leu Leu Val Phe Ser Phe Val Ile

1 5 10 15

Gly Ser Cys Phe Ser Asp Asn Pro Ile Asp Ser Cys Trp Arg Gly Asp

20 25 30

Ser Asn Trp Ala Gln Asn Arg Met Lys Leu Ala Asp Cys Ala Val Gly

35 40 45

Phe Gly Ser Ser Thr Met Gly Gly Lys Gly Asp Leu Tyr Thr Val
 50 55 60
 Thr Asn Ser Asp Asp Asp Pro Val Asn Pro Ala Pro Gly Thr Leu Arg
 65 70 75 80
 Tyr Gly Ala Thr Arg Asp Arg Pro Leu Trp Ile Ile Phe Ser Gly Asn
 85 90 95
 Met Asn Ile Lys Leu Lys Met Pro Met Tyr Ile Ala Gly Tyr Lys Thr
 100 105 110
 Phe Asp Gly Arg Gly Ala Gln Val Tyr Ile Gly Asn Gly Pro Cys
 115 120 125
 Val Phe Ile Lys Arg Val Ser Asn Val Ile Ile His Gly Leu Tyr Leu
 130 135 140
 Tyr Gly Cys Ser Thr Ser Val Leu Gly Asn Val Leu Ile Asn Glu Ser
 145 150 155 160
 Phe Gly Val Glu Pro Val His Pro Gln Asp Gly Asp Ala Leu Thr Leu
 165 170 175
 Arg Thr Ala Thr Asn Ile Trp Ile Asp His Asn Ser Phe Ser Asn Ser
 180 185 190
 Ser Asp Gly Leu Val Asp Val Thr Leu Thr Ser Thr Gly Val Thr Ile
 195 200 205
 Ser Asn Asn Leu Phe Phe Asn His His Lys Val Met Ser Leu Gly His
 210 215 220
 Asp Asp Ala Tyr Ser Asp Asp Lys Ser Met Lys Val Thr Val Ala Phe
 225 230 235 240
 Asn Gln Phe Gly Pro Asn Cys Gly Gln Arg Met Pro Arg Ala Arg Tyr
 245 250 255
 Gly Leu Val His Val Ala Asn Asn Asn Tyr Asp Pro Trp Thr Ile Tyr
 260 265 270
 Ala Ile Gly Gly Ser Ser Asn Pro Thr Ile Leu Ser Glu Gly Asn Ser
 275 280 285
 Phe Thr Ala Pro Asn Glu Ser Tyr Lys Lys Gln Val Thr Ile Arg Ile

290 295 300
Gly Cys Lys Thr Ser Ser Ser Cys Ser Asn Trp Val Trp Gln Ser Thr
305 310 315 320
Gln Asp Val Phe Tyr Asn Gly Ala Tyr Phe Val Ser Ser Gly Lys Tyr
325 330 335
Glu Gly Gly Asn Ile Tyr Thr Lys Lys Glu Ala Phe Asn Val Glu Asn
340 345 350
Gly Asn Ala Thr Pro His Leu Thr Gln Asn Ala Gly Val Leu Thr Cys
355 360 365
Ser Leu Ser Lys Arg Cys
370