



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102307893 B

(45) 授权公告日 2014. 03. 26

(21) 申请号 201080006665. 3

C07K 7/08 (2006. 01)

(22) 申请日 2010. 02. 05

A61K 38/04 (2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 38/16 (2006. 01)

0901928. 2 2009. 02. 05 GB

A61K 39/36 (2006. 01)

0901927. 4 2009. 02. 05 GB

0912578. 2 2009. 07. 20 GB

PCT/GB2009/001995 2009. 08. 14 GB

0917871. 6 2009. 10. 12 GB

(56) 对比文件

W0 03024998 A1, 2003. 03. 27,

W0 2007140505 A3, 2008. 03. 20,

Andrew Bysice. Possible Intrinsic
adjuvant activity of the Amb a 1 (Ambrosia
artemisiifolia : Ragweed) allergen.

《[http://digitalcommons.mcmaster.ca/
opendissertations/7502/](http://digitalcommons.mcmaster.ca/opendissertations/7502/)》. 2012,

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2011. 08. 04

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2010/000198 2010. 02. 05

审查员 李楠

(87) PCT国际申请的公布数据

W02010/089554 EN 2010. 08. 12

(73) 专利权人 切尔卡西亚有限公司

地址 英国牛津

(72) 发明人 罗德·哈夫纳 保罗·莱德勒

盖伊·雷顿 马克·拉尔什

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理

有限公司 11262

代理人 陶贻丰 郑霞

(51) Int. Cl.

C07K 14/415 (2006. 01)

C07K 7/06 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书43页
序列表45页

(54) 发明名称

用于疫苗的草肽

(57) 摘要

本发明涉及包括用于预防或治疗房尘螨过敏
症的肽的组合物, 并且特别涉及用于预防或治疗
所述过敏症的肽的最佳组合。

1. 一种适用于通过免疫耐受作用预防或治疗草花粉过敏症的组合物,所述组合物包括:

- (a) 氨基酸序列如 SEQ ID NO:93 所示的多肽;
- (b) 氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示的多肽;
- (c) 氨基酸序列如 SEQ ID NO:31 所示的多肽;
- (d) 氨基酸序列如 SEQ ID NO:91 所示的多肽;
- (e) 氨基酸序列如 SEQ ID NO:2 所示的多肽;
- (f) 氨基酸序列如 SEQ ID NO:5 所示的多肽;和
- (g) 氨基酸序列如 SEQ ID NO:28 所示的多肽。

2. 一种用于通过免疫耐受作用预防或治疗草花粉过敏症的药物制剂,所述药物制剂包括根据权利要求 1 所述的组合物和药学上可接受的运载体或稀释剂。

用于疫苗的草肽

[0001] 通过引用并入

[0002] 以下优先权申请的内容在此通过引用并入：于 2009 年 2 月 5 日提交的英国专利申请第 0901928.2 号，于 2009 年 2 月 5 日提交的英国专利申请第 0901927.4 号，于 2009 年 7 月 20 日提交的英国专利申请第 0912578.2 号，于 2009 年 8 月 14 日提交的国际专利申请第 PCT/GB09/01995 号和于 2009 年 10 月 12 日提交的英国专利申请第 0917871.6 号。

发明领域

[0003] 本发明涉及用于预防或治疗草过敏症的组合物。

[0004] 发明背景

[0005] T 细胞抗原识别需要抗原呈递细胞 (APC) 在其细胞表面上呈递与主要组织相容性复合物 (MHC) 的分子缔合的抗原片段 (肽)。T 细胞使用其抗原特异性 T 细胞受体 (TCR) 来识别由 APC 呈递的抗原片段。这样的识别作为免疫系统的触发器起作用来产生一系列应答以根除已被识别的抗原。

[0006] 生物体如人类的免疫系统对外部抗原的识别可在某些情况下造成疾病，其被称作特应性疾病。后者的实例是过敏性疾病，包括哮喘、特应性皮炎和过敏性鼻炎。在这一组疾病中，B 淋巴细胞产生对外源产生的抗原结合的 IgE 类抗体（在人类中），所述抗原在本文称为过敏原，因为这些分子引发过敏反应。过敏原特异性 IgE 的产生依赖于也被过敏原活化（并对其有特异性）的 T 淋巴细胞。借助于诸如嗜碱性粒细胞和肥大细胞等细胞对 IgE 表面受体的表达，过敏原特异性的 IgE 抗体结合到这些细胞表面。

[0007] 过敏原对结合在表面的 IgE 分子的交联造成这些效应细胞脱粒，导致炎症介质诸如组胺、5-羟色胺和脂质介质如硫桥白三烯 (sulphidoleukotriene) 的释放。除了 IgE 依赖性事件，某些过敏性疾病诸如哮喘的特征为 IgE 独立性事件。

[0008] 目前用提供症状缓解或预防的剂来治疗 IgE 介导的过敏性疾病。这种剂的实例是抗组胺剂、 β 2 激动剂和糖皮质类固醇。此外，通过包括过敏原成分或提取物的定期注射的去敏化程序来治疗一些 IgE 介导的疾病。去敏化治疗可诱导与 IgE 竞争过敏原的 IgG 响应，或可诱导阻断针对过敏原的 IgE 的合成的特定抑制性 T 细胞。这种形式的治疗不是总有效，并且具有激起严重副作用特别是一般过敏性休克的风险。这可以是致命的，除非立即意识到并用肾上腺素治疗。将减少或消除针对特定过敏原的不想要的过敏-免疫应答而不改变对其它外来抗原的免疫反应性或触发本身过敏响应的治疗性处理将对过敏个体大有益处。

[0009] 普遍认为，草过敏原是包括哮喘、过敏性鼻炎和过敏性皮炎在内的人类和动物过敏性疾病的主要原因。存在于草花粉中的蛋白是尤其重要的。例如，约 90% 的干草热患者对草花粉过敏。干草热是一种形式的季节性过敏症的统称，其特征是打喷嚏、流鼻涕和眼睛发痒。术语“干草热”源于该形式的变应性疾病在“割干草季节”中最为流行，该季节与许多草的花期相应，此时禾本植物释放大量的花粉。其在夏季尤其流行，通常从 5 月末到 8 月末（在北半球）。

[0010] 在美国，据计算干草热对于成人是第五位的主要慢性病并是缺勤的主要原因，这

导致每年失去或减少近 4 百万个工作日,导致总生产力损失方面超过 \$7 亿的总损失。过敏症还是儿童中最常报道的慢性病症,对于 40% 以上的儿童,限制了其活动。每年,过敏症在美国导致了 17,000,000 次以上的门诊就诊;这些过敏症就诊的一半以上是因诸如干草热的季节性过敏症导致的。

[0011] 因此治疗性或预防性治疗将对患有草过敏症的人或处于患草过敏症的风险的人具有极大益处。

[0012] 发明概述

[0013] 通常将草花粉过敏原分组,在每一组中绝大多数物种表达至少一种花粉过敏原。组的例子包括:

[0014] - 组 1 草花粉过敏原,其包括,例如,来自黑麦草 (*Lolium perenne*) 的蛋白 Lol p 1 和来自猫尾草 (*Phleum pratense*) 的蛋白 Phl p 1;和

[0015] - 组 5 草花粉过敏原,其包括,例如,来自黑麦草的蛋白 Lol p 5a 和蛋白 Lol p 5b,来自猫尾草的蛋白 Phl p 5,和来自狗牙根 (*Cynodon dactylon*) 的蛋白 Cyn d 5。

[0016] 本发明人已发现,来源于草物种的花粉中的主要过敏原的某些肽片段在使得个体对这些过敏原的去敏化中尤其有用。已筛选了本发明的多肽组合结合许多 MHC II 类分子的能力,和以极小的组胺释放引起 T 细胞增殖的能力。因此可将本发明的组合物、产物、载体和制剂提供给个体以通过免疫耐受作用 (tolerisation) 来预防或治疗过敏症。

[0017] 通过使用预测肽-MHC 相互作用的计算机模拟分析和 MHC II 类结合分析,选择作为 MHC II 类-结合 T 细胞表位的本发明的肽。通过同源性来鉴定另外的表位。在体外 T 细胞响应分析的基础上对本发明的肽和肽组合进行进一步选择。

[0018] 然而,本发明的肽组合通过靶向多种不同 MHC 分子而提供对人类人群覆盖面广泛的效力。因此,以本发明的肽配制的疫苗将具有广泛的应用。

[0019] 本发明人的工作产生了具有以下特征的肽组合:

[0020] - 该组合结合许多不同 MHC II 类分子

[0021] - 该组合在草过敏个体中显著刺激细胞因子释放

[0022] - 该组合的肽不引起显著的组胺释放。

[0023] 从广泛分析的草表位序列中选择肽组合物以鉴定在草过敏个体中具有特别良好的 MHC 结合性质和细胞因子响应特征的核心肽。该组合可包括三个这样的肽的核心,其中每一个选自最普遍的草,猫尾草、黑麦草和狗牙根。该组合可包括四种这样的肽的核心,这些肽中的每一种选自在肽的相互组合中表现为特别有效的肽。

[0024] 以这种方式提供肽的核心组,其包括代表三种最普遍的草的多肽的核心组,优选同一组合中的四种或多种不同的单独的多肽提供各种 MHC 结合表位,并从而构建冗余性以允许 MHC 的多态性性质。提供本发明的核心组,优选具有特别良好的 MHC 结合性质和细胞因子响应特征的四种或多种不同的单独的多肽提供了多种 T 细胞表位,允许为了诱导免疫耐受性而募集宽泛范围的 T 细胞特异性。因此,本发明的组合物具有超越使用单独多肽的有利额外作用。本发明人已证明:通过细胞因子响应测量,本发明的组合物能够提供对多态性研究群体的极高覆盖。

[0025] 因此,本发明提供了适用于通过免疫耐受作用预防或治疗草花粉过敏症的组合物,该组合物包括:

[0026] (a) 多肽 Tim07B(KIPAGELQIIDKIDA)、Tim 10B(KYTVFETALKKAITAMSE)、Tim 04A(WGAIWRIDTPDKL)、Tim 07G(FKVAATAANAAPANDK)、或其任何一种的变体中的至少一种；

[0027] (b) 多肽 Ber01(SGKAFGAMAKKGQED)、Ber02(FIPMKSSWGA)、Ber02C(KSSWGAIWRIDPKKPLK) 和 Ber 02B(KDSDEFIPMKSSWGAIWR)、或其任何一种的变体中的至少一种；和

[0028] (c) 多肽 Bio04A(LKKAVTAMSEAEK)、Rye09B(PEVKYAVFEAALTKAIT)、Bio02A(KYDAYVATLLEALR)、Bio03A(KFIPTLVAAVKQAYAAKQ)、Rye 08A(ETYKFIPSLEAAVKQAY)、Rye 05C(NAGFKA AVAAAAANAPPK)、或其任何一种的变体中的至少一种，

[0029] 其中所述变体是：

[0030] I) 长度为最多 30 个氨基酸的较长的多肽，其包括 (a)、(b) 或 (c) 中指定的相应多肽的序列，或

[0031] II) 长度为 9 至 30 个氨基酸的多肽，其包括与 (a)、(b) 或 (c) 中指定的相应多肽的序列具有至少 65%同源性的序列，该序列能够使得免疫耐受所述相应多肽；或

[0032] III) 长度为 9 至 30 个氨基酸的多肽，其包括 (a)、(b) 或 (c) 中指定的相应多肽的序列中至少 9 个连续氨基酸的序列，或与所述至少 9 个连续氨基酸具有至少 65%同源性的序列，所述至少 9 个连续氨基酸的序列或同源性序列能够使得免疫耐受所述相应的多肽。

[0033] 本发明还包括适用于通过免疫耐受作用预防或治疗草花粉过敏症的组合物，该组合物包括至少四种不同的选自以下的多肽：

[0034] (a) Tim07B(KIPAGELQIIDKIDA) 或其变体；

[0035] (b) Ber01(SGKAFGAMAKKGQED) 或其变体；

[0036] (c) Bio04A(LKKAVTAMSEAEK) 或其变体；

[0037] (d) Rye09B(PEVKYAVFEAALTKAIT) 或其变体；

[0038] (e) Ber02(FIPMKSSWGA) 或其变体；

[0039] (f) Ber02C(KSSWGAIWRIDPKKPLK) 或其变体；

[0040] (g) Bio03A(KFIPTLVAAVKQAYAAKQ) 或其变体；和

[0041] (h) Bio02A(KYDAYVATLLEALR) 或其变体；

[0042] 其中所述变体是：

[0043] I) 长度为最多 30 个氨基酸的较长的多肽，其包括 (a) 至 (h) 中指定的相应多肽的序列，或

[0044] II) 长度为 9 至 30 个氨基酸的多肽，其包括与 (a) 至 (h) 中指定的相应多肽的序列具有至少 65%同源性的序列，该序列能够使得免疫耐受所述相应多肽；或

[0045] III) 长度为 9 至 30 个氨基酸的多肽，其包括 (a) 至 (h) 中指定的相应多肽的序列中至少 9 个连续氨基酸的序列，或与所述至少 9 个连续氨基酸具有至少 65%同源性的序列，所述至少 9 个连续氨基酸的序列或同源性序列能够使得免疫耐受所述相应的多肽。

[0046] 本发明的组合物通常能够使得群体中一组草花粉过敏性个体的至少 50%或至少 60%免疫耐受，和 / 或包括至少一种另外的多肽，最多总共 14 种多肽，其中所述另外的多肽：(a) 包括与以下所描述的 SEQ ID NO:1 至 73 的任何一种中的至少 9 个或更多个连续氨基酸具有至少 65%序列同一性的序列；和 (b) 长度为 9 至 30 个氨基酸。

[0047] 本文提及的序列的描述

[0048] SEQ ID NO :1 至 73 提供如表 2 至 4 列出的本发明的多肽序列。SEQ ID NO. 1 至 27 对应于来自组 1 草过敏原的肽。SEQ ID NO. 28 至 73 对应于来自组 5 过敏原的肽。

[0049] 发明详述

[0050] 本发明涉及可用于免疫耐受作用的肽。这样的肽可来源于本文所描述的任何草过敏原或是如以下所描述的其变体。与基于肽免疫作用的去敏化方法相关的困难是：如何选择过敏原的适当的大小和区域以作为用于免疫作用的肽的基础。选择的肽的大小是关键。如果肽过小，疫苗可能不会有效诱导免疫应答。如果肽过大，或如果将全抗原导入到个体中，存在诱导有害反应的风险，比如过敏反应，这可能是致命的。

[0051] 已经选择本发明的肽以保留 T 细胞特异性，而同时尺寸足够小以不具有显著的三级结构，这将使其能够保留完整分子的 IgE 结合表位的构象。因此本发明的多肽不会引起细胞上邻近特异性 IgE 分子的显著性交联且因此不会导致显著的组胺释放，所述细胞比如肥大细胞和嗜碱性粒细胞。

[0052] 本发明的优势是肽能够宽泛地靶向主要组织相容性复合物 (MHC) 分子的能力。T 细胞受体 (TCR) 的特异性是高度可变的。如抗体分子一样，通过细胞内的基因重组事件产生了可变性。TCR 识别与由主要组织相容性复合物 (MHC) 的基因编码的分子结合的短肽形式的抗原。这些基因产物是同样的分子，产生用于移植的“组织类型”，且还被称为人类白细胞抗原分子 (HLA)，这些术语可被互换地使用。单独的 MHC 分子具备肽结合沟，由于它们的形状和电荷其只能够结合有限的一组肽。被一个 MHC 分子结合的肽可能不一定被其它 MHC 分子结合。

[0053] 当蛋白分子诸如抗原或过敏原被抗原呈递细胞诸如 B 淋巴细胞、树突细胞、单核细胞和巨噬细胞吸收时，该分子在细胞中被酶促降解。降解过程产生所述分子的肽片段，如果它们具有合适的大小、电荷和形状，则可能结合到某些 MHC 分子的肽结合沟之内，并随后展示在抗原呈递细胞表面上。如果肽 /MHC 复合物以足够数量呈递在抗原呈递细胞表面上，则它们可能活化带有合适的肽 /MHC 特异性 T 细胞受体的 T 细胞。

[0054] 由于 MHC 的多态性质，远系繁殖群体诸如人类中的个体将在其细胞表面上表达不同组合的 MHC 分子。由于不同 MHC 分子可基于肽的大小、电荷和形状而结合来自同一分子的不同肽，不同个体将展示与其 MHC 分子结合的不同库的肽。鉴定远系繁殖群体诸如人类中的通用 MHC- 结合肽表位比在近亲繁殖的动物（诸如实验小鼠的某些品系）中更困难。基于个体之间 MHC 的差异表达以及其带来的肽结合与呈递的固有差异，不太可能鉴定可用于人类去敏化治疗的单种肽。

[0055] 如以下所讨论的，本发明通过提供基于一种以上的肽的组合物，即肽组合，而解决该问题。这些组合以肽的核心组为基础，这些肽当被单独检验时，实验上鉴定为在草过敏性患者中表现出令人惊奇地强的响应，且当以组合来提供时，响应尤其强。当肽的这些核心亚组被包括在草肽疫苗中时具有有利的性质。

[0056] 核心组可包括至少一种来源于猫尾草的肽，至少一种来源于黑麦草的肽和至少一种来源于狗牙根的肽，每种肽显示了特别良好的单独的响应特性。将这些肽包括在组合中允许覆盖三种最普遍的草，并且如以下所进一步讨论地，通过同源性另外扩及覆盖其它的草。

[0057] 另外，核心组可包括至少四种肽，该肽选自在检验的组中具有高等级的单独响应

特性且被进一步证明当一起组合来提供时为草疫苗提供最优响应特性的肽。

[0058] 这样的肽组合优选地包括至少一种来源于组 I 草过敏原的肽或其变体和至少一种来源于组 V 草过敏原的肽或其变体。草过敏原分类为组 I 草过敏原和组 V 草过敏原是技术人员所熟知的,且在本文中被进一步讨论。优选的组 I 草过敏原是狗牙根过敏原, Cyn d 1。优选的组 V 过敏原是黑麦草过敏原, Lo1 p 5。在一些实施方案中,本发明涉及包括至少一种来源于 Cyn d1 的肽或其变体和至少一种来源于 Lo1 p 5 的肽或其变体。基于 Cyn d 1 肽和 Lo1 p 5 肽或它们的变体的组合的组合物在以下被进一步讨论。

[0059] 本发明的优选的肽可包括 SEQ ID NO :1 至 73 的任何一个中所示的序列,可由 SEQ ID NO :1 至 73 的任何一个中所示的序列组成,或可基本上由 SEQ ID NO :1 至 73 的任何一个中所示的序列组成。这些特定肽的变体也可被使用。变体可包括作为 SEQ ID NO :1 至 73 的任何一个的片段或 SEQ ID NO :1 至 73 的任何一个的同源物的序列,可由作为 SEQ ID NO :1 至 73 的任何一个的片段或 SEQ ID NO :1 至 73 的任何一个的同源物的序列组成,或可基本上由作为 SEQ ID NO :1 至 73 的任何一个的片段或 SEQ ID NO :1 至 73 的任何一个的同源物的序列组成。

[0060] 这样本发明提供了适用于通过免疫耐受作用预防或治疗草花粉过敏症的组合物,该组合物包括:

[0061] (a) 多肽 Tim07B(KIPAGELQIIDKIDA)、Tim 10B(KYTVFETALKKAITAMSE)、Tim 04A(WGAIWRIDTPDKL)、Tim 07G(FKVAATAANAAPANDK)、或其任何一种的变体中的至少一种;

[0062] (b) 多肽 Ber01(SGKAFGAMAKKGQED)、Ber02(FIPMKSSWGA)、Ber02C(KSSWGAIWRIDPKKPLK)和 Ber 02B KDSDEFIPMKSSWGAIWR、或其任何一种的变体中的至少一种;

[0063] (c) 多肽 Bio04A(LKKAVTAMSEAEK)、Rye09B(PEVKYAVFEAALTKAIT)、Bio02A(KYDAYVATLTEALR)、Bio03A(KFIPTLVAAVKQAYAAKQ)、Rye 08A(ETYKFIPSLEAAVKQAY)、Rye 05C(NAGFKA AVAAAANAPPK)、或其任何一种的变体中的至少一种,

[0064] 其中所述变体是:

[0065] I) 长度为最多 30 个氨基酸的较长的多肽,其包括 (a)、(b) 或 (c) 中指定的相应多肽的序列,或

[0066] II) 长度为 9 至 30 个氨基酸的多肽,其包括与 (a)、(b) 或 (c) 中指定的相应多肽的序列具有至少 65%同源性的序列,该序列能够使得免疫耐受所述相应多肽;或

[0067] III) 长度为 9 至 30 个氨基酸的多肽,其包括 (a)、(b) 或 (c) 中指定的相应多肽的序列中至少 9 个连续氨基酸的序列,或与所述至少 9 个连续氨基酸具有至少 65%同源性的序列,所述至少 9 个连续氨基酸的序列或同源性序列能够使得免疫耐受所述相应的多肽。

[0068] a) 至 c) 的其它优选的变体是:

[0069] i) 具有 9 至 30 个氨基酸的长度且包括由以下组成的区域的多肽:

[0070] -a) 至 c) 的对应序列中的任何一种,或

[0071] -与 a) 至 c) 的对应序列中的任何一种具有至少 65%同源性的序列,该序列能够使个体免疫耐受 a) 至 c) 的序列中的任何一种,或

[0072] ii) 具有 9 至 30 个氨基酸的长度且包括由代表以下任何一种的序列组成的区域的多肽:

[0073] -a) 至 c) 的序列中的任何一种的片段,或

[0074] -a) 至 c) 的序列中的任何一种的片段的同源物,

[0075] 所述序列能够使个体免疫耐受 a) 至 c) 的序列中的任何一种,且具有至少 9 个氨基酸的长度,且其中所述同源物与 a) 至 c) 的序列中的任何一种中的任何 9 个连续氨基酸具有至少 65% 的同源性;其中任选地,四个多肽中无一是由 a) 至 c) 的任何一个所定义的同一直链多肽的变体。

[0076] 因而组合物至少包括三种多肽,第一多肽是 a) 的多肽或其变体,第二多肽是 b) 的多肽或其变体,第三多肽是 c) 的多肽或其变体。这样,例如组合物可包括 Tim07B 的变体、Ber01、和 Rye09B 的变体。优选地,以上组合物除核心三种多肽之外包括 a)、b) 或 c) 或其任何一个的变体的第四多肽。组合物可包括 a)、b) 或 c) 或其变体的四种、五种、六种、七种、八种或以上的多肽。

[0077] 在一些方面,组合物可包括 a) 或其变体的两种、三种、四种或更多种多肽。在另外的方面,组合物可包括 b) 或其变体的两种、三种、四种或更多种多肽。在其它的方面,组合物可包括 c) 或其变体的两种、三种、四种、五种、六种或更多种多肽。这些选择以组合物包括 a) 或其变体的至少一种多肽、b) 或其变体的至少一种多肽为条件。选自组 a)、b) 和 c) 的三种多肽的优选的组合是多肽 Tim07B 或其变体、多肽 Ber01 或其变体、和多肽 Bio04A 或其变体。

[0078] 组合物可包括至少两种选自组 a) 或其变体的多肽,至少两种选自组 b) 或其变体的多肽和至少两种选自组 c) 或其变体的多肽。

[0079] 优选的组合物可包括多肽 Tim07B 或其变体、和至少两种、三种或四种选自组 b) 或其变体的多肽。该优选的组合物可包括两种或三种选自组 c) 或其变体的多肽,优选地包括 Bio04A 或其变体。另一个优选的组合物可包括多肽 Tim07B 或其变体、和至少两种、三种或四种选自组 c) 或其变体的多肽。该优选的组合物可包括两种或三种选自组 b) 或其变体的多肽,优选地包括 Ber01 或其变体。

[0080] 基于 a) 至 c) 的以上所有组合物可包括选自 SEQ ID NO 1 至 74 的任何一个或其变体、且先前根据 a) 至 c) 未选择的另外的多肽。

[0081] 本发明还提供了适宜于通过免疫耐受作用预防或治疗草花粉过敏症的组合物,该组合物包括至少四种不同的选自以下的多肽:

[0082] (a)Tim07B(KIPAGELQIIDKIDA) 或其变体;

[0083] (b)Ber01(SGKAFGAMAKKGQED) 或其变体;

[0084] (c)Bio04A(LKKAVTAMSEAEK) 或其变体;

[0085] (d)Rye09B(PEVKYAVFEAALTKAIT) 或其变体;

[0086] (e)Ber02(FIPMKSSWGA) 或其变体;

[0087] (f)Ber02C(KSSWGAIWRIDPKKPLK) 或其变体;

[0088] (g)Bio03A(KFIPTLVAAVKQAYAAKQ) 或其变体;和

[0089] (h)Bio02A(KYDAYVATLLEALR) 或其变体;

[0090] 其中所述变体是:

[0091] I) 长度为最多 30 个氨基酸的较长的多肽,其包括 (a) 至 (h) 中指定的相应多肽的序列,或

[0092] II) 长度为 9 至 30 个氨基酸的多肽,其包括与 (a) 至 (h) 中指定的相应多肽的序列具有至少 65%同源性的序列,该序列能够使得免疫耐受所述相应多肽;或

[0093] III) 长度为 9 至 30 个氨基酸的多肽,其包括 (a) 至 (h) 中指定的相应多肽的序列中的至少 9 个连续氨基酸的序列,或与所述至少 9 个连续氨基酸具有至少 65%同源性的序列,所述至少 9 个连续氨基酸的序列或同源性序列能够使得免疫耐受所述相应的多肽。

[0094] a) 至 h) 的其它优选的变体是:

[0095] i) 具有 9 至 30 个氨基酸的长度且包括由以下组成的区域的多肽:

[0096] -a) 至 h) 的对应序列中的任何一种,或

[0097] -与 a) 至 h) 的对应序列中的任何一种具有至少 65%同源性的序列,该序列能够使个体免疫耐受 a) 至 h) 的序列中的任何一种,或

[0098] ii) 具有 9 至 30 个氨基酸的长度且包括由代表以下任何一种的序列组成的区域的多肽:

[0099] -a) 至 h) 的序列中的任何一种的片段,或

[0100] -a) 至 h) 的序列中的任何一种的片段的同源物,

[0101] 所述序列能够使个体免疫耐受 a) 至 h) 的序列中的任何一种,且具有至少 9 个氨基酸的长度,且其中所述同源物与 a) 至 h) 的序列中的任何一种中的任何 9 个连续氨基酸具有至少 65%的同源性;其中任选地,四种多肽中无一是由 a) 至 h) 的任何一种所定义的同一直原始序列的变体。

[0102] 因而组合物至少包括四种多肽,所述四种多肽中的每一种选自 a) 至 h) 的多肽或其变体。以上组合物可包括 a) 至 h) 或其任何一种的变体的另外的多肽,比如 a) 至 h) 或其变体的五种、六种、七种、八种或更多种多肽。

[0103] 在一些方面,组合物可包括 a) 或其变体的多肽,至少一种选自 b)、e) 或 f) 或其任何一种的变体的多肽,和至少一种选自 c)、d)、g) 或 h) 或其变体的多肽。可选地,组合物可优选地包括 a) 或其变体的多肽、和至少两种或三种选自 b)、e) 或 f) 或其任何一种的变体的多肽。该组合物可优选地包括多肽 Ber01 或其变体。在另一个实施方案中,组合物可包括 a) 或其变体的多肽和至少两种、三种或四种选自 c)、d)、g) 或 h) 或其任何一种的变体的多肽。该组合物可优选地包括多肽 Bio04A 或其变体。

[0104] 所有这些组合物可优选地包括多肽 Tim07B 或其变体,多肽 Ber01 或其变体,和多肽 Bio04A 或其变体。

[0105] 以上选自 a) 至 h) 的组合物优选地包括 a) 至 h) 的至少四种不同的多肽或包括至少四种变体,所述变体的每一种对应于 a) 至 h) 的不同的原始或基线序列。这样,该组合物通常以起源的四种不同的表位序列为基础来选择。优选地,该组合物包括狗牙根起源的至少一种表位序列,黑麦草起源的至少一种表位序列和猫尾草起源的至少一种表位序列。相关表位序列可选自 SEQ ID NO 1 至 74 中的任何一种或其变体。

[0106] 基于 a) 至 h) 的以上所有组合物可因而包括选自 SEQ ID NO 1 至 74 的任何一种或其变体、且先前根据 a) 至 h) 未选择的另外的多肽。所有选择以该组合物包括至少四种选自 a) 至 h) 或其变体的多肽为条件。

[0107] 任选地,本文所描述的特定多肽的任何组合物可包括另外的多肽而最多总共 14 种独特的多肽。另外的多肽通常与不在已选择的多肽中的其它序列,即 SEQ ID NO:1 至 73

相关（即，通常为其同源物和 / 或其片段）。另外的肽通常是 SEQ ID NO :1 至 73 的肽中其的功能性变体。另外的肽可以与 SEQ ID NO :1 至 73 中的任何一种相同。因此该组合物可包括最多十四种不同的多肽，所述多肽如 SEQ ID NO :1 至 73 中任何一种所提供的，以至少一种多肽选自如上所定义的 (a) 和 (b) 的每种为条件。然而，任选的另外的多肽不需要与 SEQ ID NO :1 至 73 的任何一种 100% 相同。它们优选地与 SEQ ID NO :1 至 73 的任何一种中的至少 9 个（例如至少 10、11、12 或 13 个）或更多个连续氨基酸至少 65% 相同，而非在选自 (a) 和 (b) 的每一种的至少一种多肽中已选择的。这些连续氨基酸可包括 MHC II 类表位，例如其与本文所述的 MHC 分子中的任何一种相结合。

[0108] 本发明还提供了用于通过免疫耐受来预防或治疗草过敏症、包括本发明的多肽的产物和制剂，和包括能够表达本发明的多肽的多核苷酸的组合物、产物和载体。所述免疫耐受通常将针对 SEQ ID NO :1 至 74 中任何一种中存在的表位（例如 MHC II 类 - 结合的 T 细胞表位）。

[0109] 草物种

[0110] 草物种黑麦草 (*Lolium perenne*)、猫尾草 (*Phleum pratense*) 和狗牙根 (*Cynodon dactylon*) 在世界范围造成高比例的草过敏症，尤其是与草花粉相关的过敏症，比如干草热。其它重要的草物种包括绒毛草 (*Holcus lanatus*)、鸭茅 (*Dactylis glomerata*)、加那利草 (*Phalaris canariensis*) 和草地早熟禾 / 肯塔基蓝草（草地早熟禾 (*Poa pratensis*)）。

[0111] 黑麦草是最常见的草之一，并广泛用作动物饲料的来源。其原产于欧洲，但已被引进到世界所有大陆上，并且在所有温带都是常见的。其花期可贯穿整个夏季，但在北半球通常在 5 月到 7 月之间。黑麦草良好适应于温和、湿润的温带气候，并且在相对粘重、肥沃、滋润的土地上生长得最好。其在充分施肥的具有足够水分的轻质土壤上也生长良好。其不喜阴且需要排水良好的土壤。黑麦草通常生长于土壤 pH 在从约 6 到约 7 的范围内的位置处，但其可耐受从约 4.5 到约 8.5 的范围，优选地年降水量在约 21 到约 180cm 的范围。

[0112] 猫尾草是世界上另一种最常见的草，并且是动物饲料的首要来源。其原产和分布于欧洲、北非和亚洲北部的大部分。其已被引进到北美和南美、南非和澳洲并在那里广泛分布。猫尾草通常生长于年降水量在约 35 到约 180cm 的范围、年平均温度在约 4 到约 22°C 的范围和土壤 pH 为约 4.5 到约 8 的位置。其良好适应于凉的、湿润的温带气候，在粘重的、深层的和湿润的土壤或甚至湿地上生长得最好。生长的最佳温度在 18-21°C 间变化，且昼 / 夜温度为 15/10°C 和 21/15°C。猫尾草花期通常限于初夏且猫尾草花粉是这个季节中草过敏症的主要原因。在研究中，已发现达 21% 的患有过敏性鼻炎或其它症状的患者对猫尾草花粉响应。

[0113] 狗牙根通常生长于年降水量为约 9 至约 429cm、年平均温度范围为约 5 到约 28°C 和土壤 pH 在约 4 到约 8.5，优选地约 6 到约 7 的范围的位置。狗牙根花期通常在夏末（北半球的 8 月到 10 月）。狗牙根植物产生大量的花粉且因此是干草热的主要原因。还已报道狗牙根植物导致接触性皮炎。狗牙根在世界范围广泛生长，主要在温暖的气候中，且通常发现于约北纬 30° 到约南纬 30° 的纬度之间。

[0114] 组 1 和组 5 草花粉过敏原的肽片段

[0115] 主要的草过敏原包括组 1 草花粉过敏原和组 5 草花粉过敏原。将来自不同物种的蛋白根据氨基酸序列同源性分组。例如，组 1 主要草花粉过敏原包括猫尾草蛋白 Ph1 p 1

和黑麦草蛋白 Lol p 1, 组 5 主要草花粉过敏原包括猫尾草蛋白 Phl p 5 和黑麦草蛋白 Lol p 5。

[0116] 本发明人已鉴定了某些草花粉过敏原蛋白中包括 MHC II 类结合 T 细胞表位的区域。本发明人也已证明, 主要草花粉过敏原中对应于 MHC II 类结合 T 细胞表位的区域在给定的组中的代表之间是高度保守的, 参见, 例如, 实施例 2。基于该信息, 来源于给定的组中的蛋白的相关区域的肽适宜于通过免疫耐受该组中的草过敏原而预防或治疗草过敏症。例如, 来自, 例如猫尾草的 Phl p 1 或黑麦草的 Lol p 1 的相关区域适用于通过免疫耐受组 1 草过敏原而预防或治疗草过敏症。

[0117] 本发明的肽来源于组 1 (SEQ ID NO :1 至 27) 和组 5 (SEQ ID NO :28 至 73) 草过敏原。术语“肽”和“多肽”在本文中可互换使用。以上的蛋白在本文中还被称作“过敏原”。

[0118] 表 2 至 4 列出了本发明的肽的序列, 指明了每种肽所来源的母体蛋白质。

[0119] 当本发明的组合物包括四种或更多种选自 a) 至 h) 的多肽或其变体的多肽时, 该组合物通常包括选自 a) SEQ ID NO :1 至 27 ; 和 b) SEQ ID NO :28 至 73 的每一种的至少一种多肽或其变体 (例如功能性变体)。该组合物可包括选自 a) SEQ ID NO :1 至 27 ; 和 b) SEQ ID NO :28 至 73 的每一种的至少两种、至少三种、至少四种、至少五种、至少六种或至少七种多肽或其变体 (例如功能性变体)。在一些实施方案中, 该组合物可包括选自 a) SEQ ID NO :1 至 10 ; 和 b) SEQ ID NO :28 至 52 的每一种的至少一种多肽或其变体 (例如功能性变体)。该组合物可包括选自 a) SEQ ID NO :1 至 10 ; 和 b) SEQ ID NO :28 至 52 的每一种的至少两种、至少三种、至少四种、至少五种、至少六种或至少七种多肽或其变体 (例如功能性变体)。

[0120] 如以上概述, 因此, 基于 a) 至 h) 的多肽或其变体的优选的组合物包括组合物中包括至少一种来源于 Cyn d 1 或其变体的肽和至少一种来源于 Lol p 5 或其变体的肽的那些组合物。特别优选的组合物是包括至少一种来源于 Cyn d 1 或其变体的肽、至少一种来源于 Lol p 5 或其变体的肽和至少一种来源于 Phl p 5 的肽的那些组合物。在一些实施方案中, a) 至 h) 的组合物可包括来源于 Cyn d 1 或其变体的两种、三种、四种或更多种肽和 / 或来源于 Lol p 5 或其变体的两种、三种、四种或更多种肽。在一些实施方案中, 该组合物可由来源于 Cyn d 1 和 Lol p 5 或其变体的肽组成, 或基本上由来源于 Cyn d 1 和 Lol p 5 或其变体的肽组成。在另一些实施方案中, 该组合物任选地不包括来源于 Lol p 1 或其变体的肽。

[0121] 如上所讨论的, 基于 Cyn d 1 和 Lol p 5 肽的组合物在草过敏症的治疗中特别有用。

[0122] 本发明的特别优选的组合物包括 : 包括以下、由以下组成或基本上由以下组成的那些组合物 :

[0123] a) 如本文所定义的 SEQ ID NO :1、2 和 5 的多肽或其变体中的至少一种 ;

[0124] b) 如本文所定义的 SEQ ID NO :28、29、31 和 46 的多肽或其变体中的至少一种 ; 和任选地

[0125] c) 如本文所定义的 SEQ ID NO :69 的多肽或其变体。

[0126] 这些组合物提供了特别优选的 Cyn d 1 肽、特别优选的 Lol p 5 肽、和任选地, 特别优选的 Phl p 5 肽。更优选地, 该组合物包括如 a) 中所定义的至少两种或所有三种多肽, 和如 b) 中所定义的至少两种或至少三种多肽。仍为优选地, 该组合物包括如 c) 中所定义的

多肽。特别优选地,组合物包括 i) SEQ ID NO :1, ii) SEQ ID NO :2 和 SEQ ID NO :5 中的一种 ;和 iii) SEQ ID NO :46。

[0127] 具体的优选的组合物包括组合 1 至 10,如表 7 中所列。在所述组合物中,SEQ ID NO :1、2、5、28、29、31、46 和 69 的单独的多肽的一种或多种可任选地替代其变体。在一些实施方案中,存在于组合 1 至 10 的 SEQ ID NO :1、2、5、28、29、31、46 和 69 的多肽中的两种、三种、四种、五种或更多种可被其变体替代。被其变体替代的多肽的数目通常取决于该组合物中所包括的多肽的总数目。例如,在基于四种多肽的组合(即,组合 6、8、10)中,优选地仅有一种或两种多肽被其变体替代。可选地,包括选自 SEQ ID NO :1、69、31、46、2、5、29、28、43、53、35、27、4 和 70 的任何一种或其变体的四种或更多种多肽的任何组合物也是优选的。

[0128] 更优选的组合物包括 SEQ ID NO :1、2、5、28、31、91 和 93 或其变体的多肽,由 SEQ ID NO :1、2、5、28、31、91 和 93 或其变体的多肽组成,或基本上由 SEQ ID NO :1、2、5、28、31、91 和 93 或其变体的多肽组成。其它优选的组合物包括 SEQ ID NO :1、2、5、28、31、91 和 93、或替代这些多肽的一种、两种或三种、四种或更多种的它们的变体。在一些实施方案中,以上 7 种肽组合物不包括任何其它的多肽或不包括任何其它的来源于草过敏原的多肽。在优选的实施方案中,组合物包括 SEQ ID NO :1、2、5、28、31、91 和 93 或其变体,且不包含与本文所述的任何草物种的蛋白具有超过 20% 的同源性的任何另外的蛋白。以上组合物可包括另外的非肽组分,比如载体或佐剂。

[0129] 本发明还提供了产物,所述产物包括以下:

[0130] (a) 多肽 Tim07B(KIPAGELQIIDKIDA)、Tim10B(KYTVFETALKKAITAMSE)、Tim04A(WGAIWRIDTPDKL)、Tim 07G(FKVAATAANAAPANDK)、或如本文所描述的其任何一种的变体;

[0131] (b) 多肽 Ber01(SGKAFGAMAKKGQED)、Ber02(FIPMKSSWGA)、Ber02C(KSSWGAIWRIDPKKPLK) 和 Ber02B KDSDEFIPMKSSWGAIWR 中的至少一种、或如本文所描述的其任何一种的变体 ;和

[0132] (c) 多肽 Bio04A(LKKAVTAMSEAEK)、Rye09B(PEVKYAVFEAALTKAIT) 和 Bio02A(KYDAYVATLTEALR)、Bio03A(KFIPTLVAAVKQAYAAKQ)、Rye 08A(ETYKFIPSLEAAVKQAY)、Rye 05C(NAGFKA AVAAAAANAPPK) 中的至少一种、或如本文所描述的其任何一种的变体,其中每种不同的多肽是供同时地、分别地或顺序地用于通过免疫耐受预防或治疗草花粉过敏症。

[0133] 本发明的产物中的四种或更多种多肽可按照与通过免疫耐受作用而用于草过敏症的预防或治疗的本发明的组合物有关的以上所述的相同标准来选择。

[0134] 变体

[0135] 因此,本发明的组合物或产物可包括 SEQ ID NO :1 至 73 的任何一种的变体。变体通常包括存在于 SEQ ID NO :1 至 73 的相应的肽中的 MHC II 类表位的 1 个、2 个、3 个或更多个。

[0136] 本文提到了功能性变体。该变体可能能够使个体免疫耐受存在于 SEQ ID NO :1 至 59 的相应的肽中的 MHC II 类表位,并因而其将通常包括与同样的 MHC II 类分子结合和 / 或被识别 SEQ ID NO :1 至 73 的多肽中相应的表位的 T 细胞所识别的序列。该序列因此能够使得免疫耐受天然多肽中相应的序列。因此变体多肽可使得免疫耐受相应的天然多肽。

[0137] SEQ ID NO:1 至 73 的变体可以通过截短衍生的片段,例如,通过从多肽的 N 末端和 / 或 C 末端去除一个或多个氨基酸。片段还可以通过一个或多个内部缺失来生成,条件是组成 T 细胞表位的核心 9 个氨基酸基本上不被破坏。

[0138] 例如,SEQ ID NO:1 的变体可包括 SEQ ID NO:1 的片段,即,较短序列。这可包括从 SEQ ID NO:1 的 N-末端或从 SEQ ID NO:1 的 C-末端缺失一个、两个、三个或四个氨基酸。这样的缺失可从 SEQ ID NO:1 的两端进行。SEQ ID NO:1 的变体可包括延伸超出 SEQ ID NO:1 的末端的另外的氨基酸(例如来自衍生肽的亲本蛋白的序列)。变体可包括以上讨论的缺失和添加的组合。例如,可从 SEQ ID NO:1 的一端缺失氨基酸,但可在 SEQ ID NO:1 的另一端添加来自全长亲本蛋白序列的另外的氨基酸。以上变体的相同讨论还适用于 SEQ ID NO:2 至 73。

[0139] 变体肽可包括 SEQ ID NO:1 至 73 任一种或其片段的氨基酸序列中的一个或多个氨基酸取代。变体肽可包括与 SEQ ID NO:1 至 73 任一种中至少 9 个或更多个连续氨基酸具有至少 65% 序列同一性的序列。更优选地,合适的变体可包括与 SEQ ID NO:1 至 73 任一种的至少 9 个连续氨基酸至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95% 或至少 98% 的氨基酸同一性。这一水平的氨基酸同一性可见于肽的任何区段,尽管它优选地是核心区域。氨基酸同一性的水平是超出至少 9 个连续氨基酸,但它可以是至少 10、11、12、13、14、15 或至少 16 或 17 个氨基酸,这取决于比较的肽的大小。因此,任何以上指明的同一性水平可跨越序列的完整长度。

[0140] 以与本发明的特别优选的肽的序列同一性为基础选择的优选变体的例子是:

[0141] Ber01(SEQ ID NO:1) 的变体:SGKAFGAMAKKGEED(SEQ ID NO:74),绒毛草 Ho1 1 1;草地早熟禾 Poa p 1;SGHAFGSMAMKGEED(SEQ ID NO:75),鸭茅 Dac g 1;黑麦草 Lol p 1;SGIAFGSMAMKGDDED(SEQ ID NO:76),猫尾草 Ph1 p 1,SGTAFGAMAKKGEED(SEQ ID NO:77),玉米 (Zea mays)Zea m 1。

[0142] Bio02A(SEQ ID NO:28) 的变体:KYDAYVATLTESLR(SEQ ID NO:78),大麦 (Hordeum vulgare)Hor v 5;KYDAYVATLSEALR(SEQ ID NO:79),猫尾草 Ph1 p 5;草地早熟禾 Poa p 9;KYDAFVAALTEALR(SEQ ID NO:80),鸭茅 Dac g 5;KYDAFVTTLTEALR(SEQ ID NO:81),绒毛草 Ho1 1 5。

[0143] Bio03A(SEQ ID NO:29) 的变体:KFIPTEAAVKQAYAA(SEQ ID NO:82),鸭茅 Dac g 5;藨草 (Phalaris aquatica)Pha a 5;KFIPALEAAVKQAYAA(SEQ ID NO:83),猫尾草 Ph1 p 5。

[0144] Tim07B(SEQ ID NO:69) 的变体:KIPAGELQIVDKIDA(SEQ ID NO:84),鸭茅 Dac g 5;藨草 Pha a 5;KIPTGELQIVDKIDA(SEQ ID NO:85),黑麦草 Lol p 5;KIPAGEQQIIDKIDA(SEQ ID NO:86),草地早熟禾 Poa p 5。Tim07B 在绒毛草 Ho1 15b 中也是保守的。

[0145] Bio04A(SEQ ID NO:31) 的变体:LKKAITAMSEAQK(SEQ ID NO:87),猫尾草 Ph1 p 5;绒毛草 Ho1 1 5b;LKKAITAMSQAQK(SEQ ID NO:88),草地早熟禾 Poa p 5。

[0146] Ber02C(SEQ ID NO:5) 的变体:KESWGAIWRIDTPDK(SEQ ID NO:89),藨草 Pha a 1;猫尾草 Ph1 p 1。

[0147] Rye09B(SEQ ID NO:46) 的变体:PQVKYAVFEAALTKAIT(SEQ ID NO:90),猫尾草 Ph1 p 5。

[0148] 这样, SEQ ID NO :74 至 90 是可作为以上天然肽的替代物用于本发明的组合物中的优选的变体。用于本发明的天然肽的其它优选变体来源于玉米过敏原。玉米过敏原与草花粉过敏原具有很近的同源性, 且因此来源于玉米的序列可包含用于免疫耐受草花粉过敏原的交叉反应性表位。

[0149] 关于氨基酸序列, “序列同一性”是指当使用 ClustalW(Thompson 等人, 1994, 同前) 用以下参数评价时具有指定值的序列: 成对的比对参数 - 方法: 准确, 矩阵: PAM, 缺口开放罚分: 10.00, 缺口延伸罚分: 0.10; 多比对参数 - 矩阵: PAM, 缺口开放罚分: 10.00, % 延迟同一性: 30, 处罚末端缺口: 开, 缺口间距: 0, 负矩阵: 不, 缺口延伸罚分: 0.20, 残基特异性缺口罚分: 开, 亲水缺口罚分: 开, 亲水残基: GPSNDQEK R。在特定残基的序列同一性意在包括仅仅被衍生化的相同残基。

[0150] 变体肽可包括 SEQ ID NO :1 至 73 任一种中的 1、2、3、4、5 或更多个或者多达 10 个氨基酸取代。取代变体优选地包括用相同数目的氨基酸代替一个或多个氨基酸并进行保守的氨基酸取代。例如, 可用具有相似特征的替代性氨基酸例如, 另一碱性氨基酸、另一酸性氨基酸、另一中性氨基酸、另一带电荷氨基酸、另一亲水氨基酸、另一疏水氨基酸、另一极性氨基酸、另一芳香族氨基酸或另一脂肪族氨基酸来取代氨基酸。可用于选择合适的取代基的 20 种主要氨基酸的一些特征如下:

[0151]

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

[0152] 另外的变体包括在其中出现在序列中的氨基酸而非天然存在的氨基酸是其结构类似物的那些。用于序列中的氨基酸还可被修饰例如被标记, 条件是肽的功能未显著地受到不利影响。当肽具有与 SEQ ID NO :1 至 73 任一种或其片段的序列不同的序列时, 取代可沿着序列的全长发生, 其在 SEQ ID NO :1 至 73 的任何序列之内或 SEQ ID NO :1 至 73 的任何序列之外。例如, 本文所述的变化诸如添加、缺失、取代和修饰可发生在 SEQ ID NO :1 至 73 的任何序列之内。变体肽可包括在其中已经进行了一个、两个、三个、四个或更多个氨基

酸取代的 SEQ ID NO:1 至 73 的任何氨基酸序列,或者基本上由其组成。变体肽可包括比 SEQ ID NO:1 至 73 任一个大的亲本蛋白片段。在该实施方案中,本文所述的变化诸如取代和修饰可发生在 SEQ ID NO:1 至 73 的任何序列之内和 / 或之外。

[0153] 本发明的变体肽长度是 9 至 30 个 (含) 氨基酸。优选地,它们的长度可以是 9 至 20 个氨基酸或更优选地 13 至 17 个氨基酸。所述肽可与 SEQ ID NO:1 至 73 的任何一种中的肽序列具有相同的长度。

[0154] 所述肽可化学地例如通过蛋白水解裂解衍生自多肽过敏原,或者可以有意方式从多肽过敏原衍生,例如通过利用多肽过敏原的氨基酸序列并基于该序列合成肽。可使用本领域公知方法合成肽。

[0155] 术语“肽”不仅包括在其中氨基酸残基被肽 (-CO-NH-) 键连接的分子,还包括在其中肽键被倒转的分子。这样的逆反 (retro-inverso) 模拟肽可使用本领域已知的方法制备,例如诸如 Meziere 等人 (1997) J. Immunol. 159, 3230-3237 中描述的那些。该方法包括制备包含骨架变化而非侧链定向的拟肽。Meziere 等人 (1997) 显示,至少对于 II 类 MHC 和 T 辅助细胞响应,这些拟肽是有用的。包含 NH-CO 键而非 CO-NH 肽键的逆反肽对蛋白水解的抵抗要多得多。

[0156] 类似地,可完全不需要肽键,条件是使用保持氨基酸残基的碳原子之间间距的合适的连接部分;如果所述连接部分具有与肽键大致上相同的电荷分布和大致上相同的平面性,它是特别优选的。还应理解的是,可方便地在其 N- 或 C- 末端封闭所述肽,以帮助减少对外蛋白水解消化的敏感性。例如,可通过与羧酸反应而保护肽的 N- 末端氨基,而且可通过与胺反应而保护肽的 C- 末端羧基。修饰的其它实例包括糖基化和磷酸化。另外的潜在修饰是 R 或 K 侧链胺上的氢可被亚甲基代替 (-NH₂ → -NH(Me) 或 -N(Me)₂)。

[0157] 根据本发明的肽的类似物还可包括增加或减少肽的体内半衰期的肽变体。能够增长按照本发明使用的肽的半衰期的类似物的实例包括肽的类肽类似物、肽的 D- 氨基酸衍生物和肽 - 类肽杂合体。按照本发明使用的变体多肽的另外的实施方案包括多肽的 D- 氨基酸形式。使用 D- 氨基酸而非 L- 氨基酸制备多肽大大减少正常代谢过程对这种药剂的任何不想要的破坏,减少待施用的药剂的量以及施用频率。

[0158] 本发明提供的肽可衍生自由编码亲本蛋白链的原始转录子的可变剪接产生的 mRNA 所编码的亲本蛋白的剪接变体。肽还可衍生自亲本蛋白的保持过敏原的至少 MHC 结合性质的氨基酸突变体、糖基化变体和其它共价衍生物。示例性衍生物包括这样的分子,其中本发明的肽通过取代、化学、酶促或其它合适手段被除了天然存在的氨基酸以外的部分共价修饰。还包括不同螨中发现的亲本蛋白的天然存在的变体。这样的变体可被等位变体编码或代表可变剪接变体。

[0159] 可在肽的合成期间或通过生产后修饰,或当肽是重组形式时,使用定点诱变、随机诱变或酶促裂解和 / 或核酸连接的已知技术来制备如上所述的变体。

[0160] 根据本发明,组合物可包括的另外的一种或多种肽优选地是 SEQ ID NO:1 至 73 任一种的功能变体。也就是说,肽优选地能够引起免疫应答。特别地,它们能够在具有草过敏原的个体中诱导晚期响应。这可通过肽在 T 细胞样品中诱导 T 细胞增殖的能力来检验。检验诱导 T 细胞增殖的方法是本领域中熟知的,且实施例 4 中示出了一个此类的方法。优选地,一种或多种另外的肽能够在至少 20% 的 T 细胞样品中导致 T 细胞增殖,其中每个样品获

自群体中不同的草过敏性个体。本发明的组合物优选地能够在 30%或以上获自一组草过敏性个体的 T 细胞样品中诱导 T 细胞增殖。更优选地,组合物能够在 35%或以上、40%或以上、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%或 90%或以上获自一组中敏化个体的样品中诱导 T 细胞增殖。

[0161] 组合物还可以能够诱导获自一组中敏化个体的 T 细胞样品中一种或多种细胞因子的显著释放,所述细胞因子优选地包括干扰素 γ 、白介素-10 和白介素-13 中的一种或多种。“显著”释放可通过与以下实施例 5 中所描述的相似的标准来确定。这样,组合物可能能够在 35%或以上、40%或以上、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%或 90%或以上获自一组中敏化个体的样品中诱导一种或多种细胞因子的释放。一组草过敏性个体中的个体的数目可以是大于一的任何数目,例如至少 2 个、3 个、5 个、10 个、15 个、20 个、30 个、50 个、80 个或至少 100 个个体。

[0162] 如果肽引起 T 细胞增殖,但不导致组胺从来自敏化个体的嗜碱性粒细胞和肥大细胞制备物中释放是优选的。可能存在一些组胺释放,但优选地,组合物不引起大量组胺释放。当利用组合物对来自个体的白细胞样品进行体外刺激时,显著的组胺释放可认为是释放总可获得的白细胞组胺的 20%或以上。正常个体通常具有约 $150\text{ng}/10^7$ 个细胞的白细胞组胺含量。

[0163] 能够结合 TCR 的适宜的变体可根据经验衍生或根据已知标准选择。在单个肽中,存在有助于 MHC 抗原结合沟中的结合的某些残基,以及与 T 细胞受体的高变区相互作用的其它残基 (Allen 等人 (1987) *Nature* 327 :713-5)。

[0164] 在有助于 T 细胞受体相互作用的残基中,已经证明了与取代指定肽残基时 T 细胞活化的依赖性的相关的层次 (hierarchy)。使用已经含有用不同氨基酸取代的一个或多个 T 细胞受体接触残基的肽,多个研究组已经证明了对 T 细胞活化过程的深远作用。Evavold & Allen (1991) *Nature* 252 :1308-10 证明了 T 细胞增殖和细胞因子产生之间不相关。在该体外模型中,用其中已经进行了天冬氨酸保守取代谷氨酸的肽类似物来攻击对血红蛋白的残基 64-76 (在 I-E^k 环境中) 有特异性的 T 细胞克隆。该取代不显著影响类似物结合 I-E^k 的能力。

[0165] 用该类似物体外攻击 T 细胞克隆后,未检测到增殖,尽管保持了 IL-4 分泌,也保持了该克隆辅助 B 细胞响应的能力。在随后的研究中,同一组证明了 T 细胞介导的细胞溶解与细胞因子产生之间的分离。该情况中,前者保持不变而后者受损。McDevitt 和同事最初在 EAE (实验性过敏性脑脊髓炎) 的鼠模型中证明了改变的肽配体在体内的效力 (Smilek 等人 (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* 88 :9633-9637)。在这一模型中通过用 MBP (髓磷脂碱性蛋白) 的致脑炎的肽 Acl-11 免疫来诱发 EAE。在位置四 (赖氨酸) 用丙氨酸残基的取代产生了与其限制性元件 ($A\alpha^uA\beta^u$) 结合良好的肽,但其在易感的 PL/JxSJLF1 品系中是非免疫原性的,而且其在用致脑炎的肽免疫之前或之后施用时还阻止 EAE 发作。因此,可鉴定肽中影响该肽诱发 T 细胞各种功能的能力的残基。

[0166] 有利地,可设计肽以利于 T 细胞增殖和诱发去敏化。Metzler 和 Wraith 已经证明了在其中已经进行了增加肽-MHC 亲和力的取代的肽的致耐受能力提高 (Metzler & Wraith (1993) *Int Immunol* ~:1159-65)。Sloan-Lancaster 等人 (1993) *Nature* 363 :156-9 证明,改变的肽配体可在克隆的 T 细胞导致长期和深远的无反应性。

[0167] 本发明的组合物可能在对过敏原敏感的个体中诱发晚期响应。术语“晚期响应”包括列在 Allergy and Allergic Disease (过敏症和过敏性疾病) (1997) A. B. Kay (编辑), Blackwell Science, 第 1113-1130 页中的含义。晚期响应可以是任何晚期响应 (LPR)。优选地, 肽可能引起晚期哮喘性响应 (LAR) 或晚期鼻炎性响应或晚期皮肤响应或晚期眼部响应。可使用本领域公知方法确定特定的肽是否能够产生 LPR; 特别优选的方法被描述于 Cromwell O, Durham SR, Shaw RJ, Mackay J 和 Kay AB. Provocation tests and measurements of mediators from mast cells and basophils in asthma and allergic rhinitis (哮喘和过敏性鼻炎中来自肥大细胞和嗜碱性粒细胞的介质的激发测试和测量). 于 Handbook of Experimental Immunology (实验免疫学手册) (4) 第 127 章, 编辑: Weir DM, Blackwell Scientific Publications, 1986。

[0168] 因此, 优选地, 本发明的单独肽能够在已经对过敏原敏感的个体中诱发 LPR。可通过公知程序确定个体是否已经对过敏原敏感, 诸如使用过敏原提取物的溶液的皮肤穿刺测试、皮肤 LPR 的诱发、临床史、过敏原攻击和用于测量过敏原特异性的 IgE 的放射性过敏原吸附测试 (RAST)。可由医师基于例如这样的测试来确定特定个体是否被预期得益于治疗。

[0169] 使得个体去敏化或免疫耐受过敏原表示在适当地敏化的个体中抑制或阻挠由过敏原诱发的过敏组织反应。已显示, 可选择性地活化 T 细胞, 并随后使之无响应性。此外, 使这些 T 细胞无应答或将其消除导致患者对特定的过敏原去敏化。去敏化表现为在第二次或进一步施用该过敏原或过敏原衍生的肽时减少或优选地消除对过敏原或过敏原衍生的肽的响应。第二次施用可在经过允许去敏化发生的合适时间段后进行; 这优选地为一天到数周之间的任何期间。大约两周的间隔是优选的。

[0170] 尽管本发明的组合物可能能够在草过敏个体中诱发 LPR, 应理解的是, 当组合物被用于治疗患者时, 优选地使用足够低浓度的组合物以致不发生可观察到的 LPR, 但响应将足以部分地将 T 细胞去敏化以致可给予下一 (优选地更高的) 剂量, 如此继续。以这种方式, 建立剂量以提供完全的去敏化但通常从来不在患者中诱发 LPR。然而, 该组合物或肽能够在比所施用的较高的浓度下这样做。

[0171] 本发明的组合物可能能够在群体的一组草过敏个体的 50% 或更多中诱发晚期响应。更优选地, 组合物能够在一组敏化的个体的 55% 或更多、60% 或更多、65% 或更多、70% 或更多、75% 或更多、80% 或更多、85% 或更多或者 90% 或更多中诱发 LPR。可通过本领域公知方法确定组合物是否能够在一组受试者的某一百分比中诱发 LPR。

[0172] 将理解的是, 本发明的肽包括由作为 MHC II 类结合所需要的最少必需序列的核心的 9 个氨基酸所组成的 T 细胞表位。然而, 该肽还可包括在核心的 9 个氨基酸侧翼的另外残基。因此该肽可包括包含 T 细胞表位的区域, 其中一些残基可被修饰而不影响表位的功能。因此, 如上定义的肽的功能变体包括被改进以相对于肽的天然序列提高溶解度的肽。提高的溶解度对于受试者对衍生本发明的肽的过敏原的免疫耐受作用是有益的, 因为对受试者施用难溶剂导致不期望的、非免疫耐受的炎性响应。通过改变在包含 T 细胞表位的区域侧翼的残基, 可提高肽的溶解度。可改造本发明的肽以使其可溶性更高, 以致其包括:

[0173] i) T 细胞表位侧翼的肽的残基的 N 末端: 与刚好在衍生所述肽的蛋白序列中所述残基的 N 末端的两个至六个连续氨基酸相对应的一个至六个连续氨基酸; 和 / 或

[0174] ii) T 细胞表位侧翼的肽的残基的 C 末端: 与刚好在衍生所述肽的蛋白序列中所述

残基的 C 末端的一个至六个连续氨基酸相对应的一个至六个连续氨基酸 ;或

[0175] iii) T 细胞表位侧翼的肽的残基的 N 末端和 C 末端,选自精氨酸、赖氨酸、组氨酸、谷氨酸和天冬氨酸的至少一个氨基酸。

[0176] 任选地,可另外地改造该肽为可溶性更高的,以使 :

[0177] i) 所述肽天然序列中的任何半胱氨酸残基被丝氨酸或 2- 氨基丁酸代替 ;和 / 或

[0178] ii) 缺失了在所述肽的天然序列的 N 末端或 C 末端的至多三个氨基酸中的、不包含在 T 细胞表位中的任何疏水性残基 ;和 / 或

[0179] iii) 缺失了在所述肽的天然序列的 N 末端或 C 末端的最多四个氨基酸中包含序列 Asp-Gly 的、不包含在 T 细胞表位中的任何两个连续氨基酸 ;和 / 或

[0180] iv) 在 N 末端和 / 或 C 末端添加了一个或多个带正电荷的残基。

[0181] 经改造以提高溶解度的肽的例子是如实施例 8 中所描述的 Rye 09B 和 Tim07B。具有提高的溶解度的变体显示于表 8。这样,肽 Rye 09B1(SEQ ID NO :91), KPEVKYAVFEAALTKAIT ;Rye 09B2(SEQ ID NO :92), KKPEVKYAVFEAALTKAIT, Tim 07B1(SEQ ID NO :93), KKIPAGELQIIDKIDA, Tim 07B2(SEQ ID NO :94), KKIPAGELQIIDKIDAK 是具有提高的溶解度的变体的优选的例子。SEQ ID NO :91 至 94 可因此优先地作为以上天然肽的替代物用于本发明的组合物中。

[0182] 核酸和载体

[0183] 组成本发明的组合物和产物的单独肽可被直接施用,或可通过从编码序列来表达而被间接施用。例如,可提供编码本发明的肽组合,诸如上述任何肽的组合的多核苷酸。因此本发明的肽的组合可从编码并能够表达它的多核苷酸产生或以该形式递送。本文对使用、递送或施用本发明的肽的组合的任何提及意在包括经由从编码它的多核苷酸表达而间接使用、递送或施用这样的肽组合。

[0184] 因此,本发明提供了用于通过免疫耐受作用预防或治疗对草的过敏症的组合物,该组合物包括至少一种多核苷酸序列,该多核苷酸序列在表达时导致如上所述适用于通过免疫耐受作用预防或治疗对草的过敏症的组合物的产生。

[0185] 本发明还提供了产物,该产物包括编码如上所述的 a) 至 h) 的多肽或其变体的四种或更多种不同的多核苷酸 ;且其中每种不同编码的多肽用于同时地、分别地或顺序地预防或治疗人类对草的过敏症。

[0186] 术语“核酸分子”和“多核苷酸”在本文可互换使用,并且指的是任何长度的核苷酸即脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸或其类似物的聚合形式。多核苷酸的非限制性实例包括基因、基因片段、信使 RNA (mRNA)、cDNA、重组多核苷酸、质粒、载体、分离的任何序列的 DNA、分离的任何序列的 RNA、核酸探针和引物。本发明的多核苷酸可以以分离的或纯化的形式被提供。

[0187] “编码”所选择的多肽的核酸序列是当被置于合适的调节序列控制下时,在体内被转录(在 DNA 的情形下)和翻译(在 mRNA 的情形下)为多肽的核酸分子。编码序列的边界是由在 5' (氨基)末端的起始密码子和在 3' (羧基)末端的翻译终止密码子所决定的。为了本发明的目的,这样的核酸序列可包括但不限于来自病毒、原核或真核 mRNA 的 cDNA,来自病毒或原核 DNA 或 RNA 的基因组序列,和甚至合成的 DNA 序列。转录终止序列可位于编码序列的 3'。

[0188] 可根据本领域公知的方法合成本发明的多核苷酸,如例如在 Sambrook 等人(1989, Molecular Cloning-a laboratory manual(分子克隆实验手册);Cold Spring Harbor Press)中描述的方法。

[0189] 可以以表达盒的形式提供本发明的多核苷酸分子,其包括可操作地连接于插入序列的控制序列,从而允许本发明的肽在目标受试者中体内表达。反过来,这些表达盒通常在适于用作核酸免疫的试剂的载体(例如,质粒或重组病毒载体)中被提供。这样的表达盒可被直接施用于宿主受试者。可选地,包含本发明的多核苷酸的载体可被施用于宿主受试者。优选地,使用遗传载体制备和/或施用该多核苷酸。合适的载体可以是能够携带足够量的遗传信息并允许本发明的肽的表达的任何载体。

[0190] 因此,本发明包括包含这样的多核苷酸序列的表达载体。因此,本发明提供用于通过免疫耐受作用预防或治疗草过敏症的载体,其包含编码本发明的不同多肽的四种或更多种多核苷酸序列以及任选地编码本文定义的不同多肽的一种或多种另外的多核苷酸序列。载体可包含编码本发明的不同多肽的 4、5、6 或 7 种多核苷酸序列。载体优选地包括编码选自如上所述的 SEQ ID NO:1 至 27 或其变体的多肽的第一多核苷酸序列,和编码选自如上所述的 SEQ ID NO:28 至 73 或其变体的多肽的第二多核苷酸序列。该(第一)载体可与一种或多种其它的载体联合使用,所述其它载体提供非由第一载体编码的、本发明的不同的多肽的编码序列。

[0191] 此外,将理解的是,本发明的组合物和产物可包括多肽和多核苷酸的混合物。因此,本发明提供本文所定义的组合物或产物,其中代替任何一种多肽的是能够表达所述多肽的多核苷酸。

[0192] 以分子生物学技术常规地构建表达载体,而且其可例如包括使用质粒 DNA 和可能是必要的并以正确方向放置的合适的起始因子、启动子、增强子和其它元件,诸如例如多聚腺苷酸化信号,以允许表达本发明的肽。其它合适的载体对于本领域技术人员是明显的。在这一方面作为另外的实例,我们参考 Sambrook 等人。

[0193] 因此,通过将这样的载体递送到细胞并允许发生从载体的转录,可提供本发明的多肽。优选地,载体中本发明的或用于本发明的多核苷酸被可操作地连接于能够提供宿主细胞对编码序列的表达的控制序列,即,该载体是表达载体。

[0194] “可操作地连接”是指元件的排列,其中如此描述的组分被设置以进行其通常的功能。因此,当存在适当的酶时,可操作地连接于核酸序列的指定的调节序列诸如启动子能够实现该序列的表达。启动子不必与序列连续,只要它起作用来指导序列表达。因此,例如,未翻译但被转录的干预序列可存在于启动子序列和核酸序列之间,并且仍可认为该启动子序列被“可操作地连接”于编码序列。

[0195] 本领域中已描述了若干表达系统,其中每一种通常由包含可操作地连接于表达控制序列的目标基因或核苷酸序列的载体所组成。这些控制序列包括转录启动子序列以及转录起始和终止序列。本发明的载体可以是例如拥有复制起点即任选地用于表达所述多核苷酸的启动子和任选地启动子的调节子的质粒、病毒或噬菌体载体。“质粒”是染色体外遗传元件形式的载体。载体可包含一种或多种可选择的标记基因,例如在细菌质粒情况下的氨苄西林抗性基因或用于真菌载体的抗性基因。载体可被用于体外例如产生 DNA 或 RNA,或者用于转染或转化宿主细胞例如哺乳动物宿主细胞。载体还可适于体内使用,例如以允许多

肽的体内表达。

[0196] “启动子”是起始并调节编码多肽的多核苷酸的转录的核苷酸序列。启动子可包括诱导型启动子（其中可操作地连接于启动子的多核苷酸序列的表达由分析物、辅因子、调节蛋白等所诱发）、阻抑型启动子（其中可操作地连接于启动子的多核苷酸序列的表达由分析物、辅因子、调节蛋白等所阻抑）和组成型启动子。术语“启动子”或“控制元件”预期包括全长启动子区域和这些区域的功能（如，控制转录或翻译的）区段。

[0197] 根据本发明的多核苷酸、表达盒或载体可另外地包括信号肽序列。信号肽序列通常被插入到与启动子可操作地连接以使信号肽被表达并促进还与启动子可操作地连接的编码序列所编码的多肽的分泌。

[0198] 通常，信号肽序列编码 10 至 30 个氨基酸例如 15 至 20 个氨基酸的肽。通常这些氨基酸主要是疏水的。在典型情况下，信号肽将带有信号肽的生长中的多肽链靶向于表达细胞的内质网。信号肽在内质网中被切除，允许经高尔基体分泌多肽。因此，通过从个体中的细胞表达并从这些细胞分泌，可向个体提供本发明的肽。

[0199] 可选地，本发明的多核苷酸可以以合适的方式表达以允许本发明的肽被 II 类 MHC 分子呈递在抗原呈递细胞表面。例如，本发明的多核苷酸、表达盒或载体可靶向于抗原呈递细胞，或在这样的细胞中可优先刺激或诱发被编码的肽的表达。

[0200] 在一些实施方案中，多核苷酸、表达盒或载体将编码佐剂，或以其它方式提供佐剂。如本文所用的，术语“佐剂”指能够特异性地或非特异性地改变、提高、定向、重定向、增强或起始抗原特异性免疫反应的任何材料或组合物。

[0201] 目标多核苷酸可用于在体外、活体外或体内产生本发明的肽。可施用这样的多核苷酸或通过免疫耐受作用将其用于过敏症的预防或治疗。

[0202] 用于基因递送的方法是本领域已知的。参见例如美国专利第 5,399,346、5,580,859 和 5,589,466 号。核酸分子可直接引入接受的受试者，诸如通过标准的肌内或皮内注射；经皮的颗粒递送；吸入；局部，或通过口服、鼻内或粘膜施用方式。可选地，分子可活体外引入已从受试者取出的细胞。例如，本发明的多核苷酸、表达盒或载体可活体外引入个体的 APC。将包含目标核酸分子的细胞再次引入受试者以致可针对核酸分子编码的肽建立免疫应答。用于这种免疫的核酸分子在本文通常称为“核酸疫苗”。

[0203] 本发明的多肽、多核苷酸、载体或细胞可以以基本上分离的形式存在。它们可以与不干扰其预期用途的运载体或稀释剂混合，并仍被认为是基本上分离的。它们还可以是基本上纯化的形式，在该情况下它们通常将占制剂的蛋白、多核苷酸、细胞或干物质的至少 90%，如至少 95%、98% 或 99%。

[0204] 抗原呈递细胞 (APC)

[0205] 本发明包括产生在其表面上呈递本发明的肽的 APC 群体的方法的体外使用，该 APC 群体随后可用于治疗。可对从患者获得的细胞样品在活体外进行这样的方法。因此以这种方式产生的 APC 形成可用于通过免疫耐受作用治疗或预防草过敏症的药剂。细胞应被个体的免疫系统接受，因为它们衍生于该个体。将以这种方式产生的细胞递送到最初获得细胞的个体，从而形成本发明的治疗性实施方案。

[0206] 制剂和组合物

[0207] 本发明的肽、多核苷酸、载体和细胞可单独或组合地提供给个体。本发明的每种分

子或细胞可以以分离的、基本上分离的、纯化的或基本上纯化的形式提供给个体。例如,可对个体提供基本上不含其它肽的本发明的肽。可选地,可利用标准肽偶联试剂将组合物中的四种或多种肽偶联在一起,以提供含有优选的表位的单一的肽。将按照单独的肽来筛选这样的肽的嗜碱性粒细胞组胺释放以确定其没有组胺释放。在另一个实施方案中,组合物中的四种或更多种肽可作为单一多肽链的部分来提供,即,通过从编码多核苷酸进行的重组方式。四种或多种肽可邻接地融合,或可替代地被适当的接头分隔。

[0208] 尽管根据本发明的肽、多核苷酸或组合物可能以原料形式被呈现,但优选地作为药物制剂将它们呈现。因此,根据本发明的另一方面,本发明提供用于通过免疫耐受作用预防或治疗草过敏症的药物制剂,其包含根据本发明的组合物、载体或产物连同一种或多种药学上可接受的运载体或稀释剂和任选地一种或多种其它治疗成分。运载体必须与制剂的其它成分相容且不危害其接受者的意义上是“可接受的”。通常,用于注射和最终制剂的运载体是无菌和无热原的。优选地,运载体或稀释剂是硫代甘油。

[0209] 配制包含本发明的肽、多核苷酸或细胞的组合物可使用标准的药物配制化学和方法学进行,所有这些对于普通技术人员都易于获得。

[0210] 例如,包含本发明的一种或多种分子或细胞的组合物可与一种或多种药学上可接受的赋形剂或媒介物合并。辅助物质诸如润湿剂或乳化剂、pH 缓冲物质和诸如此类可在赋形剂或媒介物中存在。这些赋形剂、媒介物和辅助物质通常是在接受组合物的个体中不诱发免疫应答的药剂,而且其可被施用而没有不当毒性。药学上可接受的赋形剂包括但不限于液体诸如水、盐水、聚乙二醇、透明质酸、甘油、硫代甘油和乙醇。其中还可包括药学上可接受的盐,例如,无机酸盐诸如盐酸盐、氢溴酸盐、磷酸盐、硫酸盐和诸如此类;以及有机酸盐诸如乙酸盐、丙酸盐、丙二酸盐、苯甲酸盐和诸如此类。关于药学上可接受的赋形剂、媒介物和辅助物质的完全讨论可在 Remington's Pharmaceutical Sciences (雷氏药学原理) (Mack Pub. Co., N. J. 1991) 中获得。

[0211] 可以以适于弹丸施用或连续施用的形式制备、包装或销售这样的组合物。可以以单位剂量形式制备、包装或销售注射组合物,诸如在安瓿或含有防腐剂的多剂量容器中。组合物包括但不限于悬液、溶液、油性或水性媒介物中的乳剂、糊剂和可植入的缓释或可生物降解的制剂。这样的组合物还可包括一种或多种另外的成分,其包括但不限于悬浮剂、稳定剂或分散剂。在用于肠胃外施用的组合物的一个实施方案中,以干燥(如粉末或颗粒)形式提供活性成分以便在肠胃外施用重构的组合物之前用合适的媒介物(如无菌无热原的水)进行重构。可以以无菌可注射的水性或油性悬液或溶液形式制备、包装或销售药物组合物。这种悬液或溶液可根据已知技术配制,并且除了活性成分以外,可包括另外的成分诸如本文所述的分散剂、润湿剂或悬浮剂。例如,可使用无毒的肠胃外可接受的稀释剂或溶剂诸如水或 1,3-丁二醇来制备这样的无菌注射制剂。其它可接受的稀释剂和溶剂包括但不限于林格氏溶液、等渗氯化钠溶液和不挥发油诸如合成的单或二甘油酯。有用的其它的可肠胃外施用的组合物包括包含微晶形式的、在脂质体制品中的或作为可生物降解的聚合物系统的组成部分的活性成分的那些。用于缓释或植入的组合物可包括药学上可接受的聚合或疏水物质诸如乳液、离子交换树脂、微溶聚合物或微溶盐。

[0212] 可选地,可将本发明的肽或多核苷酸包被,吸附或与连接到微粒运载体。合适的微粒运载体包括衍生自聚甲基丙烯酸甲酯聚合物的那些,以及衍生自聚(丙交酯)和丙交

酯-乙交酯共聚物的 PLG 微粒。参见例如, Jeffery 等人 (1993) Pharm. Res. 10 :362-368。还可使用其它颗粒系统和聚合物, 例如聚合物诸如聚赖氨酸、聚精氨酸、聚鸟氨酸、精胺、亚精胺以及这些分子的轭合物。

[0213] 本文提到的任何肽、多核苷酸或细胞的制剂将取决于诸如物质的性质和递送方法等因素。可以以多种剂型施用任何这样的物质。可以以口服(如, 作为片剂、糖锭剂、锭剂、水性或油性悬液、可分散的粉末或颗粒)、局部、肠胃外、皮下、吸入、静脉内、肌内、胸骨内、经皮、皮内、舌下、鼻内、含服或输注技术进行施用。物质还可作为栓剂被施用。医师将能够确定每个特定个体需要的施用途径。

[0214] 本发明的制剂或组合物将包括有效而不导致副作用的合适浓度的每种肽/多核苷酸/细胞。通常, 组合物中每种肽的浓度将在 0.03 至 200nmol/ml 的范围中。更优选地在 0.3 至 200nmol/ml、3 至 180nmol/ml、10 至 150nmol/ml、5 至 200nmol/ml 或 30 至 120nmol/ml 的范围中。组合物或制剂应具有大于 95% 或 98% 的纯度或至少 99% 的纯度。

[0215] 在本发明的一个方面, 佐剂可与本发明的多肽/多核苷酸/细胞联合使用。佐剂优选地以足够增加本发明的多肽/多核苷酸/细胞的作用的量来施用, 或反之亦然。佐剂或其它治疗剂可以是增强本发明分子的作用的剂。例如, 其它剂可以是增强对本发明的肽或细胞的响应的免疫调节分子或佐剂。

[0216] 因此在一个实施方案中, 本发明的肽、多核苷酸、细胞或组合物与一种或多种其它治疗剂一起用于治疗。这些剂可被分别、同时或顺序地施用。它们可以在相同或不同组合物中被施用。因此, 在本发明的方法中, 还可用另外的治疗剂来治疗受试者。

[0217] 因此, 可配制一种组合物, 其包括本发明的分子和/或细胞以及一种或多种其它治疗分子。可选地, 本发明的组合物可与作为组合治疗的一部分的一种或多种其它治疗组合物同时地、顺序地或分别地使用。

[0218] 佐剂的非限制性例子包括维生素 D、雷帕霉素和糖皮质激素类固醇, 比如地塞米松、氟地松、布的松、莫米松、倍氯米松、氢化可的松、醋酸可的松、强的松、泼尼松龙、甲基泼尼松龙、倍他米松和曲安西龙。优选的糖皮质激素是地塞米松。

[0219] 治疗方法和待治疗的个体

[0220] 本发明涉及能够使得人类个体去敏化或免疫耐受上述过敏原并因此可用于预防或治疗草过敏症的肽、多核苷酸、载体和细胞。本发明提供用于通过免疫耐受作用预防或治疗草过敏症的组合物、产物、载体和制剂。本发明的组合物可用于减少过敏症状或改善过敏性个体的状况。本发明还提供使得草过敏个体免疫耐受或去敏化的方法, 其包括单独或组合地施用上述本发明的多肽/多核苷酸/细胞。

[0221] 将用本发明的组合物或制剂治疗或提供的个体优选地是人类。应理解的是, 待治疗的个体可以是已知对过敏原敏感的个体, 即处于被敏化或怀疑被敏化的风险中。可使用本领域公知和本文所述的技术来测试个体的敏化作用。可选地, 个体可具有草过敏症的家族史。可能不必测试个体对草的敏化作用, 因为当暴露于草时个体可展现过敏症的症状。暴露表示接近例如禾本科植物, 或来源于禾本科植物的物质或产物, 或包含或包括以上任一种的物质或产物。来源于禾本科植物的物质或产物典型地是草花粉。接近表示距离上述物品 10 米或更少、5 米或更少、2 米或更少、1 米或更少或者 0 米。过敏症的症状可包括眼睛痒、流鼻涕、呼吸困难、皮肤红痒或皮疹。

[0222] 待治疗的个体可以是任何年龄。然而,优选地,该个体可处于 1 至 90、5 至 60、10 至 40 或更优选地 18 至 35 的年龄组。

[0223] 优选地,待治疗的个体来自具有在白种人人群中有代表性的频率范围内的 MHC 等位基因频率的人群。11 个常见 DRB1 等位基因家族的参考人群等位基因频率被显示在表 A 中(数据来自 HLA Facts Book(HLA 事件簿),Parham 和 Barber)。

[0224] 表 A

[0225]

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

[0226] 通过分析报告频率的多个研究来获得参照频率,而所示附图是平均值。因此优选地,待治疗的个体来自具有与表 A 所指的等位基因(诸如至少 1、2、3、4、5 种或所有等位基因)的参照人群相等的 MHC 等位基因频率的人群,例如在图中范围加或减 1、2、3、5、10、15 或 20% 的范围内。

[0227] 优选地,个体来自这样的人群,其中如下 DRB1 等位基因的等位基因频率是:

[0228] 4- 至少 9%

[0229] 7- 至少 10%

[0230] 11- 至少 8%。

[0231] 个体可能已具有草过敏症达至少 2 周、1 月、6 月、1 年或 5 年。个体可患有过敏症导致的皮疹、鼻充血、流鼻涕和 / 或咳嗽。个体可能已被或未被施用治疗草过敏症的其它组合物 / 化合物。个体可能生活在具有以下的地理区域中:

[0232] - 温带气候,和 / 或:

[0233] - 典型土壤 pH 在约 3.5、4 或 4.5 至约 5.5、6、7 或 8 的范围内;和 / 或

[0234] - 平均年降水量不少于每年约 9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20cm,且不大于每年约 180cm、250cm、300cm、400cm 或 500cm;和 / 或

[0235] - 年最低温度不小于约 -5℃、-4℃、-3℃、-2℃、-1℃、0℃、1℃、2℃、3℃、4℃或 5℃;和 / 或

[0236] - 年最高温度不大于约 35℃、约 30℃、约 29℃、约 28℃、约 27℃、约 26℃、约 25℃、约 24℃、约 23℃或约 22℃;和 / 或

[0237] - 纬度介于约北纬 30° 到约南纬 30° 之间。

[0238] 个体通常在特定的季节患有对草的过敏症。该季节通常对应于草的花期,其典型地为夏季,优选地初夏(例如在北半球从 5 月到 6 月)或夏末(例如在北半球从 8 月到 10 月)。草过敏性个体通常对草花粉过敏。

[0239] 组合免疫疗法

[0240] 因为许多个体对多种多肽抗原过敏或可能需要对多种多肽抗原去敏化,本发明还提供为对多种抗原过敏的个体去敏化的手段。在个体中诱发的对第一多肽抗原或过敏原的

“耐受”可在个体中产生“致耐受环境”，其中可下调对其它抗原不适当的免疫应答以提供对其它抗原的耐受。

[0241] 该发现是指，对多种过敏原过敏的个体可以在大大减少的时间段中被治疗，而且对一些过敏原（如花生）严重过敏但对其它过敏原（如猫皮屑）中度过敏的个体可从这样的治疗受益，在所述治疗中建立对较温和的过敏原的耐受，并随后将这种致耐受环境用于提供对其它更极端过敏原的耐受。此外，患有自身免疫性疾病且另外地对无关抗原或过敏原过敏（或以其他方式免疫）的个体可从这样的治疗方案受益，在所述治疗方案中首先建立对无关抗原或过敏原的耐受，并随后将这种致耐受环境用于提供对与自身免疫性疾病相关的自身抗原的耐受。

[0242] 因此提供了用于使草过敏个体对上述草过敏原和一种或多种另外的不同多肽抗原去敏化的方法。该方法要求，在第一步中向个体施用上述的根据本发明的组合物 / 产物 / 制剂（主要组合物），其中所述施用是以足以产生针对草过敏原的低响应状态的方式进行。一旦建立了针对草过敏原的低响应状态，或至少发生朝向去敏化的转变，该方法要求施用包含个体将对其敏化的第二不同的多肽抗原的第二组合物。以这样的方式进行第二组合物的施用以利用通过使用主要组合物建立的致耐受环境，其中现在可能建立对第二不同多肽抗原的耐受性。将第二组合物与第一主要组合物或草过敏原的较大片段共施用。“共施用”是指同时或共同施用，例如，当两种物质存在于同一组合物中，或在不同组合物中以几乎相同时间但在不同部位施用，以及在不同时间不同组合物中的多肽抗原递送。例如，可在递送第一组合物之前或之后在相同或不同部位递送第二组合物。递送之间的时间安排可以从间隔约数秒变化到间隔约数分钟、间隔数小时或甚至间隔数天。此外，可采用不同的递送方法。

[0243] 适宜的过敏原的类别包括但不限于，尘螨过敏原、花粉、动物皮屑（尤其是猫皮屑）、草、霉菌、灰尘、抗生素、针昆虫毒液和多种环境（包括化学品和金属）、药物和食物过敏原。常见的树过敏原包括来自三角叶杨、杨树、白蜡树、桦树、枫树、橡树、榆树、山核桃树和美国山核桃树的花粉；常见的植物过敏原包括来自艾蒿、豕草、英国车前草、酸模和藜的那些；植物接触性过敏原包括来自毒栎、毒叶藤和荨麻的那些；常见的草过敏原包括黑麦草、梯牧草、约翰逊草、百慕大草、羊茅草和蓝草过敏原；常见的过敏原还可从霉菌或真菌获得，诸如链格孢属 (*Alternaria*)、镰孢菌属 (*Fusarium*)、着色芽生菌属 (*Hormodendrum*)、曲霉属 (*Aspergillus*)、小多孢菌属 (*Micropolyspora*)、毛霉属 (*Mucor*) 和嗜热放线菌 (*thermophilic actinomycetes*)；表皮过敏原可从房屋或有机灰尘（通常来源于真菌）获得或从动物来源诸如羽毛和狗皮屑获得；常见的食品过敏原包括牛奶和奶酪（乳制品）、鸡蛋、小麦、果仁（如花生）、海产品（如贝壳）、豌豆、大豆和麸质过敏原；常见的环境过敏原包括金属（镍和金）、化学品（甲醛、三硝基苯酚和松节油）、乳胶、橡胶、纤维（棉或羊毛）、粗麻布、染发剂、化妆品、去垢剂和香料过敏原；常见的药物过敏原包括局部麻醉和水杨酸盐过敏原；抗生素过敏原包括青霉素、四环素和磺胺过敏原；而常见的昆虫过敏原包括蜜蜂、黄蜂和蚂蚁毒液以及蟑螂等器过敏原。特别充分表征的过敏原包括但不限于主要的猫过敏原 Fe1 d 1、蜜蜂毒液磷脂酶 A2 (PLA) (Akdis 等人 (1996) *J. Clin. Invest.* 98 : 1676-1683)、桦树花粉过敏原 Bet v 1 (Bauer 等人 (1997) *Clin. Exp. Immunol.* 107 : 536-541) 和多表位的重组的草过敏原 rKBG8.3 (Cao 等人 (1997) *Immunology* 90 : 46-51)。

[0244] 特别优选的 T 细胞表位来源于以下过敏原:猫皮屑蛋白 Fel d 1;屋尘螨蛋白 Der p 1、Der p 2 和 Der p 7;豚草蛋白 amb a 1.1、a 1.2、a 1.3 或 a 1.4;黑麦草蛋白 Lol p 1 和 Lol p 5;猫尾草蛋白 Phl p 1 和 Phl p 5;狗牙根蛋白 Cyn d 1;细交链孢菌 (*Alternaria alternata*) 蛋白 Alt a 1、Alt a 2 和烯醇酶 (Alt a 6);桦木蛋白 Bet v 1 和 P14;德国小蠊蛋白 Bla g 1、Bla g 2、Bla g 3、Bla g 4、Bla g 5 和 Bla g 6;艾蒿蛋白 Art v 1;俄国蓟蛋白 Sal k 1 和 Sal k 2;花生 Ara h 1、Ara h 2、Ara h 3、Ara h 4、Ara h 5、Ara h 6, 植物抑制蛋白或脂质转移蛋白或人白细胞抗原。

[0245] 这些和其它合适的过敏原是商业上可获得的和 / 或可按照已知技术容易地制备为提取物。

[0246] 优选地,第二多肽过敏原是草过敏原或草过敏原片段,更具体地是选自通过以下数据库登录号 (NCBI Entrez 登录号) 来索引的草过敏原序列的列表的草过敏原或草过敏原片段。NCBI 是美国国家生物技术信息中心并且是美国国家卫生研究院的分支机构。可获取进入数据库的 NCBI 网址是 www.ncbi.nlm.nih.gov/。过敏原序列由数据库登录号来索引。75232277 Dac g 1、75139988 Dac g 1、75232276 Dac g 1、33149335 Dac g 1、33149333 Dac g 1、75163303 Dac g 5、75163399 Dac g 5、75163400 Dac g 5、14423124 Dac g 5、14423122 Dac g 5、14423120 Dac g 5、1171005 Hol 1 1、3860384 Hol 1 1、414703 Hol 1 1、1167836 Hol 1 1、1085628 Hol 1 1、2266625 Hol 1 5、2266623 Hol 1 5、75172041 Hol 1 5、75098038 Hol 1 5、75098037 Hol 1 5、11991229 Hol 1 5、2266623 Hol 1 5、2506771 Hor v 1、282991 Hor v 1、75219009 Hor v 5、126385 Lol p 1、168314 Lol p 1、6599300 Lol p 1、75274600 Lol p 1、168316 Lol p 1、3210053 Lol p 1、3210049 Lol p 1、3210047 Lol p 1、3210050 Lol p 1、3210044 Lol p 1、3210043 Lol p 1、3210041 Lol p 1、3210039 Lol p 1、3210037 Lol p 1、3210036 Lol p 1、3210035 Lol p 1、3210034 Lol p 1、3210033 Lol p 1、3210032 Lol p 1、3210030 Lol p 1、100636 Lol p 1、320616 Lol p 1、320614 Lol p 1、100638 Lol p 1、100636 Lol p 1、320614 Lol p 1、100637 Lol p 1、126386 Lol p 2a、126387 Lol p 3、2498581 Lol p 5a、4416516 Lol p 5a、485371 Lol p 5a、100639 Lol p 5a、3409495 Lol p 5a、3409494 Lol p 5a、3409493 Lol p 5a、3409489 Lol p 5a、3409488 Lol p 5a、3409487 Lol p 5a、3409486 Lol p 5a、3409484 Lol p 5a、3409483 Lol p 5a、3409481 Lol p 5a、3409479 Lol p 5a、3409478 Lol p 5a、3409477 Lol p 5a、3409476 Lol p 5a、3409475 Lol p 5a、3409474 Lol p 5a、3409473 Lol p 5a、3409472 Lol p 5a、3409471 Lol p 5a、3409470 Lol p 5a、3409469 Lol p 5a、3409468 Lol p 5a、3409467 Lol p 5a、3409466 Lol p 5a、3409456 Lol p 5a、3209999 Lol p 5a、3210002 Lol p 5a、3210003 Lol p 5a、3210004 Lol p 5a、3210005 Lol p 5a、3210006 Lol p 5a、3210007 Lol p 5a、3210008 Lol p 5a、3210009 Lol p 5a、3210010 Lol p 5a、3210011 Lol p 5a、3210012 Lol p 5a、3210013 Lol p 5a、3210014 Lol p 5a、3210015 Lol p 5a、3210017 Lol p 5a、3210018 Lol p 5a、3210019 Lol p 5a、3210020 Lol p 5a、3210021 Lol p 5a、3210022 Lol p 5a、3210023 Lol p 5a、3210024 Lol p 5a、3210025 Lol p 5a、3210026 Lol p 5a、542129 Lol p 5a、2498582 Lol p 5b、3409457 Lol p 5b、626028 Lol p 5b、542131 Lol p 5b、455288 Lol p 5b、6634467 Lol p 5c、455288 Lol p 同种型 9、1582249 Lol p 11, 另外的黑麦草属序列:135480;417103;687261;687259;1771355;

2388662 ;631955 ;542131 ;542130 ;542129 ;100636 ;626029 ;542132 ;320616 ;320615 ;
320614 ;100638 ;100634 ;82450 ;626028 ;100639 ;283345 ;542133 ;1771353 ;1763163 ;
1040877 ;1040875 ;250525 ;551047 ;515377 ;510911 ;939932 ;439950 ;2718 ;168316 ;
168314 ;485371 ;2388664 ;2832717 ;2828273 ;548867 ;3409458 Pha a 1,3210038 Pha a
1,2498576 Pha a 1,1246116 Pha a 1,3210031 Pha a 1,3210027 Pha a 1,3210028 Pha
a 1,3210029 Pha a 1,82450 Pha a 1,409328 Pha a 1,2498580 Pha a 5,2498579 Pha a
5,2498578 Pha a 5,2498577 Pha a 5,1246120 Pha p 5,1246119 Pha p 5,1246118 Pha p
5,1246117 Pha p 5,3409480 Pha p 5,3409482 Pha p 5,3409490 Pha p 5,1171008 Phl
p 1,28373838 Phl p 1,28373839 Phl p 1,473360 Phl p 1,3901094 Phl p 1,1582250
Phl p 1,75221090 Phl p 1,3210052 Phl p 1,3210046 Phl p 1,3210040 Phl p 1,
629812 Phl p 1,481432 Phl p 1,1684718 Phl p 5,13430402 Phl p 5,3135501 Phl p
5,3135499 Phl p 5,3135497 Phl p 5,1684720 Phl p 5,40644796 Phl p 5,3309039 Phl
p 5,3309041 Phl p 5,739542 Phl p 5,3309047 Phl p 5,3309045 Phl p 5,3309043 Phl
p 5,3135503 Phl p 5,626037 Phl p 5,2851456 Phl p 5a,2398757 Phl p 5a,1092249
Phl p 5a,29500897 Phl p 5a,422005 Phl p 5a,3409492 Phl p 5a,2851457 Phl p 5b,
481397 Phl p 5b,1096197 Phl p 5b,2398759 Phl p 5b,3409491 Phl p 5b;另外的猫
尾草属序列:458878 ;548863 ;2529314 ;2529308 ;2415702 ;2415700 ;2415698 ;542168 ;
542167 ;626037 ;542169 ;541814 ;542171 ;253337 ;253336 ;453976 ;439960 ;75267691 Poa
p 1,4090265 Poa p 1,280414 Poa p 1,320620 Poa p 1,250525 Poa p 5,75172042 Poa
p 5,113562 Poa p 9,113561 Poa p 9,113560 Poa p 9,729944 Zea m 1,115502168 Zea
m 1b,11550238 Zea m 1d,115502167 Zea m 1c,122238295 Zea m 1,75272187 Zea m 1,
115502389 Zea m 1,162459584 Zea m 1,89892723 Zea m 1,293902 Zea m 1,89892721
Zea m 1,114794319 Zea m 1,478272 Zea m 1。

[0247] 递送方法

[0248] 配制之后,可使用多种已知途径和技术将本发明的组合物在体内递送到受试者。例如,可作为注射溶液、悬液或乳液提供组合物,并使用常规针头和注射器或使用液体喷射注射系统通过肠胃外、皮下、表皮、皮内、肌肉、动脉内、腹膜内、静脉内注射施用。组合物还可局部施用于皮肤或粘膜组织,诸如鼻内、气管内、肠内、直肠或阴道,或作为适于呼吸道或肺部施用的细碎的喷雾而被提供。其它施用方式包括口服施用、栓剂、舌下施用、主动或被动的经皮递送技术。

[0249] 当将施用本发明的肽时,优选地将肽施用到身体中的部位,在那里该肽将具有接触合适的抗原呈递细胞的能力,并且在那里该肽将具有接触个体的 T 细胞的能力。当将施用 APC 时,优选地将 APC 施用到身体中的部位,在那里 APC 将具有接触并活化个体的适宜的 T 细胞的能力。

[0250] 递送方案

[0251] 可通过上述任何合适的方法施用肽 / 多核苷酸 / 细胞 (诸如包含多种肽的组合物)。可由经验确定肽的合适量,但其通常是在以下提供的范围中。单次施用每种肽足以对患者产生有益的作用,但将理解的是,如果肽施用多于一次那么它可能是有益的,在这种情况下典型的施用方案可以是,例如,每 6 个月中每周一次或两次持续 2-4 周,或每四到六

个月中每天一次持续一周。将被理解的是,每种肽或多核苷酸或者肽和 / 或多核苷酸的组合可被单独或组合地施用于患者。

[0252] 用于施用的剂量将取决于若干因素,包括组合物的性质、施用途径和施用方案的时间表和时间安排。本发明的分子的合适剂量可以在每次施用中多达 15 μ g、多达 20 μ g、多达 25 μ g、多达 30 μ g、多达 50 μ g、多达 100 μ g、多达 500 μ g 或更多的量级。合适的剂量可少于 15 μ g,但至少 1ng、或至少 2ng、或至少 5ng、或至少 50ng、或至少 100ng、或至少 500ng、或至少 1 μ g、或至少 10 μ g。对于本发明的一些分子,使用的剂量可更高,例如,多达 1mg、多达 2mg、多达 3mg、多达 4mg、多达 5mg 或更高。这样的剂量可以以液态制剂提供,其浓度适于允许由所选途径施用适当体积。

[0253] 药盒

[0254] 本发明还涉及本文所述的适于用于本发明的治疗的成分的组合,其以药盒的形式被包装在容器中。这样的药盒可包括允许本发明的治疗的一系列成分。例如,药盒可包括本发明的一种或多种不同肽、多核苷酸和 / 或细胞,或本发明的一种或多种肽、多核苷酸或细胞和适于同时施用或者用于顺序或分别施用的一种或多种另外的治疗剂。药盒可任选地包含其它合适的试剂或说明书和类似物。

[0255] 本发明由以下实施例阐释:

[0256] 实施例 1

[0257] II 类 MHC 结合搜索

[0258] 本研究的目的是为了鉴定对八种最常见的人类 MHC II 类 HLA-DRB1* 同种异型具有强亲和力的一组独特的肽。为了鉴定主要草过敏原 Rye Lol p 1、Rye Lol p Va、p Vb、p 5a 和 p 5b、狗牙根 Cyn d 1 和猫尾草 Phl p 5 中的结合肽,利用商业上可获得的 EpiMatrix 算法 (EpiVax Inc.) 应用了称作“肽穿线 (peptide threading)”的计算机模拟方法。这是对来自一条序列的肽被 II 类 MHC HLA-DR 分子的结合沟容纳的潜力的生物信息学分析。EpiMatrix 是一种基于矩阵的算法,其将长为 9 个氨基酸的区段进行排序,通过结合于所选择的每种 MHC 分子的估计概率而将来自任何多肽序列的 8 个氨基酸进行重叠。(De Groot 等人, AIDS Research and Human Retroviruses 13 :539-41(1997))。建立矩阵基序的程序被发表在 Schafer 等人, 16 Vaccine (疫苗) 1998(1998) 中。在该实施例中,评价了对 HLA DR1、DR3、DR4、DR7、DR8、DR11、DR13 和 DR15 的结合潜力。通过对蛋白序列中每个 9 聚体框架评分来选择推定的 MHC 配体。通过将 9 聚体的序列与已知结合每种 MHC 等位基因的氨基酸序列的矩阵进行比较来得出这一分数。回顾性研究已证明, EpiMatrix 准确地预测了所发表的 MHC 配体 (Jesdale 等人,在 Vaccines (疫苗) '97 中 (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1997))。还已证实对结合多种 MHC 分子的肽的成功预测。

[0259] 由 EpiMatrix 如下计算对所选的 MHC 分子结合的估计概率。通过对与指定 MHC 等位基因的已知 MHC 结合物相比之下每个氨基酸对结合的相对促进或抑制进行估计来对肽评分。将横跨该肽的该信息加和,并将汇总分数 (EMX 分数) 指定给整个肽。在比较 EMX 分数与已知 MHC 配体的分数后, EpiMatrix 得到“估计结合概率”(缩写为 EBP,但并不严格地是概率)。EBP 描述具有与将结合指定 MHC 分子的肽一样高或更高的 EpiMatrix 分数的肽的比例。EBP 从 100% (非常可能结合) 变化到少于 1% (非常不可能结合)。

[0260] 通过 EpiMatrix 分析的多肽序列显示于表 1 中:

[0261] 表 1

[0262]

Ber01 ori	SGKAFGAMAKKGQEDKLRKA
Ber02 ori	PKDSDEFIPMKSSWGAIWRIDPKKPLKGP
Ber03 ori	RLTSEGG AHLVQDDVIPANWKPD TVYTSK
Bio01 ori	QK LIEKINAGFKAAVAA
Bio02 ori	AYVATLTEALRVIAGTL
Bio03 ori	KFIPTLVAAVKQAYAAKQAT
Bio04 ori	TALKKAVTAMSEAEKEA
Bio05 ori	NDKFTVFESAFNKALNE
Rye01 ori	LD AKSTWYGKPTGAGPKDNG
Rye02 ori	GHAFGSM AKKGEEQNVR SAG
Rye03 ori	GSNPNYLAILVKYVDGDGDV
Rye04 ori	KESWGAVWRIDTPDKLTGPF
Rye05 ori	DVNAGFKAAVAAAANAPPAD
Rye06 ori	GATPEAKYDAFVTALTEALR
Rye07 ori	GELQIVDKIDA AFKIAATAANAAPTNDKF
Rye08 ori	GAYETYKFIPSLEAAVKQAY
Rye09 ori	PEVKYAVFEAALT KAITAMTQAQKAGKPA
Tim10 ori	PEVKYTVFETALKKAITAMSEAQ

[0263] 基于这些序列的 EpiMatrix 分析的结果, 鉴定出预测具有良好的 MHC 结合性质的核心肽。所选择的肽显示于表 2 中。肽以灰色突出显示, 且标记 * 的为未被选择的肽。这些对应于 EpiMatrix 中分析的原始序列, 随后选择的肽来源于所述原始序列。例如, Ber01 来源于 Ber01 ori。

[0264] 表 2

[0265] 组 1 肽

[0266]

SEQ ID NO:	肽名称	肽序列	过敏原组	来源蛋白	
74	Ber01 ori	SGKAFGAMAKKGQEDKLRK A	1	Ber Cyn d1	*
1	Ber01	SGKAFGAMAKKGQED	1	Ber Cyn d1	
75	Ber02 ori	PKDSDEFIPMKSSWGAIWRID PKKPLKGP	1	Ber Cyn d1	*

[0267]

2	Ber02	FIPMKSSWGA	1	Ber Cyn d1	
3	Ber02A	WGAIWRIDPKKPL	1	Ber Cyn d1	
4	Ber02B	KDSDEFIPMKSSWGAIWR	1	Ber Cyn d1	
5	Ber02C	KSSWGAIWRIDPKKPLK	1	Ber Cyn d1	
6	Ber02D	MKSSWGAIWRIDPKKPLK	1	Ber Cyn d1	
7	Ber02E	MKSSWGAIWRIDPPKPLK	1	Ber Cyn d1	
76	Ber03 ori	RLTSEGGAHLVQDDVIPANW KPDTVYTSK	1	Ber Cyn d1	*
8	Ber03A	IPANWKPDTVYTSK	1	Ber Cyn d1	
9	Ber04	KATFYGSDPRGAAP	1	Ber Cyn d1	
10	Ber05	AYHFDLSGKAFG	1	Ber Cyn d1	
77	Rye01 ori	LDAKSTWYGKPTGAGPKDNG	1	Rye Lol p1	*
11	Rye01	LDAKSTWYGKPTGAG	1	Rye Lol p1	
12	Rye01A	KWLDKSTWYGKPTGAG	1	Rye Lol p1	
78	Rye02 ori	GHAFGSMAKKGEEQNVRASG	1	Rye Lol p1	*
13	Rye02	FGSMAKKGEEQNVRASG	1	Rye Lol p1	
14	Rye02A	HAFGMAKKGEEQNVRASG	1	Rye Lol p1	
79	Rye03 ori	GSNPNYLAILVKYVDGDGDV	1	Rye Lol p1	*
15	Rye03A	SNPNYLAILVKYVD	1	Rye Lol p1	
80	Rye04 ori	KESWGAVWRIDTPDKLTGPF	1	Rye Lol p1	*
16	Rye04	WGAVWRIDTPDKL	1	Rye Lol p1	
17	Rye04A	KESWGAVWRIDTPDKL	1	Rye Lol p1	
18	Rye04B	KESWGAVWRIDTPDKLGP	1	Rye Lol p1	
19	Rye12	APYHFDLSGHAFGS	1	Rye Lol p1	

[0268] 组5肽

[0269]

81	Bio02 ori	AYVATLTEALRVIAGTL	5	Rye Lol p 5b	*
28	Bio02A	KYDAYVATLTEALR	5	Rye Lol p 5b	
82	Bio03 ori	KFIPTLVAAVKQAYAAKQAT	5	Rye Lol p 5b	*
29	Bio03A	KFIPTLVAAVKQAYAAKQ	5	Rye Lol p 5b	
30	Bio03B	YKFIPTLVAAVKQAYAAKQ	5	Rye Lol p 5b	
83	Bio04 ori	TALKKAVTAMSEAEKEA	5	Rye Lol p 5b	*
31	Bio04A	LKKAVTAMSEAEK	5	Rye Lol p 5b	
32	Bio04B	PETALKKAVTAMSEAEK	5	Rye Lol p 5b	
84	Bio05 ori	NDKFTVFESAFNKALNE	5	Rye Lol p Va	*
33	Bio05B	KFTVFESAFNKALNE	5	Rye Lol p Va	
85	Rye05 ori	DVNAGFKA AVAAAANAPPAD	5	Rye Lol p Va	*
34	Rye05A	FKA AVAAAANAPPADKFK	5	Rye Lol p Va	
35	Rye05C	NAGFKA AVAAAANAPPK	5	Rye Lol p Va	
86	Rye06 ori	GATPEAKYDAFVTALTEALR	5	Rye Lol p Va	*
36	Rye06A	KYDAFVTALTEALR	5	Rye Lol p Va	
37	Rye06B	PEAKYDAFVTALTEALR	5	Rye Lol p Va	

[0270]

87	Rye07 ori	GELQIVDKIDA AFKIAATAANAA PTNDKF	5	Rye Lol p Va	*
38	Rye07A	GELQIVDKIDA AFK	5	Rye Lol p Va	
39	Rye07B	KIPTGELQIVDKIDA	5	Rye Lol p Va	
40	Rye07G	FKIAATAANAAPTNDK	5	Rye Lol p Va	
41	Rye07H	AFKIAATAANAAPTNDK	5	Rye Lol p Va	
88	Rye08 ori	GAYETYKFIPSLEAAVKQAY	5	Rye Lol p Va	*
42	Rye08	YKFIPSLEAAVKQAY	5	Rye Lol p Va	
43	Rye08A **	ETYKFIPSLEAAVKQAY	5	Rye Lol p Va	
44	Rye08B	DSYKFIPTLVAVK	5	Rye Lol p Va	
89	Rye09 ori	PEVKYAVFEAALT KAITAMTQAQ KAGKPA	5	Rye Lol p Va	*
45	Rye09A	LTKAITAMTQAQKAGK	5	Rye Lol p Va	
46	Rye09B	PEVKYAVFEAALT KAIT	5	Rye Lol p Va	
47	Rye09D	KYAVFEAALT KAITAMT	5	Rye Lol p Va	
48	Rye11	DKFKIFEAAFSESSK	5	Rye Lol p Va	
49	Rye13	TPLRRTSSRSSRP	5	Rye Lol p Va	
50	Rye14	DVAYKAAEAHPRGQ	5	Rye Lol p Va	
51	Rye15	ALRVIAGTLEVHA	5	Rye Lol p Vb	
52	Rye16	FENTFNNAIKVSLG	5	Rye Lol p Vb	
90	Tim10 ori	PEVKYTVFETALKKAITAMSEAQ	5	Tim Phl p5	*
53	Tim10B	KYTVFETALKKAITAMSE	5	Tim Phl p 5	
54	Tim10C	LKKAITAMS	5	Tim Phl p 5	
55	Tim10D	PETALKKAITAMS	5	Tim Phl p 5	

[0271] Tim = 猫尾草 ; Rye = 黑麦草 ; Cyn = 狗牙根

[0272] 以上所表示的具有 N 末端谷氨酸 (E) 或谷氨酰胺 (Q) 残基的任何肽, 例如 Rye 08A, 可将该残基代替为焦谷氨酸以改进制造过程中的稳定性而不影响肽的功能。通常使用

其中已发生这样的替换的肽来获得对这些肽的进一步测试的数据。

[0273] 对三种已知的猫尾草序列的完整序列进行进一步的 EpiMatrix 分析：猫尾草 Phl p 1 (NCBI 登录号 1N10A)、猫尾草 Phl p Va (NCBI 登录号 Q40962) 和猫尾草 Phl p Vb (登录号 Q40963)。该分析鉴定了预测具有良好的 MHC II 类结合的另外的核心肽（和其侧翼序列）。这些序列显示于以下的表 3A-C 中。在每个表中：

[0274] “主序列中的残基”提供被分析的序列中肽的位置。核心肽（加下划线的中间的粗体氨基酸）界定分析中所鉴定的实际结合序列。包括了稳定化侧翼（N- 末端和 C- 末端，非粗体）以与核心序列一起使用，而且通常需要所述稳定化侧翼来帮助制造肽。“击中数 (number of hits)”是指序列中对被测试的所有 MHC 类型的高预测结合亲和力的数目。“EpiMatrix 串分数 (EpiMatrix Cluster Score)”衍生自对串长度标准化的击中数。因此串分数是预测的总 MHC 结合性质相对于随机肽标准物的过量或不足。认为高于 10 的分数表示宽的 MHC 结合性质。

[0275] 表 3

[0276] A) 1N10A-Phl p 1

[0277]

主序列中的 残基（包括侧 翼）	序列	疏水性	EpiMatrix 击 中数 (不包括侧翼)	EpiMatrix 串分数 (不包括侧翼)	SEQ ID NO:
120 - 142	GDE Q KLRSAGELE L QFRRVK CKY	-1.15	10	13.23	20
157 - 175	NPNYLALLVKYVNGDGDVV	0.19	8	14.11	21
191 - 209	KESWGAIWRIDTPDKLTGP	-0.85	8	13.79	22
229 - 241	PEGWKADTSYESK	-1.77	6	12.78	23

[0278] B) Q40962-Phl p Va

[0279]

主序列中的 残基（包括侧 翼）	序列	疏水性	EpiMatrix 击 中数 (不包括侧翼)	EpiMatrix 串分 数 (不包括侧翼)	SEQ ID NO:
42 - 60	IEK I NAGFKAALAGAGVQ P	0.41	8	13.04	56
55 - 78	GAGVQ P ADKYRTFVATFGPAS N KA	-0.32	12	17.23	57
98 - 122	ALT S KLDAAYKLAYKTAEGAT P EAK	-0.38	11	14.26	58
164 - 184	IEKVDAAFKVAATAANAA P AN	0.37	9	12.44	59
206 - 226	YESYK F I P ALEAAVKQAY A AT	0.04	8	14.18	60
232 - 253	EVKYTVFETALKKAITAM S EAQ	-0.06	12	17.18	61

[0280] C) Q40963-Phl p Vb

主序列中的 残基(包括侧 翼)	序列	疏水性	EpiMatrix 击 中数 (不包括侧翼)	EpiMatrix 串分 数 (不包括侧翼)	SEQ ID NO:
49 - 69	DIN V G F KAAVAAAAS V PAADK	0.63	13	21.17	62
[0281] 115 - 138	FDS F VAS L TEALRV I AGALEVHAV	1.10	11	15.59	63
158 - 176	IDK I DA A F K VAATAAA T AP	0.66	8	13.93	64
206 - 232	IP S LEAA V KQAYAA T VAAAPQ V KY AVF	0.69	11	12.1	65
229 - 247	YAV F EAA L T K AI T AMSEVQ	0.66	9	14.1	66

[0282] 实施例 2

[0283] 同源性搜索

[0284] 如上鉴定为 MHC II 类 - 结合的肽的每种的序列被用来探测草过敏原组中衍生亲本序列的可选蛋白的序列。例如, 肽 Rye01 来自 Lol p 1, 因此 Rye01 的序列被用来探测组 1 中来自其它草物种 (尤其是猫尾草) 的保守序列。Rye Lol p 1 的残基的分析结果显示于以下, 并与来自猫尾草 Phl p 1 和狗牙根 Cyn d 1 的相应序列相比较:

[0285] Rye 19-38:	LDAKSTWYGKPTGAGPKDNG (RYE01 ori)
[0286] 猫尾草	LDAKSTWYGKPTGAGPKDNG
[0287] Rye 109-128:	GHAFGSMAKKGEEQNVRSA (Rye 02 ori)
[0288] 猫尾草	GHAFGAMAKKGDEQKLRSAG
[0289] Cyn d 1 109-128:	SGKAFGAMAKKGQEDKLKA
[0290] Rye 154-173:	GSNPNYLAILVKYVDGDGDV (Rye03 ori)
[0291] 猫尾草	GSNPNYLALLVKYVNGDGDV
[0292] Rye 190-209:	KESWGAVWRIDTPDKLTGPF (Rye04 ori)
[0293] 猫尾草	GKDKWIELKESWGAIWRIDTPDKLTGPF
[0294] Cyn d 1 181-209.	PKDSDEFIPMKSSWGAIWRIDPKKPLK
[0295] Cyn d 1 217-241	
[0296] EGGAHLVQDDVIPANWKPDVYTSK	
[0297] 猫尾草	EGGTKTEADVPIEGWKADTSYESK

[0298] 相似地, 以下所显示的为如所示的 Rye Lol p 5 的残基的结果, 与来自如所示的猫尾草 phl p5 变体的相应序列相比较:

[0299] Rye 37-56:	DV N AG F KAAVAAAANAPPAD (Rye 05 ori)
[0300] Phl p 5a	KINAGFKAALAGAGVQPAD
[0301] Phl p Va	KINAGFKAALAGAGVQPAD
[0302] Phl p 5	KINDGFKAALAAAAGVPPAD
[0303] Phl p Vb	DIN V G F KAAVAAAASVPAAD
[0304] Phl p Vb	DIN V G F AAVAAAASVPAAD
[0305] Rye 100-119:	GATPEAKYDAFVTALTEALR (Rye 06 ori)
[0306] Phl p 5a	GATPEAKYDAYVATLSEALR
[0307] Phl p Va	GATPEAKYDAYVATLSEALR

[0308]	Ph1 o 5	GATPEAKYDAYVATLSEALR
[0309]	Ph1 p Vb	GATPEAKFDSFVASLTEALR
[0310]	Ph1 p Vb	GATPEAKFDSFVASLTEALR
[0311]	Rye 145-164 :	GELQIVDKIDAAFKIAATAA(来自 Rye 07 ori)
[0312]	Ph1 p 5a	GELQVIEKDAAFKVAATAA
[0313]	Ph1 p Va	GELQVIEKVDAAFKVAATAA
[0314]	Ph1 p 5	GELQFIEKVDSALKVAATAA
[0315]	Ph1 p Vb	GELQIIDKIDAAFKVAATAA
[0316]	Ph1 p Vb	GELQIIDKIDAAFKVAATAA
[0317]	Rye 154-173 :	DAAFKIAATAANAAPTNDKF(来自 Rye 07 ori)
[0318]	Ph1 p 5a	DAAFKVAATAANAAPANDKF
[0319]	Ph1 p Va	DAAFKVAATAANAAPANDKF
[0320]	Ph1 p 5	DSALKVAATAANAAAAANDKF
[0321]	Ph1 p Vb	DAAFKVAATAAATAPADDKF
[0322]	Ph1 p Vb	DAAFKVAATAAATAPADDKF
[0323]	Rye 190-209 :	GAYETYKFIPSLEAAVKQAY(Rye 08 ori)
[0324]	Ph1 p 5a	GAYESYKFIPALEAAVKQAY
[0325]	Ph1 p Va	GAYESYKFIPALEAAVKQAY
[0326]	Ph1 p 5	GAYESYKFIPALEAAVKQAY
[0327]	Ph1 p Vb	GAYDTYKCIPSLEAAVKQAY
[0328]	Ph1 p Vb	GAYDTYKCIPSLEAAVKQAY
[0329]	Rye 217-236 :	PEVKYAVFEAALTKAITAMT(来自 Rye 09 ori)
[0330]	Ph1 p 5a	PEVKYTVFETALKKAITAMS
[0331]	Ph1 p Va	PEVKYTVFETALKKAITAMS
[0332]	Ph1 p 5	PEVKYTVFETALKKAITAMS
[0333]	Ph1 p Vb	PEVKYTVFETALKKAITAMS
[0334]	Ph1 p Vb	AEVKYAVFEAALTKAITAMS
[0335]	Rye 226-245 :	AALTKAITAMTQAQKAGKPA(来自 Rye 09 ori)
[0336]	Ph1 p 5a	TALKKAITAMSEAQKAAPKA
[0337]	Ph1 p Va	TALKKAITAMSEAQKAAPKA
[0338]	Ph1 p 5T	ALKKAITAMSEAQKAAPKA
[0339]	Ph1 p Vb	AALTKAITAMSEVQKVSQPA
[0340]	Ph1 p Vb	AALTKAITAMSEVQKVSQPA

[0341] 来自猫尾草蛋白的序列与实施例 1 中所选择的 Rye 序列是高度保守的,基于猫尾草蛋白的序列,预测衍生自这些序列的另外的肽具有良好的 MHC 结合性质。这些另外的肽显示于表 4 中。

[0342] 表 4

[0343] 组 1 肽

[0344]	SEQ ID NO:	肽名称	肽序列	组	蛋白
	24	Tim02	FGAMAKKGDEQKLRSAG	1	Tim Phl p 1
	25	Tim02A	HAFGAMAKKGDEQKLRSAG	1	Tim Phl p 1
	26	Tim03A	SNPNYLALLVKYVNGD	1	Tim Phl p 1
	27	Tim04A	WGAIWRIDTPDKL	1	Tim Phl p 1

[0345] 组 5 肽

[0346]	67	Tim05A	FKA AVAAAASVPAADKFK	5	Tim Phl p 5
	68	Tim06A	KFDSFVASLTEALR	5	Tim Phl p 5
	69	Tim07B	KIPAGELQIIDKIDA	5	Tim Phl p 5
	70	Tim07G	FKVAATAANAAPANDK	5	Tim Phl p 5
	71	Tim08	YKFIPALEAAVKQAY	5	Tim Phl p 5
	72	Tim08A	PEESYKFIPALEAAVKQAY	5	Tim Phl p 5
	73	Tim09A	LTKAITAMSEVQKVSQ	5	Tim Phl p 5

[0347] 实施例 3

[0348] 体外结合分析

[0349] 在含水的酸性环境中预筛选被鉴定为潜在的 MHC II 类结合的肽的溶解度,并在体外 MHC II 类结合分析中检验所述肽。

[0350] 方法

[0351] 采用的分析是竞争性 MHC II 类结合分析,其中分析每种肽代替来自所研究的每种人类 MHC II 类同种异型的已知对照结合物的能力。本研究使用的同种异型和对照肽为以下显示的那些:

[0352]

同种异型	对照肽	序列
DRB1*0301	结核分枝杆菌 / 麻风分枝杆菌 hsp 65 2-16	AKTIAYDEEARRGLE
DRB1*1101	流感血凝素 307-319	PKYVKQNTLKLAT
DRB1*1501	人类髓磷脂碱性蛋白 85-99	ENPVVHFFKNIVTPR

[0353] 体外结合分析中所用的对照肽

[0354] 在竞争分析中分析了来自表 2-4 的每种肽 (标记 * 的那些除外),并筛选了与对照肽相比的相对结合。由于竞争性分析的性质,每种肽的数据以其自身的 IC₅₀ 与对照肽的 IC₅₀ 的比值来确定。因此,具有与对照肽相等的 IC₅₀ 值的肽具有相同的结合亲和力,而具有小于 1 的比值的肽具有较高亲和力,而具有大于 1 的比值的肽具有较低亲和力。

[0355] 水溶液中的溶解度是肽作为有效治疗剂的基本标准。因此,作为溶解度筛选的结果,将排除在多个结合记录中具有高频率的大型疏水氨基酸残基的非常疏水的肽。这是非种系选择性 (promiscuous) HLA-DRB1* 结合物的特征。鉴定了与一种或多种 MHC II 类同种异型结合的肽。预期这样的肽将具有与未经由 MHC 结构的同源性进行测试的相似同种异型结合的能力。

[0356] 实施例 4

[0357] 以下的方法应用于与实施例 3 中相同的肽。

[0358] 细胞增殖分析

[0359] 对 PBMC 进行细胞增殖分析（对于待检验的所有参数需要 140×10^6 个细胞）。通过掺入放射性标记的化合物 ^3H - 胸苷来测量增殖。更具体地，将 $100 \mu\text{l}$ 适当的抗原或肽浓度分配到 96 孔培养板的适当的孔中。然后将培养板置于设置为 37°C 的潮湿的 5% CO_2 培养箱中，持续最多 4 个小时。室温下在完全培养基中将如上所述分离的 PBMC 制备为 2×10^6 个细胞 /ml 的浓度。然后将 $100 \mu\text{l}$ 细胞溶液分配到含有抗原 / 肽的 96 孔培养板中的每个孔中。然后孵育培养板 6 至 8 天。通过向每个孔添加 $10 \mu\text{l}$ 的氟化的胸苷母液（无血清的 RPMI 培养基中 1.85MBq/ml ）而利用氟化的胸苷溶液对培养物进行脉冲处理。然后将培养板返回到培养箱中培养 8 和 16 小时之间。然后利用 Canberra Packard FilterMate 196 细胞收获器来收获细胞。利用适当的 β 闪烁计数器来计数干燥的过滤垫。

[0360] 将来自含有肽的孔的计数与仅含有培养基的孔的计数在统计学上进行比较（每组 12 个孔）。使用非参数曼 - 怀二氏检验。对所有对象使用相同的统计学检验。仅有培养基的孔和肽刺激的孔之间的统计学上显著的差异被认为是肽对 PBMC 的阳性刺激。

[0361] 实施例 5

[0362] 选择实施例 1 的 EpiMatrix 分析所鉴定的、包括预测与至少 5/8 的 MHC II 类等位基因 (HLA DR01、03、04、07、08、11、13、15) 结合的一个或多个表位的 59 种肽，用于进一步的研究。在许多情况下预测所述表位与这些等位基因中的所有 8 个相结合。一些序列具有与相同或不同的 MHC II 类等位基因结合的两个或更多个重叠表位或不重叠但邻近的表位。所选择的肽示于以下的表 5A 和 5B 中。

[0363] 使用来自 48 个草过敏性个体的外周血单核细胞 (PBMC) 来检验 44 种肽在所描述的体外 T 细胞细胞因子释放分析中的活性。利用 Ficoll 密度梯度离心从肝素化的血液分离外周血单核细胞 (PBMC)。结果显示于表 5A 中。在 28 个草过敏性的受试者中检验了另一组的 15 种肽。结果显示于表 5B 中。受试者来自 Hamilton 和周边地区, Ontario, Canada。在 PBMC 培养物的上清液中检验了肽对干扰素 γ (IFN- γ)、白介素 -10 (IL-10) 和白介素 -13 (IL-13) 的产生的刺激。

[0364] 细胞因子释放分析

[0365] 分析了 PBMC 响应于肽刺激的细胞因子分泌概况。利用 ELISA 分析检验了来自细胞因子释放分析的上清液的 3 种细胞因子——IFN- γ 、IL-10 和 IL-13 的存在。利用多重微珠阵列 (Luminex Corporation) 分析了所有 3 种细胞因子的存在。细胞因子释放分析通常需要每个受试者的 40×10^6 个 PBMC。更具体地，将 $250 \mu\text{l}$ 的具有适当抗原或肽浓度的 $200 \mu\text{g/ml}$ 溶液分配到 48 孔培养板的适当的孔中。然后将板在 37°C 下在潮湿的 5% CO_2 培养箱中孵育最多 4 个小时。随后向每个孔添加 $250 \mu\text{l}$ 的 5×10^6 个细胞 /ml 的 PBMC 悬液，并将板返回培养箱孵育 5 天。刺激后，收集培养上清液的样品以根据标准实验方案通过多重微珠分析来进行检验。通常，将样品收获到 3 等份中并冷冻直到进行 ELISA 分析。

[0366] 当读数比没有加入肽的对照孔中的读数高四倍时取得细胞因子分泌的刺激的阳性结果。在第一组 48 个受试者中的 18 个以上或在第二组的 28 个受试者中的 9 个以上对一种或多种细胞因子得到阳性结果的肽被认为是在草过敏症治疗中特别有用的。在第一组的 48 个受试者中所检验的 44 种肽中的 20 种，在第二组的 28 个受试者中所检验的 15 种肽

中的 8 种满足以上标准。

[0367] 表 5A 显示了在 48 个的组中对三种细胞因子为阳性的数目,表 5B 显示了在 28 个的组中对三种细胞因子为阳性的数目。满足以上所定义的标准的首选的肽以粗体突出显示。

[0368] 表 5A

[0369]

肽	IFN- γ +ve/48	IL-13 +ve/48	IL-10 +ve/48	对于一种或多种 细胞因子>18/48 +ve?
Ber01	35	22	34	是
Ber02	26	21	15	是
Ber02A	17	15	7	否
Ber02B	22	17	3	是
Ber02C	29	18	9	是
Ber03A	8	7	23	是
Bio02A	15	12	31	是
Bio03A	26	19	9	是

[0370]

Bio04A	28	16	37	是
Bio04B	22	16	27	是
Bio05B	8	8	34	是
Rye01	12	5	2	否
Rye01A	2	4	4	否
Rye02	4	5	1	否
Rye02A	12	6	1	否
Rye03A	3	5	0	否
Rye04	6	3	1	否
Rye04A	8	4	2	否
Rye05A	13	10	3	否
Rye05C	20	19	12	是
Rye06A	11	15	5	否
Rye06B	11	7	5	否
Rye07A	8	3	25	是
Rye07B	10	3	1	否
Rye07G	7	3	2	否
Rye07H	10	8	4	否
Rye08	9	6	2	否
Rye08A	18	9	32	是
Rye09A	6	5	11	否
Rye09B	28	24	16	是
Tim02	16	6	3	否
Tim02A	6	9	2	否
Tim03A	9	9	4	否
Tim04A	16	4	31	是
Tim05A	15	12	9	否
Tim06A	17	11	11	否
Tim07B	23	18	41	是

[0371]

Tim07G	19	20	10	是
Tim08	16	17	14	否
Tim08A	21	10	8	是
Tim10B	16	24	22	是
Tim10C	6	4	3	否
Tim10D	28	8	3	是

[0372] 表 5B

[0373]

肽	IFN- γ +ve/28	IL-13 +ve/28	IL-10 +ve/28	对于一种或多种 细胞因子 $\geq 9/28$ +ve ?
Bio02D	21	8	21	是
Bio02E	13	2	24	是
Bio04	12	5	8	是
Bio05	11	5	1	是
Bio03B	13	8	4	是
Rye04B	3	6	0	否
Rye07A	1	4	1	否
Rye08B	2	3	1	否
Rye09D	6	4	13	是
Rye11	4	10	3	是
Rye12	10	8	5	是
Rye13	6	1	0	否
Rye14	5	3	0	否
Rye15	1	0	1	否
Rye16	4	3	4	否

[0374] 实施例 6

[0375] 单独的草肽的排序标准

[0376] 对以实施例 5 中所用的标准为基础选择为在草过敏症的治疗中特别有用的 28 种肽进行进一步的评价以比较它们的特征。这包括计算所观察到的每种肽对所有 3 种细胞因子的累积响应,即,总评分(对三种细胞因子响应子(responder)的数目的总和)。还以物理和化学性质为基础,尤其是溶解度、pI 和疏水性指数(GRAVY),考虑了每种肽的药物开发方面。还利用 Epimatrix 软件预测了对 MHC II 类 HLA DR 等位基因的结合强度,值显示为对

于所示的每个特定 MHC II 类 HLA DR 等位基因的高 (1%)、中 (5%) 和低 (10%) 亲和性。
 [0377] 对于 14 种特别优选的肽的该分析的结果如表 6 所示。对这些特别优选的肽分配了 1 至 14 的内部排序顺序, 该排序顺序对应于发明人对其治疗草过敏症的相对功用的评价。主要根据总评分 (对三种细胞因子的响应子数目的总数) 对 14 种肽进行排序, 并将一些加权置于 IFN- γ 响应上。还考虑了如上所述的药物开发方面和 MHC 覆盖。

[0378] 表 6

[0379]

肽	总评分	Pi	GRAVY	MHC 结合亲和性的 Epimatrix 分析			溶解度 mg/ml	排序
				1%	5%	10%		
Ber01	91	8.22	-0.94	08, 11	01, 08, 15	03,04,08	>20	1
Ber02	62	8.75	-0.26		01, 04, 08, 11, 13	11,15	>20	5
Ber02B	42	6.12	-0.75		01, 04, 08, 11, 13	11,15	>20	13
Ber02C	56	10.46	-0.941	03,07,08	01, 11	04,13,15	>20	6
Bio02A	58	6.07	-0.157	01,04,07	08, 11, 13	03,15	>20	8
Bio03A	54	10.00	0.344	03	01, 03, 04, 08, 11, 13, 15		>20	7
Bio04A	81	8.50	-0.377	04	01, 03, 04, 08, 11, 13		>20	3
Rye05C	51	10.00	0.176	01,04	03, 08, 11, 13	04,15	10	11

[0380]

Rye08A	58	6.24	-0.194	01,03,04, 11	13, 15	07	>20	9
Rye09B	68	6.56	0.447	01,07	01, 04, 11, 15	03, 08, 13	5	4
Tim04A	51	5.96	-0.408	03,04,07	01, 11	08, 15	2	12
Tim07B	82	4.56	0.107		03, 11, 15	01, 13	0.56	2
Tim07G	49	8.59	-0.062		01, 04, 08, 15	03, 07, 11	>20	14
Tim10B	62	8.43	-0.017	04	01, 03, 04, 08, 11, 13		1.65	10

[0381] 对特别优选的草肽的排序的顺序如下:1, Ber01 (SEQ ID NO:1), Cyn d 1;2, Tim07B (SEQ ID NO:69), Phl p 5;3, Bio04A (SEQ ID NO:31), Lol p 5;4, Rye09B (SEQ ID NO:46), Lol p 5;5, Ber02 (SEQ ID NO:2), Cyn d 1;6. Ber02C (SEQ ID NO:5), Cyn d 1;7, Bio03A (SEQ ID NO:29), Lol p 5;8, Bio02A (SEQ ID NO:28), Lol p 5;9, Rye08A (SEQ ID NO:43), Lol p 5;10, Tim10B (SEQ ID NO:53), Phl p 5;11, Rye05C (SEQ ID NO:35), Lol p 5;12, Tim04A (SEQ ID NO:27), Phl p 1;13, Ber02B (SEQ ID NO:4), Cyn d 1;14, Tim07G (SEQ ID NO:70), Phl p 5。

[0382] 令人惊奇地,排序最前的肽 Ber01 和前 14 中的其它三种肽 (Ber02、Ber02C 和 Ber02B) 来源于狗牙根过敏原 Cyn d 1。狗牙根是温季多年生物种,适应于热带和亚热带气候。其在高温的持续期、暖冬和中度到高度降水量生长得最好。温度是限制其对世界的热带和亚热带区域的适应性的主要环境因素。狗牙根的北部限制延伸到美国的过渡区,在那里低温很少降低到 10 °F 以下。基于此原因,将预期狗牙根过敏原不是加拿大受试者所识别的主要过敏原。并且,多年生黑麦草虽然存在但不是加拿大最常见的草,且前 14 种肽中的 6 种 (Bio02A、Bio03A、Bio04A、Rye05C、Rye08A、Rye09B) 来源于多年生黑麦草过敏原。

[0383] 以下是在加拿大普遍的草类型的总结。加拿大几乎所有的饲草都是欧洲物种的改良品种。取决于土壤和气候条件,不同的草适应于在加拿大的不同区域中生长。猫尾草 (Phleum pratense) 是区域的干燥部分外面最广泛生长的草,并且是加拿大东部主要的饲草。麦穗草 (Agropyron cristatum) 是加拿大西部主要的饲草。鸭茅 (Dactylis glomerata) 和俄国野生黑麦草 (Elymus iunceus) 是不列颠哥伦比亚省主要的饲草。雀麦草 (Bromus inermis) 生长于加拿大东部和大草原。肯塔基蓝草 (草地早熟禾 (Poa pratensis)) 通常在许多区域生长。关于草原草,3- 芒草 (Aristida longiseta) 发现于不列颠哥伦比亚省的干旱地区,菰 (Zizania aquatica) 发现于加拿大东部的湖。某些属 (例如,剪股颖属 (Arctagrostis) 和喜极禾属 (Arctophila)) 是加拿大北极地区原产的。草皮草从表现出期望特性的物种发展而来,所述特性例如,生长密度、播种后快速生长、保持绿色的能力等。在加拿大,耐寒力和抗频繁干旱能力也是重要的。常见的加拿大草坪草混合物通常包括早熟禾属 (例如,肯塔基蓝草、糙茎蓝草 (roughstalk bluegrass)) 和羊茅属 (尤其是匍匐紫羊

茅、丘氏羊茅 (chewing fescue)), 虽然也已开发了其它有用的物种。

[0384] 根据加拿大草类型的普遍性, 非预期地观察到: 加拿大来源的草过敏性个体高度响应于来自狗牙根和多年生黑麦草的肽。因此, 这样的肽具有在世界范围的草过敏性个体的治疗中广泛应用的潜力。并且, 发现引起高水平响应 (即, 高的总评分) 的肽通常来源于习惯上被描述为“次要过敏原”的过敏原蛋白, 例如 Lol p 5 和 Phl p 5。为草过敏性受试者中 IgE 抗体所识别的主要猫尾草过敏原和多年生黑麦草过敏原分别是 Phl p 1 和 Lol p 1。在过敏性个体中诱导针对这些主要过敏原的抗体是 T 细胞依赖性的过程, 因此预期诱导高水平 T 细胞响应的肽将主要来自 Phl p 1 和 Lol p 1。

[0385] 从实施例 5 中所检验的 59 种肽的组确定前 14 种 T 细胞刺激性的肽, 尤其是鉴定可最佳地组合用于狭窄和特异性选择的前 8 种肽。从肽的大量初步可能组合中鉴定了组合的狭窄亚组。从前 14 种排序的肽中选择 8 种肽的可能性组合的总数为 3003。该组合数目 (3003) 代表着 73 种肽的原始组中的 8 种肽的可能的组合 (13, 442, 126, 049) 的非常小的比例。因此偶然鉴定前 8 种排序的肽的可能性是极小的。

[0386] 实施例 7

[0387] 草肽的组合

[0388] 对以从表 6 中前 8 种排序的肽进行的选择为基础的肽组合进行研究以鉴定用于草过敏症治疗的最佳疫苗。对每个组合进行如实施例 5 中的细胞因子分析。10 个最佳组合的结果列于表 7 中。组 1 是最佳的组合, 且包括所有前 8 种排序的肽。应注意的是, 这些特定组合代表实施例 1 和 2 中初步筛选的肽的可能性组合的数目的极小比例。

[0389] 在 48 个过敏性个体的研究组的很大比例中以表现出 IFN- γ 、IL-10 和 IL-13 的显著释放为依据选择最佳的草疫苗混合物。这样, 以组合形式提供优选的单独的草肽提高了 MHC 覆盖并提供了作为草疫苗的通用的优化产物。还基于生产的考虑因素选择了最佳草疫苗混合物, 所述生产的考虑因素包括组合中每种肽的物理特征和化学特征。

[0390] 表 7

[0391]

肽组合	IL-10 +ve/48	IL-13 +ve/48	IFN- γ 10 +ve/48
1	47	41	48
2	47	41	48
3	47	39	48
4	46	39	48
5	44	39	47
6	41	39	46
7	47	40	48
8	46	40	48
9	44	40	48
10	40	40	48

[0392] 组合：

[0393] 1 :Ber01 ;Ber02 ;Ber02C ;Bio02A ;Bio03A ;Rye09B ;Tim07B ;Bio04A

[0394] 2 :Ber01 ;Ber02 ;Ber02C ;Bio02A ;Bio03A ;Rye09B ;Tim07B

[0395] 3 :Ber01 ;Ber02 ;Ber02C ;Rye09B ;Tim07B ;Bio04A

[0396] 4 :Ber01 ;Ber02 ;Ber02C ;Rye09B ;Tim07B

[0397] 5 :Ber01 ;Ber02 ;Ber02C ;Rye09B ;Bio04A

[0398] 6 :Ber01 ;Ber02 ;Ber02C ;Rye09B

[0399] 7 :Ber01 ;Ber02C ;Bio03A ;Rye09B ;Tim07B ;Bio04A

[0400] 8 :Ber01 ;Ber02C ;Rye09B ;Tim07B

[0401] 9 :Ber01 ;Ber02C ;Bio03A ;Rye09B ;Bio04A

[0402] 10 :Ber01 ;Ber02C ;Bio03A ;Rye09B

[0403] 组合 1 是基于细胞因子释放特征的最佳组合并包括所有前 8 种排序的肽。该组合提供来源于三种草过敏原的肽，Cyn d1 (Ber01 ;Ber02 ;Ber02C)、Lol p 5 (Bio03A ;Rye09B、Bio04A) 和 Phl p 5 (Tim07B)。因此该组合是暴露于特定过敏原时区域差别的原因，虽然来自加拿大研究组的数据表明这可能不是重要的因素。

[0404] 应注意的是，每个特定最佳组合代表着实施例中初步筛选的肽的可能组合的数目中的极小比例。如上所述，例如，组合 1 的 8 种肽混合代表着实施例 1 和 2 中筛选的 73 种肽的 13, 442, 126, 049 种可能组合中的一种。每个最佳组合在 $\geq 39/48$ 的个体中提供了 IFN- γ 、IL-10 和 IL-13 的显著释放。

[0405] 值得注意的是，组合 2 至组合 10 中保持了高的 MHC 覆盖，尽管肽的数目和包括实施例 6 中所鉴定的前 8 种肽中的哪些特定肽具有显著差异。可发现，即使选择 4 种肽的组合（组合 10）仍得到 IFN- γ 响应的 100% 覆盖和 IL-10/IL-13 响应的 83% 覆盖。组合 10 基于来自狗牙根的 2 种肽和来自多年生黑麦草的 2 种肽。考虑到这些草在加拿大都不普

遍,和来自草过敏性个体中 IgE 抗体所识别的主要过敏原——Lol p 1 的肽未被包括的事实,利用这样的组合获得的覆盖是令人惊奇的。

[0406] 实施例 8

[0407] 提高溶解度

[0408] 鉴定了前 8 种肽中的两种, Rye09B 和 Tim07B, 具有可被提高的溶解度特征 (参见表 6)。为提高溶解度, 利用肽的 N- 末端或 C- 末端处的一个或多个赖氨酸残基设计了多种类似物。在 Epimatrix 软件中评估了所述肽以确保修饰不影响肽中的 T 细胞表位, 且不产生新生表位。选择了 Rye09B (Rye09B1 & Rye09B2) 的两种变体肽和 Tim07B1 & Tim07B2)。表 8 中显示了序列和溶解度值。Rye09B 的变体的溶解度是天然肽的两倍。Tim07B 的变体的溶解度是天然肽的 20 倍以上。除提高的溶解度外, 当在 10 个受试者的组中检验时, 两种变体还保持了它们诱导 T 细胞细胞因子释放的能力。因此在例如用于治疗性疫苗用途的草肽的任何混合中, Rye09B 和 Tim07B 的这些变体是天然肽的优选的替代物。

[0409] 表 8

[0410]

肽	序列	溶解度 (mg/ml)	SEQ ID NO :
Rye09B1	KPEVKYAVFEAALTKAIT	10	91
Rye09B2	KKPEVKYAVFEAALTKAIT	10	92
Tim07B1	KKIPAGELQIIDKIDA	20	93
Tim07B2	KKIPAGELQIIDKIDAK	20	94

[0411] 实施例 9

[0412] 优选的草疫苗的选择

[0413] 在试验性生产过程中, 发现来自以上组合 1 中存在的排序靠前的肽的一种肽 (Bio03A) 由于其具有一串 5 个连续的疏水性氨基酸而难以生产。当评估草疫苗中不包括 Bio03A 的影响时, 对于 48 个受试者分析了组合 1 中存在的其余前 7 种排序的肽的总的覆盖。在这 7 个肽混合 (Ber01、Ber02、Ber02C、Bio02A、Rye09B、Tim07B 和 Bio04A) 中, Tim07B 和 Rye07B 任选地为具有提高的溶解度的变体 Tim07B1 和 Rye07B1 所替代。

[0414] 在包括 Bio03A 的 8 种肽存在下, 47/48 的受试者 (IL-10)、41/48 的受试者 (IL-13) 和 48/48 的受试者 (IFN- γ) 表现了阳性细胞因子响应。相比较地, 在除 Bio03A 的 7 种肽存在下, 47/48 的受试者 (IL-10)、40/48 的受试者 (IL-13) 和 48/48 的受试者 (IFN- γ) 表现了阳性的细胞因子响应。因此推断在草疫苗生产中不包括 Bio03A 将具有很小影响。

[0415] 将以上的肽组合的响应性质与含有猫尾草花粉、多年生黑麦草花粉和狗牙根花粉的全草花粉提取物 (Greer Laboratories) 和另外的阳性对照——促细胞分裂原 SEB 进行比较。全草花粉提取物在 11/48 (IL-10)、42/48 (IL-13) 和 43/48 (IFN- γ) 中诱导了细胞因子响应, 而另外的阳性对照促细胞分裂原 SEB 在 47/48 (IL-10)、48/48 (IL-13) 和 48/48 (IFN- γ) 中诱导了响应。因此该 7 肽混合与全草过敏原相比在相似百分比的人群中提供了强细胞因子响应。

[0416] 对于优选的 7 肽草疫苗, 肽 Ber01、Ber02、Ber02C、Bio02A、Rye09B、Tim07B 和 Bio04A 的选择也基于同源性考虑因素。当在不同的草间对比这些 7 肽序列时, 在许多情况下具有相当大的同源性, 这提高了草过敏性个体将响应于肽的可能性。这意味着, 这些肽在主要对除狗牙根、猫尾草或多年生黑麦草之外的草发生过敏性响应的那些受试者中仍具有效用。对于以上 7 种肽同源的来自其它草的序列显示为以上的 SEQ ID NO 74 至 90。例如, Ber01 肽包含 9 聚体表位 FGAMAKKGQ, 其在其它许多常见草中具有近同源物。

[0417] 并且, 7 种疫苗肽源于来自三种最普遍的草 (猫尾草、多年生黑麦草和狗牙根) 的组 1 和组 5 过敏原, 并包括与其它常见草 (鸭茅、绒毛草、肯塔基蓝草和加那利草) 具有完全同源性或显著同源性的表位。因此 7 种肽的序列使对草花粉过敏性个体的覆盖范围最大化, 使疫苗适宜于治疗所有草花粉过敏性个体。

[0418] 实施例 10

[0419] 组胺释放分析

[0420] 该分析的目的是为了鉴定实施例 9 的优选的 7 肽组合是否能够活化血液嗜碱性粒细胞 (作为组织肥大细胞的代替物) 而导致组胺释放, 组胺释放可能导致治疗期间的过敏性反应。可认为常导致组胺释放的肽组合不适宜用作肽疫苗。

[0421] 组胺释放要求在嗜碱性粒细胞的表面上与邻近的特异性 IgE 分子交联。所评价的肽是小的 (长度为 10-18 个氨基酸), 且因此不应该具有显著的三级结构, 显著的三级结构将使它们能够保持完整分子的 IgE- 结合表位的构象。并且, 溶液中的肽单体, 即使它们被 IgE 结合, 应该不能够与邻近的 IgE 分子发生交联。评价了从获自草过敏性受试者的外周全血分离的外周血嗜碱性粒细胞的组胺释放。外周血嗜碱性粒细胞用作组织肥大细胞的代替物, 后者对于分析是不实用的。分析需要每个受试者的 3×10^6 个外周血单核细胞 (PBMC)。利用来自实施例 9 的组合形式的 7 种草肽对 PBMC 进行体外孵育。包括对含猫尾草花粉、多年生黑麦草花粉和狗牙根花粉的全草花粉过敏原提取物 (Greer Laboratories) 响应的组胺释放作为对照。每个分析中还包括了代表总组胺释放的阳性对照, 通过对细胞进行两次冷冻 / 解冻而产生。

[0422] 通过 ELISA 测量了组胺浓度, 结果表示为阳性对照的百分比 (% 阳性对照)。根据生产商的说明利用 Immunotech 组胺释放免疫分析试剂盒 (Histamine Release Immunoassay kit) 进行分析。利用微滴板孔中的肽、肽混合、全过敏原或缓冲液对 PBMC 进行体外攻击后, 移去上清液, 样品中的组胺转化为酰基组胺。通过竞争性酰基组胺 ELISA 来检验酰基化的样品。

[0423] 在 5 个 $\log_{10}$ 范围中 (1 至 10,000ng/mL) 分析肽诱导组胺释放的能力。以治疗中可能达到的肽的理论上的体内剂量为基础选择了所分析的浓度范围。基于通过皮内注射的肽的递送, 可能存在达 $10 \mu\text{g/mL}$ 每肽的高局部肽浓度。虽然不太可能, 存在将全剂量注射到血流中的风险。在该不太可能的事件中, $20 \mu\text{g}$ (12nmol) 的最大临床剂量的每种肽进入 5 升的血液体积将导致 4.0ng/mL 的理论上最大的血液浓度。这处于组胺释放分析剂量范围的低端, 并且比分析中所用的最高浓度低 2000 倍。

[0424] 将从 10 到 100,000ng/mL 的 5 个 $\log_{10}$ 范围的含有猫尾草花粉、多年生黑麦草花粉和狗牙根花粉的全草过敏原制备物 (Greer Laboratories) 用作组胺释放的对照。自发的组胺释放的阴性对照通过在仅缓冲液中孵育细胞而生成。

[0425] 对每个稀释度进行单次测量。ELISA 完成后,通过从 ELISA 分析中生成的标准曲线的内插法来确定单独的组胺水平。对来自样品的结果进行调整以允许稀释。当在冻融的阳性对照中发现肽 / 过敏原制备物的两个或以上连续稀释引起 > 15% 的总组胺释放 (> 15% 的阳性对照),或在所检验的最高浓度处 (对于肽为 10 μ g/mL) 获得 > 15% 的阳性对照的单个值时,认为是“阳性组胺释放”。

[0426] 在研究中完成了总共 45 个组胺释放分析。由于培养基加缓冲液阴性对照孔中不可接受的高水平 (> 15%) 组胺释放或阳性对照孔中无任何响应,排除了这些中的 3 个分析。因此分析中包括总共 42 个受试者。研究发现总结于表 9。

	蛋白浓度 (μ g/mL)	具有阳性组胺释放 ($\geq 15\%$) 的受试者	平均组胺释放 (% 阳性对照) n=42	范围 (% 阳性对照)
[0427]	7 肽组合 * (10)	0/42	0	0-4
	全草 (100)	32/42	41	2-152
	全草 (0.01)	21/42	24	0-84

[0428] *7 肽组合 :Ber01、Ber02、Ber02C、Bio02A、Rye09B1、Tim07B1 和 Bio04A。

[0429] 全草过敏原制备物在 100 μ g/mL 时在 32/42 (76%) 的受试者中诱导了 15% 或更高的组胺释放。即使在 10ng/mL 的最低浓度,全过敏原在 21/42 的个体 (50%) 中诱导了高水平的组胺释放。

[0430] 相比之下,7 肽组合即使在示出了数据的最高浓度处也不能在所检验的 42 个受试者的任何一个中引起显著的组胺释放,最高浓度时每种肽以 10 μ g/mL 存在。这是比仍在半数以上的受试者中引发非常高水平的组胺释放的全过敏原的浓度 (10ng/mL) 高 1000 倍的浓度。因此即使在高度敏感的个体中,7 肽组合导致 IgE 介导的反应的潜力是可忽略的。

[0431] 考虑到该分析中所检验的肽剂量与遵循草疫苗的临床给药的肽的可能浓度相比大量过量,预期施用 7 肽组合将不会通过 IgE 介导的或直接肽介导的嗜碱性粒细胞或肥大细胞活化和脱粒导致显著的组胺释放。组胺释放数据表明 7 肽组合不会引起嗜碱性粒细胞的活化,因此在草过敏性个体中引起 IgE 介导的急性过敏性反应 (系统性的或皮肤局部的) 的潜力非常低。

[0001]

序列表

<110> 切尔卡西亚有限公司

<120> 用于疫苗的草肽

<130> N. 102658B

<150> GB 0901928.2

<151> 2009-02-05

<150> GB 0901927.4

<151> 2009-02-05

<150> GB 09012578.2

<151> 2009-07-20

<150> PCT/GB09/01995

<151> 2009-08-14

<150> GB 0917871.6

<151> 2009-10-12

<160> 143

<170> PatentIn 3.5 版

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> 狗牙根 (Cynodon dactylon)

<400> 1

Ser Gly Lys Ala Phe Gly Ala Met Ala Lys Lys Gly Gln Glu Asp
1 5 10 15

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> 狗牙根 (Cynodon dactylon)

<400> 2

[0002]

Phe Ile Pro Met Lys Ser Ser Trp Gly Ala
1 5 10

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213> 狗牙根 (Cynodon dactylon)

<400> 3

Trp Gly Ala Ile Trp Arg Ile Asp Pro Lys Lys Pro Leu
1 5 10

<210> 4

<211> 18

<212> PRT

<213> 狗牙根 (Cynodon dactylon)

<400> 4

Lys Asp Ser Asp Glu Phe Ile Pro Met Lys Ser Ser Trp Gly Ala Ile
1 5 10 15

Trp Arg

<210> 5

<211> 17

<212> PRT

<213> 狗牙根 (Cynodon dactylon)

<400> 5

Lys Ser Ser Trp Gly Ala Ile Trp Arg Ile Asp Pro Lys Lys Pro Leu
1 5 10 15

Lys

[0003]

<210> 6
<211> 18
<212> PRT
<213> 狗牙根 (Cynodon dactylon)

<400> 6

Met Lys Ser Ser Trp Gly Ala Ile Trp Arg Ile Asp Pro Lys Lys Pro
1 5 10 15

Leu Lys

<210> 7
<211> 18
<212> PRT
<213> 狗牙根 (Cynodon dactylon)

<400> 7

Met Lys Ser Ser Trp Gly Ala Ile Trp Arg Ile Asp Pro Pro Lys Pro
1 5 10 15

Leu Lys

<210> 8
<211> 14
<212> PRT
<213> 狗牙根 (Cynodon dactylon)

<400> 8

Ile Pro Ala Asn Trp Lys Pro Asp Thr Val Tyr Thr Ser Lys
1 5 10

<210> 9

[0004]

<211> 14

<212> PRT

<213> 狗牙根 (Cynodon dactylon)

<400> 9

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

1 5 10

<210> 10

<211> 12

<212> PRT

<213> 狗牙根 (Cynodon dactylon)

<400> 10

Ala Tyr His Phe Asp Leu Ser Gly Lys Ala Phe Gly

1 5 10

<210> 11

<211> 15

<212> PRT

<213> 黑麦草 (Lolium perenne)

<400> 11

Leu Asp Ala Lys Ser Thr Trp Tyr Gly Lys Pro Thr Gly Ala Gly

1 5 10 15

<210> 12

<211> 17

<212> PRT

<213> 黑麦草 (Lolium perenne)

<400> 12

Lys Trp Leu Asp Ala Lys Ser Thr Trp Tyr Gly Lys Pro Thr Gly Ala

1 5 10 15

Gly

[0005]

<210> 13
<211> 17
<212> PRT
<213> 黑麦草 (Lolium perenne)

<400> 13

Phe Gly Ser Met Ala Lys Lys Gly Glu Glu Gln Asn Val Arg Ser Ala
1 5 10 15

Gly

<210> 14
<211> 18
<212> PRT
<213> 黑麦草 (Lolium perenne)

<400> 14

His Ala Phe Gly Met Ala Lys Lys Gly Glu Glu Gln Asn Val Arg Ser
1 5 10 15

Ala Gly

<210> 15
<211> 14
<212> PRT
<213> 黑麦草 (Lolium perenne)

<400> 15

Ser Asn Pro Asn Tyr Leu Ala Ile Leu Val Lys Tyr Val Asp
1 5 10

[0006]

<210> 16
<211> 13
<212> PRT
<213> 黑麦草 (Lolium perenne)

<400> 16

Trp Gly Ala Val Trp Arg Ile Asp Thr Pro Asp Lys Leu
1 5 10

<210> 17
<211> 16
<212> PRT
<213> 黑麦草 (Lolium perenne)

<400> 17

Lys Glu Ser Trp Gly Ala Val Trp Arg Ile Asp Thr Pro Asp Lys Leu
1 5 10 15

<210> 18
<211> 18
<212> PRT
<213> 黑麦草 (Lolium perenne)

<400> 18

Lys Glu Ser Trp Gly Ala Val Trp Arg Ile Asp Thr Pro Asp Lys Leu
1 5 10 15

Gly Pro

<210> 19
<211> 14
<212> PRT
<213> 黑麦草 (Lolium perenne)

<400> 19

[0007]

Ala Pro Tyr His Phe Asp Leu Ser Gly His Ala Phe Gly Ser
1 5 10

<210> 20

<211> 23

<212> PRT

<213> 猫尾草 (Phleum pratense)

<400> 20

Gly Asp Glu Gln Lys Leu Arg Ser Ala Gly Glu Leu Glu Leu Gln Phe
1 5 10 15

Arg Arg Val Lys Cys Lys Tyr
20

<210> 21

<211> 19

<212> PRT

<213> 猫尾草 (Phleum pratense)

<400> 21

Asn Pro Asn Tyr Leu Ala Leu Leu Val Lys Tyr Val Asn Gly Asp Gly
1 5 10 15

Asp Val Val

<210> 22

<211> 19

<212> PRT

<213> 猫尾草 (Phleum pratense)

<400> 22

Lys Glu Ser Trp Gly Ala Ile Trp Arg Ile Asp Thr Pro Asp Lys Leu
1 5 10 15

[0008]

Thr Gly Pro

<210> 23

<211> 13

<212> PRT

<213> 猫尾草 (Phleum pratense)

<400> 23

Pro Glu Gly Trp Lys Ala Asp Thr Ser Tyr Glu Ser Lys

1 5 10

<210> 24

<211> 17

<212> PRT

<213> 猫尾草 (Phleum pratense)

<400> 24

Phe Gly Ala Met Ala Lys Lys Gly Asp Glu Gln Lys Leu Arg Ser Ala

1 5 10 15

Gly

<210> 25

<211> 19

<212> PRT

<213> 猫尾草 (Phleum pratense)

<400> 25

His Ala Phe Gly Ala Met Ala Lys Lys Gly Asp Glu Gln Lys Leu Arg

1 5 10 15

Ser Ala Gly

[0009]

<210> 26
<211> 16
<212> PRT
<213> 猫尾草 (Phleum pratense)

<400> 26

Ser Asn Pro Asn Tyr Leu Ala Leu Leu Val Lys Tyr Val Asn Gly Asp
1 5 10 15

<210> 27
<211> 13
<212> PRT
<213> 猫尾草 (Phleum pratense)

<400> 27

Trp Gly Ala Ile Trp Arg Ile Asp Thr Pro Asp Lys Leu
1 5 10

<210> 28
<211> 14
<212> PRT
<213> 黑麦草 (Lolium perenne)

<400> 28

Lys Tyr Asp Ala Tyr Val Ala Thr Leu Thr Glu Ala Leu Arg
1 5 10

<210> 29
<211> 18
<212> PRT
<213> 黑麦草 (Lolium perenne)

<400> 29

Lys Phe Ile Pro Thr Leu Val Ala Ala Val Lys Gln Ala Tyr Ala Ala
1 5 10 15

[0010]

Lys Gln

<210> 30

<211> 19

<212> PRT

<213> 黑麦草 (Lolium perenne)

<400> 30

Tyr Lys Phe Ile Pro Thr Leu Val Ala Ala Val Lys Gln Ala Tyr Ala
1 5 10 15

Ala Lys Gln

<210> 31

<211> 13

<212> PRT

<213> 黑麦草 (Lolium perenne)

<400> 31

Leu Lys Lys Ala Val Thr Ala Met Ser Glu Ala Glu Lys
1 5 10

<210> 32

<211> 17

<212> PRT

<213> 黑麦草 (Lolium perenne)

<400> 32

Pro Glu Thr Ala Leu Lys Lys Ala Val Thr Ala Met Ser Glu Ala Glu
1 5 10 15

Lys

[0011]

<210> 33
<211> 15
<212> PRT
<213> 黑麦草 (*Lolium perenne*)

<400> 33

Lys Phe Thr Val Phe Glu Ser Ala Phe Asn Lys Ala Leu Asn Glu
1 5 10 15

<210> 34
<211> 18
<212> PRT
<213> 黑麦草 (*Lolium perenne*)

<400> 34

Phe Lys Ala Ala Val Ala Ala Ala Ala Asn Ala Pro Pro Ala Asp Lys
1 5 10 15

Phe Lys

<210> 35
<211> 17
<212> PRT
<213> 黑麦草 (*Lolium perenne*)

<400> 35

Asn Ala Gly Phe Lys Ala Ala Val Ala Ala Ala Ala Asn Ala Pro Pro
1 5 10 15

Lys

[0012]

<210> 36
<211> 14
<212> PRT
<213> 黑麦草 (Lolium perenne)

<400> 36

Lys Tyr Asp Ala Phe Val Thr Ala Leu Thr Glu Ala Leu Arg
1 5 10

<210> 37
<211> 17
<212> PRT
<213> 黑麦草 (Lolium perenne)

<400> 37

Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Phe Val Thr Ala Leu Thr Glu Ala Leu
1 5 10 15

Arg

<210> 38
<211> 14
<212> PRT
<213> 黑麦草 (Lolium perenne)

<400> 38

Gly Glu Leu Gln Ile Val Asp Lys Ile Asp Ala Ala Phe Lys
1 5 10

<210> 39
<211> 15
<212> PRT
<213> 黑麦草 (Lolium perenne)

<400> 39

[0013]

Lys Ile Pro Thr Gly Glu Leu Gln Ile Val Asp Lys Ile Asp Ala
1 5 10 15

<210> 40

<211> 16

<212> PRT

<213> 黑麦草 (Lolium perenne)

<400> 40

Phe Lys Ile Ala Ala Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro Thr Asn Asp Lys
1 5 10 15

<210> 41

<211> 17

<212> PRT

<213> 黑麦草 (Lolium perenne)

<400> 41

Ala Phe Lys Ile Ala Ala Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro Thr Asn Asp
1 5 10 15

Lys

<210> 42

<211> 15

<212> PRT

<213> 黑麦草 (Lolium perenne)

<400> 42

Tyr Lys Phe Ile Pro Ser Leu Glu Ala Ala Val Lys Gln Ala Tyr
1 5 10 15

<210> 43

<211> 17

<212> PRT

[0014]

<213> 黑麦草 (Lolium perenne)

<400> 43

Glu Thr Tyr Lys Phe Ile Pro Ser Leu Glu Ala Ala Val Lys Gln Ala
1 5 10 15

Tyr

<210> 44

<211> 13

<212> PRT

<213> 黑麦草 (Lolium perenne)

<400> 44

Asp Ser Tyr Lys Phe Ile Pro Thr Leu Val Ala Val Lys
1 5 10

<210> 45

<211> 16

<212> PRT

<213> 黑麦草 (Lolium perenne)

<400> 45

Leu Thr Lys Ala Ile Thr Ala Met Thr Gln Ala Gln Lys Ala Gly Lys
1 5 10 15

<210> 46

<211> 17

<212> PRT

<213> 黑麦草 (Lolium perenne)

<400> 46

Pro Glu Val Lys Tyr Ala Val Phe Glu Ala Ala Leu Thr Lys Ala Ile
1 5 10 15

[0015]

Thr

.

<210> 47

<211> 17

<212> PRT

<213> 黑麦草 (Lolium perenne)

<400> 47

Lys Tyr Ala Val Phe Glu Ala Ala Leu Thr Lys Ala Ile Thr Ala Met
1 5 10 15

Thr

.

<210> 48

<211> 15

<212> PRT

<213> 黑麦草 (Lolium perenne)

<400> 48

Asp Lys Phe Lys Ile Phe Glu Ala Ala Phe Ser Glu Ser Ser Lys
1 5 10 15

<210> 49

<211> 13

<212> PRT

<213> 黑麦草 (Lolium perenne)

<400> 49

.

Thr Pro Leu Arg Arg Thr Ser Ser Arg Ser Ser Arg Pro
1 5 10

<210> 50

<211> 14

[0016]

<212> PRT

<213> 黑麦草 (*Lolium perenne*)

<400> 50

Asp Val Ala Tyr Lys Ala Ala Glu Ala His Pro Arg Gly Gln

1 5 10

<210> 51

<211> 13

<212> PRT

<213> 黑麦草 (*Lolium perenne*)

<400> 51

Ala Leu Arg Val Ile Ala Gly Thr Leu Glu Val His Ala

1 5 10

<210> 52

<211> 14

<212> PRT

<213> 黑麦草 (*Lolium perenne*)

<400> 52

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

1 5 10

<210> 53

<211> 18

<212> PRT

<213> 猫尾草 (*Phleum pratense*)

<400> 53

Lys Tyr Thr Val Phe Glu Thr Ala Leu Lys Lys Ala Ile Thr Ala Met

1 5 10 15

Ser Glu

[0017]

<210> 54
<211> 9
<212> PRT
<213> 猫尾草 (Phleum pratense)

<400> 54

Leu Lys Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser
1 5

<210> 55
<211> 13
<212> PRT
<213> 猫尾草 (Phleum pratense)

<400> 55

Pro Glu Thr Ala Leu Lys Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser
1 5 10

<210> 56
<211> 19
<212> PRT
<213> 猫尾草 (Phleum pratense)

<400> 56

Ile Glu Lys Ile Asn Ala Gly Phe Lys Ala Ala Leu Ala Gly Ala Gly
1 5 10 15

Val Gln Pro

<210> 57
<211> 24
<212> PRT
<213> 猫尾草 (Phleum pratense)

[0018]

<400> 57

Gly Ala Gly Val Gln Pro Ala Asp Lys Tyr Arg Thr Phe Val Ala Thr
1 5 10 15

Phe Gly Pro Ala Ser Asn Lys Ala
20

<210> 58

<211> 25

<212> PRT

<213> 猫尾草 (Phleum pratense)

<400> 58

Ala Leu Thr Ser Lys Leu Asp Ala Ala Tyr Lys Leu Ala Tyr Lys Thr
1 5 10 15

Ala Glu Gly Ala Thr Pro Glu Ala Lys
20 25

<210> 59

<211> 21

<212> PRT

<213> 猫尾草 (Phleum pratense)

<400> 59

Ile Glu Lys Val Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala Ala Thr Ala Ala Asn
1 5 10 15

Ala Ala Pro Ala Asn
20

<210> 60

<211> 21

<212> PRT

<213> 猫尾草 (Phleum pratense)

[0019]

<400> 60

Tyr Glu Ser Tyr Lys Phe Ile Pro Ala Leu Glu Ala Ala Val Lys Gln
1 5 10 15

Ala Tyr Ala Ala Thr
20

<210> 61

<211> 22

<212> PRT

<213> 猫尾草 (Phleum pratense)

<400> 61

Glu Val Lys Tyr Thr Val Phe Glu Thr Ala Leu Lys Lys Ala Ile Thr
1 5 10 15

Ala Met Ser Glu Ala Gln
20

<210> 62

<211> 21

<212> PRT

<213> 猫尾草 (Phleum pratense)

<400> 62

Asp Ile Asn Val Gly Phe Lys Ala Ala Val Ala Ala Ala Ala Ser Val
1 5 10 15

Pro Ala Ala Asp Lys
20

<210> 63

<211> 24

<212> PRT

[0020]

<213> 猫尾草 (Phleum pratense)

<400> 63

Phe Asp Ser Phe Val Ala Ser Leu Thr Glu Ala Leu Arg Val Ile Ala
1 5 10 15

Gly Ala Leu Glu Val His Ala Val
20

<210> 64

<211> 19

<212> PRT

<213> 猫尾草 (Phleum pratense)

<400> 64

Ile Asp Lys Ile Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala Ala Thr Ala Ala Ala
1 5 10 15

Thr Ala Pro

<210> 65

<211> 27

<212> PRT

<213> 猫尾草 (Phleum pratense)

<400> 65

Ile Pro Ser Leu Glu Ala Ala Val Lys Gln Ala Tyr Ala Ala Thr Val
1 5 10 15

Ala Ala Ala Pro Gln Val Lys Tyr Ala Val Phe
20 25

<210> 66

<211> 19

[0021]

<212> PRT

<213> 猫尾草 (Phleum pratense)

<400> 66

Tyr Ala Val Phe Glu Ala Ala Leu Thr Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser
1 5 10 15

Glu Val Gln

<210> 67

<211> 18

<212> PRT

<213> 猫尾草 (Phleum pratense)

<400> 67

Phe Lys Ala Ala Val Ala Ala Ala Ala Ser Val Pro Ala Ala Asp Lys
1 5 10 15

Phe Lys

<210> 68

<211> 14

<212> PRT

<213> 猫尾草 (Phleum pratense)

<400> 68

Lys Phe Asp Ser Phe Val Ala Ser Leu Thr Glu Ala Leu Arg
1 5 10

<210> 69

<211> 15

<212> PRT

<213> 猫尾草 (Phleum pratense)

[0022]

<400> 69

Lys Ile Pro Ala Gly Glu Leu Gln Ile Ile Asp Lys Ile Asp Ala
1 5 10 15

<210> 70

<211> 16

<212> PRT

<213> 猫尾草 (Phleum pratense)

<400> 70

Phe Lys Val Ala Ala Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro Ala Asn Asp Lys
1 5 10 15

<210> 71

<211> 15

<212> PRT

<213> 猫尾草 (Phleum pratense)

<400> 71

Tyr Lys Phe Ile Pro Ala Leu Glu Ala Ala Val Lys Gln Ala Tyr
1 5 10 15

<210> 72

<211> 19

<212> PRT

<213> 猫尾草 (Phleum pratense)

<400> 72

Pro Glu Glu Ser Tyr Lys Phe Ile Pro Ala Leu Glu Ala Ala Val Lys
1 5 10 15

Gln Ala Tyr

<210> 73

[0023]

<211> 16
<212> PRT
<213> 猫尾草 (Phleum pratense)

<400> 73

Leu Thr Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser Glu Val Gln Lys Val Ser Gln
1 5 10 15

<210> 74
<211> 15
<212> PRT
<213> 狗牙根 (Cynodon dactylon)

<400> 74

Ser Gly Lys Ala Phe Gly Ala Met Ala Lys Lys Gly Glu Glu Asp
1 5 10 15

<210> 75
<211> 15
<212> PRT
<213> 绒毛草 (Holcus lanatus)

<400> 75

Ser Gly His Ala Phe Gly Ser Met Ala Lys Lys Gly Glu Glu Asp
1 5 10 15

<210> 76
<211> 15
<212> PRT
<213> 鸭茅 (Dactylis glomerata)

<400> 76

Ser Gly Ile Ala Phe Gly Ser Met Ala Lys Lys Gly Asp Glu Asp
1 5 10 15

<210> 77

[0024]

<211> 15
<212> PRT
<213> 玉米 (*Zea mays*)

<400> 77

Ser Gly Thr Ala Phe Gly Ala Met Ala Lys Lys Gly Glu Glu Glu
1 5 10 15

<210> 78
<211> 14
<212> PRT
<213> 大麦 (*Hordeum vulgare*)

<400> 78

Lys Tyr Asp Ala Tyr Val Ala Thr Leu Thr Glu Ser Leu Arg
1 5 10

<210> 79
<211> 14
<212> PRT
<213> 猫尾草 (*Phleum pratense*)

<400> 79

Lys Tyr Asp Ala Tyr Val Ala Thr Leu Ser Glu Ala Leu Arg
1 5 10

<210> 80
<211> 14
<212> PRT
<213> 鸭茅 (*Dactylis glomerata*)

<400> 80

Lys Tyr Asp Ala Phe Val Ala Ala Leu Thr Glu Ala Leu Arg
1 5 10

<210> 81

[0025]

<211> 14

<212> PRT

<213> 绒毛草 (*Holcus lanatus*)

<400> 81

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

1 5 10

<210> 82

<211> 16

<212> PRT

<213> 鸭茅 (*Dactylis glomerata*)

<400> 82

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

1 5 10 15

<210> 83

<211> 16

<212> PRT

<213> 猫尾草 (*Phleum pratense*)

<400> 83

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

1 5 10 15

<210> 84

<211> 15

<212> PRT

<213> 鸭茅 (*Dactylis glomerata*)

<400> 84

Lys Ile Pro Ala Gly Glu Leu Gln Ile Val Asp Lys Ile Asp Ala

1 5 10 15

<210> 85

[0026]

<211> 15

<212> PRT

<213> 黑麦草 (*Lolium perenne*)

<400> 85

Lys Ile Pro Thr Gly Glu Leu Gln Ile Val Asp Lys Ile Asp Ala
1 5 10 15

.

<210> 86

<211> 15

<212> PRT

<213> 草地早熟禾 (*Poa pratensis*)

<400> 86

Lys Ile Pro Ala Gly Glu Gln Gln Ile Ile Asp Lys Ile Asp Ala
1 5 10 15

<210> 87

<211> 13

<212> PRT

<213> 猫尾草 (*Phleum pratense*)

<400> 87

.

Leu Lys Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser Glu Ala Gln Lys
1 5 10

<210> 88

<211> 13

<212> PRT

<213> 草地早熟禾 (*Poa pratensis*)

<400> 88

Leu Lys Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser Glu Ala Gln Lys
1 5 10

<210> 89

[0027]

<211> 15
<212> PRT
<213> 藜草 (Phalaris aquatica)

<400> 89

Lys Glu Ser Trp Gly Ala Ile Trp Arg Ile Asp Thr Pro Asp Lys
1 5 10 15

<210> 90
<211> 17
<212> PRT
<213> 猫尾草 (Phleum pratense)

<400> 90

Pro Gln Val Lys Tyr Ala Val Phe Glu Ala Ala Leu Thr Lys Ala Ile
1 5 10 15

Thr

<210> 91
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Rye09B1 肽

<400> 91

Lys Pro Glu Val Lys Tyr Ala Val Phe Glu Ala Ala Leu Thr Lys Ala
1 5 10 15

Ile Thr

<210> 92

[0028]

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Rye09B2 肽

<400> 92

Lys Lys Pro Glu Val Lys Tyr Ala Val Phe Glu Ala Ala Leu Thr Lys

1

5

10

15

Ala Ile Thr

<210> 93

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Tim07B1 肽

<400> 93

Lys Lys Ile Pro Ala Gly Glu Leu Gln Ile Ile Asp Lys Ile Asp Ala

1

5

10

15

<210> 94

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Tim07B2 肽

<400> 94

Lys Lys Ile Pro Ala Gly Glu Leu Gln Ile Ile Asp Lys Ile Asp Ala

1

5

10

15

[0029]

Lys

<210> 95

<211> 20

<212> PRT

<213> 狗牙根 (Cynodon dactylon)

<400> 95

Ser	Gly	Lys	Ala	Phe	Gly	Ala	Met	Ala	Lys	Lys	Gly	Gln	Glu	Asp	Lys
1			5						10					15	

Leu	Arg	Lys	Ala
			20

<210> 96

<211> 29

<212> PRT

<213> 狗牙根 (Cynodon dactylon)

<400> 96

Pro	Lys	Asp	Ser	Asp	Glu	Phe	Ile	Pro	Met	Lys	Ser	Ser	Trp	Gly	Ala
1			5						10					15	

Ile	Trp	Arg	Ile	Asp	Pro	Lys	Lys	Pro	Leu	Lys	Gly	Pro
			20						25			

<210> 97

<211> 29

<212> PRT

<213> 狗牙根 (Cynodon dactylon)

<400> 97

Arg	Leu	Thr	Ser	Glu	Gly	Gly	Ala	His	Leu	Val	Gln	Asp	Asp	Val	Ile
1			5						10					15	

[0030]

Pro Ala Asn Trp Lys Pro Asp Thr Val Tyr Thr Ser Lys
20 25

<210> 98
<211> 20
<212> PRT
<213> 黑麦草 (Lolium perenne)

<400> 98

Leu Asp Ala Lys Ser Thr Trp Tyr Gly Lys Pro Thr Gly Ala Gly Pro
1 5 10 15

Lys Asp Asn Gly
20

<210> 99
<211> 20
<212> PRT
<213> 黑麦草 (Lolium perenne)

<400> 99

Gly His Ala Phe Gly Ser Met Ala Lys Lys Gly Glu Glu Gln Asn Val
1 5 10 15

Arg Ser Ala Gly
20

<210> 100
<211> 20
<212> PRT
<213> 黑麦草 (Lolium perenne)

<400> 100

[0031]

Gly Ser Asn Pro Asn Tyr Leu Ala Ile Leu Val Lys Tyr Val Asp Gly
1 5 10 15

Asp Gly Asp Val
20

<210> 101
<211> 20
<212> PRT
<213> 黑麦草 (Lolium perenne)

<400> 101

Lys Glu Ser Trp Gly Ala Val Trp Arg Ile Asp Thr Pro Asp Lys Leu
1 5 10 15

Thr Gly Pro Phe
20

<210> 102
<211> 17
<212> PRT
<213> 黑麦草 (Lolium perenne)

<400> 102

Ala Tyr Val Ala Thr Leu Thr Glu Ala Leu Arg Val Ile Ala Gly Thr
1 5 10 15

Leu

<210> 103
<211> 20
<212> PRT
<213> 黑麦草 (Lolium perenne)

<400> 103

[0032]

Lys Phe Ile Pro Thr Leu Val Ala Ala Val Lys Gln Ala Tyr Ala Ala
1 5 10 15

Lys Gln Ala Thr .
20

<210> 104
<211> 17
<212> PRT
<213> 黑麦草 (Lolium perenne)

<400> 104

Thr Ala Leu Lys Lys Ala Val Thr Ala Met Ser Glu Ala Glu Lys Glu
1 5 10 15

Ala

<210> 105
<211> 17
<212> PRT
<213> 黑麦草 (Lolium perenne)

<400> 105

Asn Asp Lys Phe Thr Val Phe Glu Ser Ala Phe Asn Lys Ala Leu Asn
1 5 10 15

Glu

<210> 106
<211> 20
<212> PRT
<213> 黑麦草 (Lolium perenne)

[0033]

<400> 106

Asp Val Asn Ala Gly Phe Lys Ala Ala Val Ala Ala Ala Ala Asn Ala
1 5 10 15

Pro Pro Ala Asp
20

<210> 107

<211> 20

<212> PRT

<213> 黑麦草 (Lolium perenne)

<400> 107

Gly Ala Thr Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Phe Val Thr Ala Leu Thr
1 5 10 15

Glu Ala Leu Arg
20

<210> 108

<211> 29

<212> PRT

<213> 黑麦草 (Lolium perenne)

<400> 108

Gly Glu Leu Gln Ile Val Asp Lys Ile Asp Ala Ala Phe Lys Ile Ala
1 5 10 15

Ala Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro Thr Asn Asp Lys Phe
20 25

<210> 109

<211> 20

<212> PRT

<213> 黑麦草 (Lolium perenne)

[0034]

<400> 109

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

Lys Gln Ala Tyr
20

<210> 110

<211> 29

<212> PRT

<213> 黑麦草 (*Lolium perenne*)

<400> 110

Pro Glu Val Lys Tyr Ala Val Phe Glu Ala Ala Leu Thr Lys Ala Ile
1 5 10 15

Thr Ala Met Thr Gln Ala Gln Lys Ala Gly Lys Pro Ala
20 25

<210> 111

<211> 23

<212> PRT

<213> 猫尾草 (*Phleum pratense*)

<400> 111

Pro Glu Val Lys Tyr Thr Val Phe Glu Thr Ala Leu Lys Lys Ala Ile
1 5 10 15

Thr Ala Met Ser Glu Ala Gln
20

<210> 112

<211> 17

<212> PRT

[0035]

<213> 黑麦草 (Lolium perenne)

<400> 112

Gln Lys Leu Ile Glu Lys Ile Asn Ala Gly Phe Lys Ala Ala Val Ala
1 5 10 15

Ala

<210> 113

<211> 20

<212> PRT

<213> 猫尾草 (Phleum pratense)

<400> 113

Gly His Ala Phe Gly Ala Met Ala Lys Lys Gly Asp Glu Gln Lys Leu
1 5 10 15

Arg Ser Ala Gly
20

<210> 114

<211> 20

<212> PRT

<213> 猫尾草 (Phleum pratense)

<400> 114

Gly Ser Asn Pro Asn Tyr Leu Ala Leu Leu Val Lys Tyr Val Asn Gly
1 5 10 15

Asp Gly Asp Val
20

<210> 115

<211> 28

[0036]

<212> PRT

<213> 猫尾草 (Phleum pratense)

<400> 115

Gly Lys Asp Lys Trp Ile Glu Leu Lys Glu Ser Trp Gly Ala Ile Trp
1 5 10 15

Arg Ile Asp Thr Pro Asp Lys Leu Thr Gly Pro Phe
20 25

<210> 116

<211> 27

<212> PRT

<213> 狗牙根 (Cynodon dactylon)

<400> 116

Pro Lys Asp Ser Asp Glu Phe Ile Pro Met Lys Ser Ser Trp Gly Ala
1 5 10 15

Ile Trp Arg Ile Asp Pro Lys Lys Pro Leu Lys
20 25

<210> 117

<211> 25

<212> PRT

<213> 狗牙根 (Cynodon dactylon)

<400> 117

Glu Gly Gly Ala His Leu Val Gln Asp Asp Val Ile Pro Ala Asn Trp
1 5 10 15

Lys Pro Asp Thr Val Tyr Thr Ser Lys
20 25

<210> 118

[0037]

<211> 25
<212> PRT
<213> 猫尾草 (Phleum pratense)

<400> 118

Glu Gly Gly Thr Lys Thr Glu Ala Glu Asp Val Ile Pro Glu Gly Trp
1 5 10 15

Lys Ala Asp Thr Ser Tyr Glu Ser Lys
20 25

<210> 119
<211> 19
<212> PRT
<213> 猫尾草 (Phleum pratense)

<400> 119

Lys Ile Asn Ala Gly Phe Lys Ala Ala Leu Ala Gly Ala Gly Val Gln
1 5 10 15

Pro Ala Asp

<210> 120
<211> 20
<212> PRT
<213> 猫尾草 (Phleum pratense)

<400> 120

Lys Ile Asn Asp Gly Phe Lys Ala Ala Leu Ala Ala Ala Gly Val
1 5 10 15

Pro Pro Ala Asp
20

[0038]

<210> 121
<211> 20
<212> PRT
<213> 猫尾草 (Phleum pratense)

<400> 121

Asp Ile Asn Val Gly Phe Lys Ala Ala Val Ala Ala Ala Ala Ser Val
1 5 10 15

Pro Ala Ala Asp
20

<210> 122
<211> 20
<212> PRT
<213> 猫尾草 (Phleum pratense)

<400> 122

Gly Ala Thr Pro Glu Ala Lys Tyr Asp Ala Tyr Val Ala Thr Leu Ser
1 5 10 15

Glu Ala Leu Arg
20

<210> 123
<211> 20
<212> PRT
<213> 猫尾草 (Phleum pratense)

<400> 123

Gly Ala Thr Pro Glu Ala Lys Phe Asp Ser Phe Val Ala Ser Leu Thr
1 5 10 15

Glu Ala Leu Arg
20

[0039]

<210> 124
<211> 20
<212> PRT
<213> 黑麦草 (*Lolium perenne*)

<400> 124 .

Gly Glu Leu Gln Ile Val Asp Lys Ile Asp Ala Ala Phe Lys Ile Ala
1 5 10 15

Ala Thr Ala Ala
20

<210> 125
<211> 19
<212> PRT
<213> 猫尾草 (*Phleum pratense*)

<400> 125

Gly Glu Leu Gln Val Ile Glu Lys Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala Ala
1 5 10 15

Thr Ala Ala

<210> 126
<211> 20
<212> PRT
<213> 猫尾草 (*Phleum pratense*)

<400> 126

Gly Glu Leu Gln Val Ile Glu Lys Val Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala
1 5 10 15

Ala Thr Ala Ala .
20

[0040]

<210> 127

<211> 20

<212> PRT

<213> 猫尾草 (Phleum pratense)

<400> 127

Gly Glu Leu Gln Phe Ile Glu Lys Val Asp Ser Ala Leu Lys Val Ala
1 5 10 15

Ala Thr Ala Ala
20

<210> 128

<211> 20

<212> PRT

<213> 猫尾草 (Phleum pratense)

<400> 128

Gly Glu Leu Gln Ile Ile Asp Lys Ile Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala
1 5 10 15

Ala Thr Ala Ala
20

<210> 129

<211> 20

<212> PRT

<213> 黑麦草 (Lolium perenne)

<400> 129

Asp Ala Ala Phe Lys Ile Ala Ala Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro Thr
1 5 10 15

Asn Asp Lys Phe
20

[0041]

<210> 130
<211> 20
<212> PRT
<213> 猫尾草 (Phleum pratense)

<400> 130

Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala Ala Thr Ala Ala Asn Ala Ala Pro Ala
1 5 10 15

Asn Asp Lys Phe
20

<210> 131
<211> 20
<212> PRT
<213> 猫尾草 (Phleum pratense)

<400> 131

Asp Ser Ala Leu Lys Val Ala Ala Thr Ala Ala Asn Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

Asn Asp Lys Phe
20

<210> 132
<211> 20
<212> PRT
<213> 猫尾草 (Phleum pratense)

<400> 132

Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala Ala Thr Ala Ala Ala Thr Ala Pro Ala
1 5 10 15

Asp Asp Lys Phe
20

[0042]

<210> 133
<211> 20
<212> PRT
<213> 猫尾草 (Phleum pratense)

<400> 133

Gly Ala Tyr Glu Ser Tyr Lys Phe Ile Pro Ala Leu Glu Ala Ala Val
1 5 10 15

Lys Gln Ala Tyr
20

<210> 134
<211> 20
<212> PRT
<213> 猫尾草 (Phleum pratense)

<400> 134

Gly Ala Tyr Asp Thr Tyr Lys Cys Ile Pro Ser Leu Glu Ala Ala Val
1 5 10 15

Lys Gln Ala Tyr
20

<210> 135
<211> 20
<212> PRT
<213> 黑麦草 (Lolium perenne)

<400> 135

Pro Glu Val Lys Tyr Ala Val Phe Glu Ala Ala Leu Thr Lys Ala Ile
1 5 10 15

Thr Ala Met Thr
20

[0043]

<210> 136
<211> 20
<212> PRT
<213> 猫尾草 (Phleum pratense)

<400> 136

Pro Glu Val Lys Tyr Thr Val Phe Glu Thr Ala Leu Lys Lys Ala Ile
1 5 10 15

Thr Ala Met Ser
20

<210> 137
<211> 20
<212> PRT
<213> 猫尾草 (Phleum pratense)

<400> 137

Ala Glu Val Lys Tyr Ala Val Phe Glu Ala Ala Leu Thr Lys Ala Ile
1 5 10 15

Thr Ala Met Ser
20

<210> 138
<211> 20
<212> PRT
<213> 黑麦草 (Lolium perenne)

<400> 138

Ala Ala Leu Thr Lys Ala Ile Thr Ala Met Thr Gln Ala Gln Lys Ala
1 5 10 15

Gly Lys Pro Ala
20

[0044]

<210> 139
<211> 20
<212> PRT
<213> 猫尾草 (Phleum pratense)

<400> 139

Thr Ala Leu Lys Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser Glu Ala Gln Lys Ala
1 5 10 15

Ala Lys Pro Ala
20

<210> 140
<211> 20
<212> PRT
<213> 猫尾草 (Phleum pratense)

<400> 140

Ala Ala Leu Thr Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser Glu Val Gln Lys Val
1 5 10 15

Ser Gln Pro Ala
20

<210> 141
<211> 15
<212> PRT
<213> 结核分枝杆菌 (Mycobacterium tuberculosis)

<400> 141

Ala Lys Thr Ile Ala Tyr Asp Glu Glu Ala Arg Arg Gly Leu Glu
1 5 10 15

<210> 142

[0045]

<211> 13

<212> PRT

<213> 流感病毒

<400> 142

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

1 5 10

<210> 143

<211> 15

<212> PRT

<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 143

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

1 5 10 15