

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

[12] 发明专利申请公开说明书

C07K 16/00
C07K 16/42 A61K 39/00
A61K 39/385 A61K 39/395
G01N 33/577 G01N 33/68
A61P 37/08

[21] 申请号 00806614.0

[43]公开日 2002年5月8日

[11]公开号 CN 1348466A

[22]申请日 2000.2.22 [21]申请号 00806614.0

[30]优先权

- [32]1999.2.25 [33]GB [31]9904405.9
- [32]1999.3.29 [33]GB [31]9907151.6
- [32]1999.5.7 [33]GB [31]9910537.1
- [32]1999.5.7 [33]GB [31]9910538.9
- [32]1999.8.7 [33]GB [31]9918594.4
- [32]1999.8.7 [33]GB [31]9918603.3
- [32]1999.9.7 [33]GB [31]9921046.0
- [32]1999.9.7 [33]GB [31]9921047.8
- [32]1999.10.29 [33]GB [31]9925619.0
- [32]1999.11.23 [33]GB [31]9927698.2

[86]国际申请 PCT/EP00/01455 2000.2.22

[87]国际公布 WO00/50460 英 2000.8.31

[85]进入国家阶段日期 2001.10.22

[71]申请人 史密丝克莱恩比彻姆生物有限公司

地址 比利时里克森萨特

共同申请人 阿坎姆比斯研究有限公司

[72]发明人 M·戴森 M·弗里德 J·格林伍德

E·赫维特 A·拉蒙特 S·马森

R·兰达尔 W·G·图内尔

M·P·范梅切伦

C·维纳尔斯·Y·德巴索尔斯

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 姜建成

权利要求书 37 页 说明书 54 页 附图页数 32 页

[54]发明名称 衍生自 IgE Cε2 区的表位或模拟表位、其拮抗剂以及它们的治疗用途

[57]摘要

本发明涉及提供用于治疗、预防或缓解变应性疾病的
新药物。具体地说,所述新药物是加入 IgE Cε2 区表
面暴露区域的表位或模拟表位的分离的肽。本发明人
已经发现:这些新的区域可能是被动和主动免疫预防或
免疫治疗的靶。本发明还涉及所述药物、含所述药物的
药用组合物的生产方法以及所述药物和药用组合物在
医药中的应用。能够结合本发明的表面暴露 IgE 区域
的配体、尤其是单克隆抗体以及它们在医药中作为被动
免疫治疗或免疫预防的应用也构成了本发明的一个方
面。

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

权 利 要 求 书

1. 一种包含一个分离的 IgE Cε2 区的表面暴露表位或其模拟表位的肽。
- 5 2. 一种权利要求 1 中要求保护的肽, 其中所述 Cε2 的表面暴露表位是 P1 (SEQ ID No. 1)或其模拟表位。
3. 一种权利要求 1 中要求保护的肽, 其中所述 Cε2 的表面暴露表位是 P2 (SEQ ID No. 2)或其模拟表位。
4. 一种权利要求 1 中要求保护的肽, 其中所述 Cε2 的表面暴露表位是 P3 (SEQ ID No. 3)或其模拟表位。
- 10 5. 一种权利要求 1 中要求保护的肽, 其中所述 Cε2 的表面暴露表位是 P4 (SEQ ID No. 4)或其模拟表位。
6. 一种权利要求 1 中要求保护的肽, 其中所述 Cε2 的表面暴露表位是 P5 (SEQ ID No. 5)或其模拟表位。
- 15 7. 一种权利要求 1 中要求保护的肽, 其中所述 Cε2 的表面暴露表位是 P6 (SEQ ID No. 6)或其模拟表位。
8. 一种权利要求 1 中要求保护的肽, 其中所述 Cε2 的表面暴露表位是 P7 (SEQ ID No. 7)或其模拟表位。
9. 一种权利要求 1-8 的任一项中要求保护的模拟表位, 其中所述模拟表位是一种肽。
- 20 10. 一种权利要求 1 中要求保护的肽, 其中所述分离的表位衍生自 IgE Cε2 区的一种环结构。
11. 一种权利要求 10 中要求保护的肽, 其中所述 IgE Cε2 区的环结构是 A-B 环或 C-D 环。
- 25 12. 一种权利要求 2 中要求保护的肽, 其中所述 P1 的模拟表位是通式为 $hxdhhananxy$ 的肽;
 其中: h 为疏水性氨基酸残基; d 为提供离子键的氨基酸残基;
 a 为酸性氨基酸残基; n 为离子中性/非极性氨基酸残基; 而 x 为一种

氨基酸。

13. 一种权利要求 2 中要求保护的肽，其中所述 P1 的模拟表位为具有以下通式的肽：

Q, X₁, M, D, X₁, X₂, X₃

5 其中 X₁ 选自 V、I、L、M、F 或 A；X₂ 选自 D 或 E；而 X₃ 选自 L、I、V、M、A 或 F。

14. 一种权利要求 2 中要求保护的肽，其中所述 P1 的模拟表位选自 P15q (SEQ ID No. 11)、PT1079 (SEQ ID No. 13)、PT1079GS (SEQ ID No. 15)、PT1078 (SEQ ID No. 16)、PT15 (SEQ ID No. 8)。

10 15. 一种权利要求 3 中要求保护的肽，其中所述 P2 的模拟表位是 P16 (SEQ ID No. 24)。

16. 一种权利要求 4 中要求保护的肽，其中所述 P3 的模拟表位是 P17 (SEQ ID No. 26)。

15 17. 一种用于治疗变态反应的免疫原，其包含权利要求 1-16 的任一项中要求保护的肽或模拟表位，还包含一种载体分子。

18. 一种权利要求 17 中要求保护的免疫原，其中所述载体分子选自 D 蛋白或乙型肝炎核心抗原。

20 19. 一种权利要求 17 或 18 中要求保护的免疫原，其中所述免疫原是权利要求 1-16 中要求保护的肽或模拟表位的化学缀合物，或其中所述免疫原作为融合蛋白表达。

20. 一种权利要求 17-19 的任一项中要求保护的免疫原，其中所述肽或肽模拟表位存在于所述载体的一级序列中。

21. 一种用于治疗变态反应的疫苗，其包含权利要求 17-20 的任一项中要求保护的免疫原，还包含一种佐剂。

25 22. 一种能够识别 IgE Cε2 区的表面暴露表位的配体，其特征为所述配体不是 PTmAb0005。

23. 一种权利要求 22 中要求保护的配体，其中所述配体是 1999 年 3 月 8 日根据用于专利的微生物保存布达佩斯条约保藏于 ECACC、

保藏号为 99030805 的 PTmAb0011。

24. 一种药用组合物，其包含一种能够识别 IgE Cε2 区的表面暴露表位的配体。

5 25. 一种权利要求 24 中要求保护的药用组合物，其中所述配体能够识别 IgE Cε2 区的 C-D 环。

26. 一种权利要求 25 中要求保护的药用组合物，其中所述配体是选自 PTmAb0005 或 PTmAb0011 的单克隆抗体。

27. 一种用于医药的权利要求 1-16 的任一项中要求保护的肽。

28. 一种用于医药的权利要求 21 中要求保护的疫苗。

10 29. 一种用于医药的权利要求 17-20 的任一项中要求保护的免疫原。

30. 权利要求 1-16 的任一项中要求保护的肽在用于治疗或预防变态反应的药物生产方面的用途。

31. 一种能够识别 IgE Cε2 区的表面暴露表位、用于医药的配体。

15 32. 一种能够识别 IgE Cε2 区的表面暴露表位的配体在变态反应治疗药物生产方面的用途。

33. 权利要求 31 或 32 中要求保护的配体的用途，其中所述配体是 PTmAb0005 或 PTmAb0011。

34. PTmAb0005 或 PTmAb0011 在 P1 模拟表位鉴定方面的用途。

20 35. 一种能够为 PTmAb0005 或 PTmAb0011 所识别的肽。

36. 一种包含权利要求 35 中要求保护的肽的免疫原。

37. 一种权利要求 1-16 中要求保护的肽在诊断血液循环抗 IgE 抗体或从血液中亲和纯化循环抗 IgE 抗体方面的用途。

25 38. 一种生产疫苗的方法，包括生产权利要求 17-20 的任一项中要求保护的免疫原，并且将所述免疫原与一种佐剂一起配制。

39. 一种治疗患有或易患变态反应的患者的方法，包括给予所述患者一种权利要求 1-16 的任一项中要求保护的肽。

40. 一种治疗患有或易患变态反应的患者的方法，包括给予所述

患者一种权利要求 21 中要求保护的疫苗。

41. 一种治疗患有或易患变态反应的患者的方法，包括给予所述患者一种权利要求 24-26 的任一项中要求保护的药用组合物。

说明书

衍生自 IgE Cε2 区的表位或模拟表位、其拮抗剂 以及它们的治疗用途

5

本发明涉及提供用于治疗、预防或缓解变应性疾病的新药物。具体地说，所述新药物是加入 IgE Cε2 区表面暴露区域的表位或模拟表位(mimotope)的分离的肽。本发明人已经发现：这些新的区域可能是被动和主动免疫预防或免疫治疗的靶。本发明还涉及所述药物、含所述药物的药用组合物的生产方法以及所述药物和药用组合物在医学中的应用。能够结合本发明的表面暴露 IgE 区域的配体、尤其是单克隆抗体以及它们在医学中作为被动免疫治疗或免疫预防的应用也构成了本发明的一个方面。非肽模拟表位也是本发明的一个实施方案。

在变态反应中，通常与变态反应相关的症状是由于变态反应介质例如组胺从免疫细胞中释放到周围组织和脉管结构中而引起的。组胺通常贮藏在肥大细胞和嗜碱性粒细胞中，直至由于与变应原特异性 IgE 相互作用而触发这种释放。IgE 在变态反应(例如哮喘、食物过敏、特应性皮炎、I 型过敏反应和过敏性鼻炎)介导方面的作用是众所周知的。在遇到抗原例如花粉或尘螨变应原时，B 细胞开始合成变应原特异性 IgE。所述变应原特异性 IgE 随后与嗜碱性粒细胞和肥大细胞上的 FcεRI 受体(高亲和性 IgE 受体)结合。随后的任何一次与变应原的相遇均导致通过相邻 IgE/FcεRI 复合体的交联而触发肥大细胞或嗜碱性粒细胞释放组胺(Sutton 和 Gould, Nature, 1993, 366: 421-428; EP 0 477 231 B1)。

25 IgE 同所有免疫球蛋白一样，包含两条重链和两条轻链。ε重链由 5 个区组成：一个可变区(VH)和四个恒定区(Cε1 至 Cε4)。IgE 的分子量约为 190,000 Da, 重链的长度约为 550 个氨基酸。在 Padlan 和 Davis (Mol. Immunol., 23, 1063-75, 1986)以及 Helm 等(于 2/10/90 以 PDB 存

5 储的 2IgE 模型结构(2IgE model structure deposited 2/10/90 with PDB)
(Protein Data Bank, Research Collaboratory for Structural Bioinformatics;
<http://pdb-browsers.ebi.ac.uk>)中讨论了 IgE 的结构。第二个区 Cε2 大约
包含 IgE 的氨基酸 226-328 (Flanagan J.G.和 Rabbitts, T.H., 1982,
EMBO J., 1, 655-660; Kenten 等, 1982, Proc.Natl.Acad.Sci., USA, 79,
6661-6665), 但可以包含额外的氨基酸。通过与 IgG1 的已知结构进行
比较, 推定 Cε3 区的起始点是 Ser337。

10 过去已经研究了许多设计用来干扰 IgE 介导的组胺释放机制的被动
或主动免疫治疗途径, 并且获得了不同程度的成功。这些途径包括
或者用被动给予的抗体、或者通过被动给予竞争性结合 FcεRI 或
FcεRII (低亲和性 IgE 受体)受体的 IgE 衍生肽, 干扰 IgE 或变应原/IgE
复合体与所述受体的结合。另外, 某些作者已经描述了在主动免疫中
应用衍生自 IgE 的特定肽, 以刺激抑制组胺释放的免疫应答。

15 已经报道: 参与 IgE 与其受体结合的 IgE 区是 Cε3 和 Cε4 (Sutton,
B.J.和 Gould, H.J.; Nature, 1993, 366: 421-428; WO 97/31948), 因此先
前的治疗策略一直集中于这两个区的部分上。

20 该领域中先前的研究人员在其研究过程中, 遇到了在设计新的抗
变态反应疗法中必须考虑的许多事项和问题。最危险的问题之一围绕
着在组胺释放信号中涉及 IgE 交联。最常见的情况是: 在主动免疫接
种期间产生的抗 IgE 抗体自身通过在缺乏变应原的情况下相邻 IgE-受
体复合体的交联, 能够触发组胺释放。这种现象称为过敏原性。实际
上, 通常用于 IgE 检测分析的许多市售抗 IgE 单克隆抗体是过敏原性
的, 如果将其给予患者, 则因此是无用且具有潜在的危險。

25 一种抗体是否具有过敏原性, 取决于所述 IgE 分子上的靶表位的
位置。然而, 根据该领域的知识现状, 虽然有巨大的科学意义并且作
了许多努力, 但对任一抗体或表位可能具有何种特性以及它是否可能
对患者具有正或负的临床效应的可预测性却很低或者没有可预测
性。

因此，为了安全和有效，被动给予的抗体或疫苗所诱导的抗体必须结合在 IgE 能够干扰组胺触发途径的区域中，并且所述抗体自身不具有过敏原性。本发明达到了所有这些目标，提供作为能够产生抑制组胺释放的非过敏原性抗体的药物。这些药物可以构成主动疫苗的基础，或用来产生用于被动免疫治疗的合适抗体，或对于某一治疗效应本身可以被动给予。

本领域技术人员已经进行了许多研究，以鉴定确实具有抗 IgE 介导的变态反应的有益效应的特异性抗 IgE 抗体(WO 90/15878, WO 89/04834, WO 93/05810)。已经尝试鉴定出由这些有用抗体识别的表位，以构建这类表位的肽模拟表位，并且用所述肽模拟表位作为产生抗 IgE 抗体的免疫原。

WO 97/31948 描述了这类研究的实施例，并且还描述了与载体分子缀合的来自 C ϵ 3 和 C ϵ 4 区的 IgE 肽，以用于主动疫苗接种目的。这些免疫原可以用于疫苗接种研究，并且据认为能够产生随后在体内抑制组胺释放的抗体。在这项研究中，描述了据认为可用于主动疫苗接种目的、能够与包含在 C ϵ 3 区中的 IgE 肽结合的单克隆抗体(BSW17)。

EP 0 477 231 B1 描述了用于主动免疫接种性免疫预防、与匙孔蛾血蓝蛋白(KLH)缀合的衍生自 IgE C ϵ 4 区(残基 497-506, 也称为 Stanworth 十肽)的免疫原。WO 96/14333 是 EP 0 477 231 B1 中所述研究的继续。

其它途径基于鉴定自身与 IgE 竞争结合嗜碱性粒细胞或肥大细胞上高亲和性或低亲和性受体的肽(WO 93/04173, WO 98/24808, EP 0 303 625 B1, EP 0 341 290)。

本发明鉴定出 IgE C ϵ 2 区的新的表面暴露表位，它们可以用作变应性疾病状态的主动或被动免疫预防或治疗的靶。本发明提供加入所述分离的表位本身的肽，还提供这些新鉴定的表位的模拟表位，所述模拟表位本身可以用于治疗变态反应，或可以用于主动免疫接种性免

疫预防或治疗的免疫原中。本发明的分离的表位或模拟表位最好用于主动免疫接种方案的免疫原中，以诱导自身抗 IgE 抗体，它们本身限制、缓解或消除接种疫苗的受治疗者的变态反应或症状。另一方面，本发明的模拟表位或免疫原可以被动给予患者，以限制、缓解或消除接种疫苗的受治疗者的变态反应或症状。

加入本发明的分离表位的肽当被稳定地呈递(例如在一种载体上)时具有免疫原性，而且在体内能够诱导非过敏原性的自身抗 IgE 抗体，并且有效缓解过敏反应。本发明的表位或模拟表位最好仅衍生自 Cε2 区，因为它们不衍生自任何其它区，亦即在 Cε1、Cε3 或 Cε4 区中未发现它们。特别是，作为一个优选实施方案，它们衍生自自由人 IgE 的 Ser222-Ala329 编码的区。

已经发现特别适用于本发明的模拟表位或免疫原的 Cε2 区的特定表位，是本发明人已经发现的表面暴露的那些表位。可以根据其建模结构确定 IgE 区域的表面暴露。(Padlan 和 Davies, *Mol. Immunol.*, 23, 1063-75, 1986; Helm 等, 于 2/10/90 以 PDB 存储的 2IgE 模型结构 (Protein Data Bank, Research Collaboratory for Structural Bioinformatics)). 本发明人已经发现: 也发现可用于本发明的表位是高度表面暴露的。根据这一观察, 本发明人已经设计出一种提供其它合适表位的方法, 所述表位是在 5 残基滑动窗口范围计算的具有可及区的表位。本发明人已经发现: Cε2 区中的优选区具有一个在 5 残基滑动窗口范围用分子模拟软件(MSI)计算的大于 50 Å²、优选大于 80Å² 的可及表面。

这类表面暴露的 Cε2 IgE 表位的实例是:

肽名称	序列	定位序列和 IgE 区	SEQ ID NO.
P1	EDGQVMDVD	Cε2 (Glu270-Asp278)	1
P2	STTQEGEL	Cε2 (Ser283-Leu290)	2
P3	SQKHWLSDRT	Cε2 (Ser300-Thr309)	3
P4	GHTFEDSTKK	Cε2 (Gly318-Lys327)	4
P5	GGGHFPPT	Cε2 (Gly245-Thr250)	5

P6	PGTINI	Cε2 (Pro262-Ile267)	6
P7	FTPPT	Cε2 (Phe231-Thr235)	7

加入这类表位的肽构成本发明的一个优选方面。具有与这些表位相同特性的模拟表位以及包含这类模拟表位、产生与 IgE 分子环境内的 IgE Cε2 表位交叉反应的免疫应答的免疫原，也构成了本发明的部分。

因此，本发明包括包含天然的 IgE 表位本身及其任何模拟表位的分离的肽。模拟表位的含义定义为与天然 IgE 表位足够相似以能够被识别所述天然 IgE 表位的抗体识别的实体；(Gheysen, H.M.,等, 1986, 作为抗原的合成肽(Synthetic peptides as antigens). Wiley, Chichester, 10 Ciba foundation symposium 119, 第 130-149 页; Gheysen, H.M., 1986, Molecular Immunology, 23,7, 709-715); 或与天然 IgE 表位足够相似以便当与合适的载体偶联时能够产生与所述天然 IgE 表位交叉反应的抗体的实体。

本发明的模拟表位可以是肽，或是非肽类。以上鉴定的表面暴露的 IgE 表位的肽模拟表位可以具有一段不同于所述天然表位的序列，但也可以具有与所述天然表位完全相同的序列。这样一种分子称为所述表位的模拟表位，因为虽然这两种分子共享相同的序列，但模拟表位将不在完整的 Cε2 区结构环境内呈递，并且因此所述模拟表位可能采取与所述天然 IgE 表位略有不同的构象。对于本领域技术人员显而易见的是，以上鉴定的线性序列(P1 至 P7)当在 IgE 三级结构中时，与 IgE 一级结构中可能相隔的其它区相邻。因此，例如一种 P1 的模拟表位可以是连续或是不连续的，因为它包含或模拟多个 P1 区段和由这些相隔氨基酸残基构成的区段。

可以用于本发明的优选的表面暴露区含有与环结构有关的区。因此，本发明的肽或模拟表位可以包含一个具有 N 端或 C 端延伸的环，所述延伸可以是来自相邻β-折叠的天然氨基酸残基。作为实例，P1 含

有 IgE C ϵ 2 区的 C-D 环, P2 含有所述区的 D-E 环, P3 含有所述区的 E-F 环, P4 含有所述区的 F-G 环, P5 含有所述区的 A-B 环, 而 P6 含有所述区的 B-C 环。因此, 这些环的模拟表位构成本发明的一个方面。

5 特别优选的药物基于表位 P1 及其模拟表位。加入这种表位及其模拟表位的肽当与载体偶联时, 有效诱导能够抑制人嗜碱性粒细胞释放组胺的抗 IgE 免疫应答。而且, 这些免疫应答是非过敏原性的。P1 的模拟表位最初被描述为当配制为免疫原时能够诱导免疫应答的实体, 并且所述应答能够在 IgE C ϵ 2 区的环境中识别 P1。

10 P1 对应于 C ϵ 2 区的 C-D 环。免疫球蛋白折叠的 C-D 环结构对应于 C β 链末端和 D β 链起始之间的连接链(Introduction to protein Structure, 第 304 页, 第 2 版, Branden 和 Tooze, Garland Publishing, New York, ISBN 0 8153 2305-0), 大约对应于 IgE 分子的氨基酸残基号 Trp268-Ser280。因此, IgE C ϵ 2 C-D 环的模拟表位以及能够与 IgE C ϵ 2
15 C-D 环结合的配体构成了本发明的一个优选方面。

可以通过添加、缺失或取代选定的氨基酸, 设计用于特定目的的以上所鉴定 IgE 表位的肽模拟表位。因此, 为了易于与蛋白载体缀合, 可以对本发明的肽加以修饰。例如, 对于某些化学缀合方法, 可能希望在所述 IgE 表位中包括一个末端半胱氨酸。另外, 可能希望与蛋白
20 载体缀合的肽包括一个远离所述肽缀合末端的疏水末端, 使得所述肽的游离的未缀合末端保持与载体蛋白表面结合。这降低了所述肽的构象的自由度, 并因此增加了所述肽以最类似于完整 IgE 分子环境中发现的 IgE 肽的构象呈递的可能性。例如, 可以改变所述肽, 以使其具有一个 N 末端半胱氨酸和一个 C 末端疏水酰胺化尾。另一方面, 可以
25 添加或取代 D-立体异构体形式的一个或多个氨基酸, 以产生有益的衍生物, 例如以增强所述肽的稳定性。本领域技术人员会认识到, 这类修饰的肽或模拟表位可以是完全非肽或部分非肽的模拟表位, 其中组成残基不必限于 20 种天然存在的氨基酸。另外, 这些肽或模拟表位

可以用本领域已知的技术进行环化，以将所述肽限于一种非常类似所述肽序列在完整 IgE 分子环境中的形状的构象。

含有一对半胱氨酸残基以允许形成二硫桥的优选环化肽的实例是 PT1079 (SEQ ID NO. 14)、PT1079GS (SEQ ID NO.15)、PT1078 (SEQ ID NO.16)和 P15q (SEQ ID NO. 11)。

此外，本领域技术人员会认识到，本发明的模拟表位或免疫原可以比所述分离的肽长，并且可以包含本文公开的序列。因此，本发明的模拟表位可以包括在一端或两端加入许多其它天然残基的 N 端和/或 C 端延伸。所述肽模拟表位也可以是天然 IgE 序列的 retro 序列，因为所述序列方向是反向的；或者所述序列可以全部或至少部分由 D-立体异构体氨基酸组成(inverso 序列)。此外，所述肽序列可以是相称的 retro-inverso，因为序列方向是反向的并且所述氨基酸是 D-立体异构体形式。这类 retro 或 retro-inverso 肽的优点是非自身的，因此可以解决免疫系统中自身耐受的问题(例如 P15r - 参见下文)。

或者，可以采用例如噬菌体展示技术(EP 0 552 267 B1)的技术，用本身能够与本发明 IgE 表位结合的抗体鉴定肽模拟表位。该技术产生大量的模拟天然肽结构、并因此能够与抗天然肽抗体结合的肽序列，但可能其自身不必与所述天然 IgE 肽共享显著的序列同源性。这种途径可能由于允许鉴定出免疫原性特性增强(例如与所述 IgE 受体或抗 IgE 抗体的较高亲和性结合特性，或能够诱导以较高亲和性与 IgE 结合的多克隆免疫应答)的肽而具有明显的优势，或者可以解决可能与天然肽序列应用有关的任何潜在的自身抗原耐受的问题。另外，该技术使得能够根据所识别的模拟表位序列中其共享的化学特性，鉴定出每种天然肽的识别模式。

修饰的肽模拟表位的优选实例和噬菌体衍生的模拟表位的实例包括：

肽	序列	描述	SEQ ID NO.
P15	CLEDGQVMDVDLL-NH ₂	P1 模拟表位	8
P15r	LLDVDMVQGDELC-NH ₂	P1 retro 模拟表位	9
P15p	WLEDGQVMDVDLC	P1 模拟表位	10
P15q	CLEDGQVMDVDLC	P1 模拟表位	11
C67/8	CFINKQMADLELCPRE	P1 模拟表位	12
C67	CFMNKQLADLELCPRE	P1 模拟表位	13
PT1079	CLEDGQVMDVDLCPREAAEGDK	P1 模拟表位	14
PT1079GS	CLEDGQVMDVDLCGGSSGGP	P1 模拟表位	15
PT1078	CLEDGQVMDVDCPREAAEGDK	P1 模拟表位	16
P15s	QVMDVDL	P1 模拟表位	17
EEC39-I	KCREVWLGESETIMDCE	P1 模拟表位	18
EEC39-J	ACREVWLGESETIMDCD	P1 模拟表位	19
EEC39-10	SCREVWLGESETVMDCG	P1 模拟表位	20
EEC40-9	NCQDLMLREDAGCWSKM	P1 模拟表位	21
EEC47-3	DCEEPMCSPVLLQQLKL	P1 模拟表位	22
P15t	LEDGQVMDVD	P1 模拟表位	23
P16	CSTTQEGELA-NH ₂	P2 模拟表位	24
P2sh	TTQEGE	P2 模拟表位	25
P17	CSQKHWLSDRT-NH ₂	P3 模拟表位	26
P4ex	TYQGHTFEDSTKKCADSNPRGV	P4 模拟表位	27
P5sh	GGHFPP	P5 模拟表位	28
P5long1	CSSCDGGGHFPPTIQC	P5 模拟表位	192
P5long2	CLQSSCDGGGHFPPTIQLLC	P5 模拟表位	193

在其它模拟表位中，P1、P2、P3、P4、P5、P6 或 P7 的氨基酸残基每个可以被最类似该氨基酸的氨基酸独立地取代。例如，A 可以被 V、L 或 I 取代，如下表所述。

原始残基	典型的取代	优选的取代
A	V, L, I	V
R	K, Q, N	K
N	Q, H, K, R	Q
D	E	E
C	S	S
Q	N	N
E	D	D
G	P, A	A
H	N, Q, K, R	R
I	L, V, M, A, F	L
L	I, V, M, A, F	I
K	R, Q, N	R
M	L, F, I	L
F	L, V, I, A, Y	L
P	A	A
S	T	T
T	S	S
W	Y, F	Y
Y	W, F, T, S	F
V	I, L, M, F, A	L

- 5 能够与表面暴露的 Cε2 IgE 表位结合的配体以及包含所述配体的药用组合物构成了本发明的部分。这类配体能够用于被动预防或治疗，通过将这类配体给予患者，缓解变应性疾病。这类有用配体的实例包括单克隆抗体或多克隆抗体。例如，可以对在 1 只动物中诱导的抗体加以纯化，并且被动给予另一只动物，以预防或治疗变态反应。
- 10 采用本领域已知的技术，也可以应用本发明的肽来产生单克隆抗体杂交瘤(采用已知的技术，例如 Köhler 和 Milstein, Nature, 1975, 256, 第 495 页)、人源化单克隆抗体或 CDR 移植单克隆抗体。因此，本发明

的一个相关方面是能够与 IgE Cε2 区的表面暴露表位结合的配体。这类配体的实例是抗体(或 Fab 片段)。这类抗体可以用于被动免疫预防或免疫治疗, 或其本身可以用于鉴定 IgE 肽模拟表位。

5 本文的术语“抗体”用来指具有有用抗原结合特异性的分子。本领域技术人员容易理解: 该术语也可以包括作为抗体片段或衍生物, 但可以显示出相同或非常类似的功能性的多肽。本文使用的术语抗体将包括这类抗体片段或衍生物。

10 优选的配体是单克隆抗体。特别优选的配体是 P1 的配体, 最好是单克隆抗体。例如, PTmAb0011 是根据用于专利的微生物保存布达佩斯条约于 1999 年 3 月 8 日保藏于 ECACC (欧洲动物细胞保藏中心, Vaccine Research and Production Laboratory, Public Health Laboratory Service, Centre for Applied Microbiology Research, Porton Down, Salisbury, Wiltshire, SP4 OJG, 英国)的小鼠 IgG1 型单克隆抗体的参考名称, 其保藏号为 99030805。

15 例如, PTmAb0011 识别 Cε2 的 C-D 环, 其本身与人嗜碱性粒细胞上高亲和受体结合时能够识别 IgE, 而不引起脱颗粒, 此外它能够通过阻止 IgE 与 FcεR1α 结合并且抑制变应性嗜碱性粒细胞中 LolP1 触发的组胺释放, 阻断非变应性嗜碱性粒细胞的被动敏化。识别 Cε2 的 C-D 环的另一单克隆抗体是 is PTmAb0005 (可得自 Sigma
20 Chemicals Catalogue number I6510, 克隆号 GE-1)。本发明提供药用组合物中的这种单克隆抗体。

P1 的配体已经用于噬菌体淘选技术, 以鉴定新的 P1 模拟表位。例如, 能够识别 P1 的一种单克隆抗体结合表达以下序列的噬菌体:

SEQ ID	序列															
29	C	F	I	N	K	Q	M	A	D	L	E	L	C			
30	C	F	M	N	K	Q	L	A	D	L	E	L	C			
31	K	C	R	E	V	W	L	G	E	S	E	T	I	M	D	C

25 通过用 PTmAb0011 和 PTmAb0005 进行噬菌体淘选, 已经鉴定出 Cε2 IgE 的 C-D 环的其它肽模拟表位。这类模拟表位的实例包括:

<i>肽 P1 模拟表位 (PTmAb0011 噬菌体淘选)</i>	<i>SEQ NO.</i>
HCQQVFFPQDYLWCQRG	SEQ ID No. 32
SCREVWLGGSEMIMDCE	SEQ ID No. 33
ECNQNLGSLRHVDLNC	SEQ ID No. 34
DCEEPMCSPVLLQKLKP	SEQ ID No. 35
SCREVWLGGSEMIMDCE	SEQ ID No. 36
RCDQQLPRDSYTFMMS	SEQ ID No. 37
SCPAFPREGDLCAPPTV	SEQ ID No. 38
FCPEPICSPPLSRMTLS	SEQ ID No. 39
VCDECVSRELAL	SEQ ID No. 40
WCLEPECAPGLL	SEQ ID No. 41
VCDECVSRELAL	SEQ ID No. 42
DCLSKGQMADLC	SEQ ID No. 43
SCQGREVRRECW	SEQ ID No. 44
WCREVWLGESETIMDCE	SEQ ID No. 45
ACREVWLGESETIMDCD -	SEQ ID No. 46
GCAEPKCWQALHQKLKP -	SEQ ID No. 47
<i>肽 P1 模拟表位 (PTmAb0005 噬菌体淘选)</i>	<i>SEQ NO.</i>
ECRGPNMQMVDHCPTTD	SEQ ID No. 48
QCNAVLEGLQMVDHCWN	SEQ ID No. 49
CCVADPETQMTSPSEMF	SEQ ID No. 50
HCKNEFKKGQWTYSCSD	SEQ ID No. 51
QCRQFVMNQSEKEFGQC	SEQ ID No. 52
NCFMNKQLADLELCPRE	SEQ ID No. 53
SCAYTAQRQCSQDVPNPG	SEQ ID No. 54
GCFMNKQMADLELCPRTAA	SEQ ID No. 55
ACFMNKQMADLELCPRVAA	SEQ ID No. 56
GCFINKQLADLELCPRVAA	SEQ ID No. 57
GCFMNKQLADWELCPRAAA	SEQ ID No. 58
ECFMNKQLADSELCPRVAA	SEQ ID No. 59
GCFMNKQLADPELCPREAE	SEQ ID No. 60
GCFMNKQLVDLELCPRGAA	SEQ ID No. 61
GCFMNKQLADLELCPREAA	SEQ ID No. 62
GCFMNKQQADLELCPRGAA	SEQ ID No. 63
GCFINKQMADLELCPREAA	SEQ ID No. 64

因此, 能够与 PTmAb0005 或 PTmAb0011 结合的 IgE Cε2 的模拟表位以及包含这些模拟表位的免疫原构成了本发明的一个重要方面。包含能够与 PTmAb0005 或 PTmAb0011 结合的模拟表位的疫苗可用于治疗变态反应。

虽然不限制 P1 模拟表位的更广义的定义, 但根据这些和其它噬菌体序列, 已经鉴定出一个亚组 P1 样肽的核心模式。该模式是一个亚组的 P1 模拟表位, 并且在该特定抗 P1 单克隆抗体的识别所需的每个位置中氨基酸的化学特性方面描述了其模拟表位:

10 *y h x d h h a n a n x y*

其中:

y.....*y* 可以被环化。

h 疏水性(cys; pro; gly; ala; val; ile; leu; trp; met; phe)。

d 给予离子键的(arg; lys; his; gln; asn; trp; tyr; thr; ser)。

15 *a* 酸性(asp; glu)。

n 离子中性/非极性(除 asp、 glu、 lys、 arg 外的所有氨基酸)。

x 任何氨基酸(*n*=0 - 3)。

因此, 在一个实施方案中, P1 的模拟表位可以用上述通用核心特征 *y h x d h h a n a n x y* 来加以描述。P1 肽或其模拟表位可以任选地在任一端邻接其它氨基酸, 以有助于缀合或用于任何其它目的。

P1 的一种特别优选的模拟表位是 P15s (SEQ ID NO. 17), 已经表明其 Q、 M 和第一个 D 残基对于 PTmAb0011 和 PTmAb0005 结合活性是关键性的(参见实施例)。因此, 一种其中非必需残基被相似氨基酸(如上概述)取代的 P15s 模拟表位的结构式将是:

25 Q, X₁, M, D, X₁, X₂, X₃

其中 X₁ 选自 V、 I、 L、 M、 F 或 A; X₂ 选自 D 或 E; 而 X₃ 选自 L、 I、 V、 M、 A 或 F。

应用 PTmAb0005 和 PTmAb0011 鉴定 IgE 的新模拟表位以随后用于变态反应治疗，也构成了本发明的一个重要方面。由于 PTmAb0005 是市售的，因此这种配体不构成本发明的组合物，然而，包含 PTmAb0005 的药用组合物及其在鉴定 P1 模拟表位中的应用则构成了本发明的两个重要方面。

P2、P3、P4 和 P5 的模拟表位也构成本发明的一个重要方面。例如，P16 和 P17 分别是 P2 和 P3 的模拟表位。这些肽当在载体上适当地呈递时，均能够诱导非过敏原性的强抗 IgE 抗体应答。

在一个优选实施方案中，加入以上鉴定的本发明的表位或者肽或非肽模拟表位的肽的大小将很小，使得它们模拟选自完整 C ϵ 2 区的一个区域。设想了肽模拟表位因此应该在长度上小于 100 个氨基酸，优选不足 75 个氨基酸，更优选不足 50 个氨基酸，最优选长度在 4-25 个氨基酸的范围内。优选的肽模拟表位的具体实例是 PT1079 和 P15q，它们分别长 21 个氨基酸和 13 个氨基酸。根据分子体积，设计了大小很小的其肽对应物的非肽模拟表位。

对于本领域技术人员显而易见的是：可以采用多种技术证实特定构建体作为模拟表位的资格(status)。这类技术包括以下技术：可以分析推定的模拟表位，以确定所述构建体的免疫原性，因为由所述推定的模拟表位产生的抗血清与所述天然 IgE 分子交叉反应，并且也有效地阻断变应性效应细胞释放变应性介质。这些应答的特异性可以通过用所述模拟表位本身或所述天然 IgE 和/或已知结合 IgE C ϵ 2 的表面暴露表位的特异性单克隆抗体阻断抗血清活性的竞争实验来加以证实。用于所述竞争测定的这类单克隆抗体的具体实例包括例如 PTmAb0005 和 PTmAb0011，这将证实所述推定的模拟表位作为 IgE C ϵ 2 区 C-D 环模拟表位的资格。

在本发明的一个实施方案中，将至少一种加入一个 IgE 表位或模拟表位的上述肽与载体分子连接，以形成用于疫苗接种方案的免疫原。最好是，所述载体分子与所述天然 IgE 分子无关。所述肽或模拟

表位通过化学共价缀合或通过遗传工程融合配偶体的表达、任选地通过一个接头序列而连接。

可以以本领域众所周知的方式进行所述肽与免疫原性载体的共价偶联。因此，例如利用碳二亚胺、戊二醛或(N-[γ -马来酰亚胺基丁酰氧基])琥珀酰亚胺酯，利用普通市售的异双功能接头例如 CDAP 和 SPDP (采用生产商的说明)进行直接共价偶联是可能的。在偶联反应之后，可以借助透析法、凝胶过滤法、分级分离法等容易地分离并纯化所述免疫原。

本领域技术人员容易了解用于本发明免疫原中的载体的类型。载体的功能是提供细胞因子辅助，以有助于诱导针对所述 IgE 肽的免疫应答。可以用于本发明的非详尽载体表包括：匙孔蛾血蓝蛋白(KLH)、血清白蛋白例如牛血清白蛋白(BSA)、灭活细菌毒素例如破伤风毒素或 diphtheria 毒素(TT 和 DT)、或其重组片段(例如 TT 片段 C 的结构域 1、或 DT 的易位结构域(translocation domain)、或结核菌素的纯化蛋白衍生物(PPD)。另一方面，可以将所述模拟表位或表位直接与脂质体载体缀合，这还可以包括能够提供 T 细胞辅助的免疫原。肽与载体之比最好约为 1:1 至 20:1，最好每个载体应该携带 3-15 个肽。

在本发明的一个实施方案中，一种优选的载体是流感嗜血菌(*Haemophilus influenzae*)的 D 蛋白(EP 0 594 610 B1)。D 蛋白是一种流感嗜血菌的 IgD 结合蛋白，并且已由 Forsgren 取得专利权(WO 91/18926, 已授权的 EP 0 594 610 B1)。在某些情况下，例如在重组免疫原表达系统中，可能希望使用 D 蛋白的片段，例如 D 蛋白的 1/3 (包含 D 蛋白 N 末端 100-110 个氨基酸(GB 9717953.5))。

呈递本发明 IgE 肽的另一种优选方法是在重组融合分子的环境中。例如，EP 0 421 635 B 描述了应用嵌合嗜肝 DNA 病毒核心抗原粒子，以在病毒样粒子中呈递外源肽序列。因此，本发明的免疫原可以包含在由乙型肝炎核心抗原组成的嵌合粒子中呈递的 IgE 肽。另外，所述重组融合蛋白可以包含本发明的模拟表位和一种载体蛋白，例如

流感病毒的 NS1。对于构成本发明部分的任何重组表达的蛋白而言，编码所述免疫原的核酸也构成本发明的一个方面。

用于本发明的肽可以通过本领域众所周知的固相法合成。通过采用“T-boc”或“F-moc”法可以进行合适的合成。运用众所周知的“F-moc”法和在全自动装置中用聚酰胺树脂，可以通过固相法合成环肽。另一方面，本领域技术人员会了解必需的实验室步骤以人工进行所述方法。固相合成的技术和步骤描述于'Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach', E. Atherton 和 R.C. Sheppard, 由 IRL at Oxford University Press 出版(1989)。或者，可以采用重组法产生所述肽，所述重组法包括：在细菌或哺乳动物细胞系中表达编码所述模拟表位的核酸分子，然后纯化所表达的模拟表位。用于重组表达肽和蛋白的技术是本领域已知的，并且描述于 Maniatis, T., Fritsch, E.F.和 Sambrook 等, *Molecular cloning, a laboratory manual*, 第 2 版; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989)。

本发明的免疫原可以包含先前描述的肽，包括模拟表位；或可以是免疫交叉反应衍生物或其片段。编码本发明免疫原或肽、模拟表位或其衍生物的核酸的部分也构成了本发明的部分。另外，本发明的免疫原可以在同一免疫原中包含一种以上类型的表位，即 P1 和 P2，或所述模拟表位本身可以包含一种以上类型的表位。

因此，本发明提供了新肽(包括本发明的表位或模拟表位)(如上所限定的)在预防或治疗变态反应的药用组合物生产方面的应用。包含本发明模拟表位或肽以及载体分子的免疫原也可供用于用来免疫预防或治疗变态反应的疫苗。因此，本发明的模拟表位、肽或免疫原可供用于医学以及变应性疾病的医药治疗或预防。因此，提供了治疗变态反应的方法，包括将本发明的疫苗或药物给予患有或易患变态反应的患者。

本发明的疫苗最好也包括一种佐剂。用于本发明疫苗的合适佐剂包括能够增强针对所述 IgE 肽免疫原的抗体应答的那些佐剂。佐剂是

本领域众所周知的 (Vaccine Design - The Subunit and Adjuvant Approach, 1995, Pharmaceutical Biotechnology, 第 6 卷, Powell, M.F. 和 Newman, M.J. 编著, Plenum Press, New York 和 London, ISBN 0-306-44867-X). 与本发明免疫原一起使用的优选佐剂包括铝盐或钙盐(例如 5 氢氧化物或磷酸盐). 其它佐剂包括皂苷佐剂, 例如 QS21 (US 5,057,540) 和 3D-MPL (GB 2220 211).

一般将给予初次剂量和加强剂量的本发明疫苗. 预期加强剂量将予以适当地间隔, 或最好每年给予一次, 或以循环抗体下降至所需水平之下时给予. 加强剂量可以包括在缺乏原始载体分子情况下的所述 10 肽. 这种加强构建体可以包含一种替代载体, 或可以没有任何载体.

在本发明的再一方面, 提供本文描述的用于医药的疫苗.

通过系统途径或粘膜途径给予本发明的疫苗制剂, 可以用所述疫苗制剂来保护或治疗易患或患有变态反应的哺乳动物. 这些给药可以包括经肌肉、腹膜内、皮内或皮下途径注射; 或经粘膜给予口/消化道、 15 呼吸道、泌尿生殖道. 一种优选的给药途径是经皮途径, 例如通过皮肤贴剂.

每个疫苗剂量中的蛋白量选定为典型疫苗中诱导免疫保护反应且无明显副作用的量. 这种量将根据使用何种具体免疫原以及如何呈递免疫原而变化. 一般而言, 预期每个剂量将包含 1-1000 μg 蛋白, 20 优选 1-500 μg , 优选 1-100 μg , 其中最优选的范围是 1-50 μg . 特定疫苗的最适量可以通过包括观察受治疗者的合适免疫应答的标准研究来确定. 在初次接种后, 受治疗者可以接受适当间隔的一次或数次加强接种.

包含上述配体的药用组合物也构成本发明的一个方面. 也提供所述配体在医学以及变态反应治疗药物生产方面的应用. 25

本发明的多个方面也可以用于诊断分析. 例如, 可以用多组识别不同本发明肽的配体, 来分析取自患者的血清中存在的抗 IgE 的效价. 此外, 所述肽本身可以用来将循环抗 IgE 分型. 在某些情况下,

分析例如特异性患者中循环抗 IgE 水平是合适的，因此本发明的肽和多克隆/单克隆抗体可以用于诊断特异性。另外，所述肽可以用来从患者血液中亲和除去循环抗 IgE，然后将所述血液回输给所述患者。

也构成本发明部分的是：采用 IgE 结构的计算机模型，鉴定用于免疫预防或治疗变态反应的免疫原以及鉴定 IgE 的表面暴露的那些肽的方法。然后将这些区域配制到免疫原中并用于医学。因此，应用 PTmAb0005 和 PTmAb0011 鉴定用于变态反应免疫预防或治疗的肽也构成本发明的部分。

在 New Trends and Developments in Vaccines, Voller 等编著，University Park Press, Baltimore, Maryland, U.S.A. 1978 中全面描述了疫苗制剂。Likhite 的美国专利 4,372,945 和 Armor 等的美国专利 4,474,757 公开了蛋白与大分子的缀合。

IgE 氨基酸残基的编号系统通常是 Dorrington KJ 和 Bennich H (1978) Immunol Rev 41 3-25 以及 Bennich H 和 Bahr-Lindstrom, H von (1978) Prog Immunol 11 49-58 描述的编号系统。然而，随后的人 IgE 基因和 cDNA 序列的测定(Max, E.E.等 1982, Cell 29 691-699; Flanagan J.G.和 Rabbitts, T.H., 1982, 参见上文; Kenten, J.H.等, 1982, 参见上文)，揭示了 Cε2 中位置 273 (Kabat 编号)的一个额外的亮氨酸，该亮氨酸是先前的论文中未曾报道的。因此，本发明人所采用的编号方案可能不同于 Dorrington KJ 和 Bennich 采用的编号方案。

附图描述

图 1, 采用 Padlan 和 Davies 1986 模型的 IgE 氨基酸表面暴露。

图 2, 化学方案 1, 固相肽合成。

图 3, 化学方案 2 和方案 3, 修饰的载体制备。

图 4, 化学方案 4, 肽/载体缀合。

图 5, C67-8 抗 IgE 数据。(A) 用 25μg BSA-IgE C67-8 (用 PTL 化学缀合的)或 3μg HepB 核心-IgE C67-8 构建体免疫的 Balb C 小鼠血

清抗平板结合 IgE 的反应性。(B) 用 25 μ g BSA-IgE C67-8 (用 PTL 化学缀合的)或 3 μ g HepB 核心-IgE C67-8 构建体免疫的 Balb C 小鼠血清抗受体结合 IgE 的反应性。

5 图 6, 用可溶性 IgE 和 IgE C67-8 肽进行的竞争测定。将来自 BSA-IgE C67-8 或 HBC-IgEC67-8 免疫的小鼠的血清与可溶性 IgE (10 μ g/ml)或 IgE C67-8 肽(25 μ M)或不相关肽 PT326 (25 μ M)预温育, 然后加入到 IgE 包被的 ELISA 板中。数据为平均值 \pm S.E.M (n = 10)。

10 图 7, PT1079 抗 IgE 数据。(A)用 25 μ g BSA-PT1079 (用 PTL 化学缀合的)或 3 μ g HepB 核心-1079 构建体免疫的 Balb C 小鼠血清抗平板结合 IgE 的反应性。(B)用 25 μ g BSA-1079 (用 PTL 化学缀合的)或 3 μ g HepB 核心-1079 构建体免疫的 Balb C 小鼠血清抗受体结合 IgE 的反应性。

15 图 8, 用可溶性 IgE 和 PT1079 肽进行的竞争测定。将来自 BSA-1079 或 HBC-1079 免疫小鼠的血清与可溶性 IgE (10 μ g/ml)或 PT1079 肽(25 μ M)或不相关肽 PT326 (25 μ M)预温育, 然后加入到 IgE 包被的 ELISA 板中。数据为平均值 \pm S.E.M (n = 10)。

20 图 9, PT1078 抗 IgE 数据。(A)用 25 μ g BSA-PT1078 (用 PTL 化学缀合的)免疫的 Balb C 小鼠血清抗平板结合 IgE 的反应性。(B)用 25 μ g BSA-1078 (用 PTL 化学缀合的)免疫的 Balb C 小鼠血清抗受体结合 IgE 的反应性。

图 10, 用可溶性 IgE 和 PT1078 肽进行的竞争测定。将 BSA-1078 免疫小鼠的血清与可溶性 IgE (10 μ g/ml)或 PT1078 肽(25 μ M)或不相关肽 PT326 (25 μ M)预温育, 然后加入到 IgE 包被的 ELISA 板中。数据为平均值 \pm S.E.M (n = 10)。

25 图 11, PT1079gs 抗 IgE 数据。(A)用 3 μ g HBC-1079gs 免疫的 Balb C 小鼠血清抗平板结合 IgE 的反应性, (B)用 3 μ g HBC-1079gs 免疫的 Balb C 小鼠血清抗受体结合 IgE 的反应性。

图 12, 用可溶性 IgE 和 PT1079 肽进行的竞争测定。将 HBC-

1079gs 免疫小鼠的血清与可溶性 IgE (10 μ g/ml)或 PT1079 肽(25 μ M)或不相关肽 PT326 (25 μ M)预温育, 然后加入到 IgE 包被的 ELISA 板中。数据为平均值 \pm S.E.M (n = 10)。

5 图 13, BSA-C67-8 诱导的小鼠抗血清的抑制活性。来自 LolP1 敏感性供体的细胞用小鼠血清(以 1/50 稀释)处理, 然后用 LolP1 触发以释放组胺。数据为平均值 \pm S.E.M. (n = 10)。

10 图 14, 用 BSA-1078 和 BSA 1079 诱导的小鼠抗血清的抑制活性。来自 LolP1 敏感性供体的细胞用小鼠血清(BSA 和 BSA-1078 抗血清以 1/50 稀释; BSA-1079 抗血清以 1/1250 稀释)处理, 然后用 LolP1 触发以释放组胺。数据为平均值 \pm S.E.M. (n = 10)。

15 图 15, 用 HBC-C67-8、HBC-1078、HBC-1079 和 HBC-1079gs 诱导的小鼠抗血清的抑制活性。来自 LolP1 敏感性供体的细胞用小鼠血清(HBC 野生型(wt)和 HBC-IgEC67-8 抗血清以 1/50 稀释; HBC-1079 和 HBC-1079gs 抗血清以 1/1250 稀释)处理, 然后用 LolP1 触发以释放组胺。数据为平均值 \pm S.E.M. (n = 10)。

图 16 显示依赖于浓度的抗体 PTmAb0005 和 PTmAb0011 与 IgE 的结合。

图 17, 显示与对照相比的抗体 PTmAb0005 和 PTmAb0011 对 IgE 与 Fc ϵ R1 α /IgG 构建体结合的浓度依赖性抑制。

20 图 18, 显示与对照比较的、抗体 PTmAb0005 对 IgE 与直接结合于塑料板的 Fc ϵ R1 α 的修剪胞外域结合的浓度依赖性抑制。

图 19, 显示采用抗体 PTmAb0005 (GE-1)和 PTmAb0011 的 IgE 与 Fc ϵ R2 (CD23)的结合。

25 图 20, 显示与对照比较的、抗体 PTmAb0005 和 PTmAb0011 对变应性人嗜碱性粒细胞组胺释放的浓度依赖性阻断。

图 21, PTmAb0005 和 PTmAb0011 两者对 LolP1 触发的变应性人嗜碱性粒细胞组胺释放的抑制。

图 22, PTmAb0011 与不同 IgE 的结合; (A) PTmAb0011 与嵌合 IgE

的结合; (B) PTmAb0011 与骨髓瘤 IgE 的结合; (C) PTmAb0011 与抗原定向 IgE 的结合; (D) PTmAb0011 与热变性 IgE 的结合

图 23, PTmAb0011 对 IgE 与 FcεR1α 结合的抑制。

图 24, PTmAb0011 与受体结合 IgE 的结合。

5 图 25, (A) PTmAb0011 对 IgE 与 RPMI 8866 细胞上 FcεRII 结合的影响。将 RPMI 8866 细胞(1×10^6 /ml)在冰上与嵌合 IgE ($1 \mu\text{g/ml}$)和抗 IgE mAb ($10^{-0} \mu\text{g/ml}$)孵育 1 小时。使 IgE 和抗 IgE 于室温温育 1 小时, 然后加入细胞中。用 FITC-山羊抗人 IgE 检测结合的 IgE。结果显示通过流式细胞术分析 10,000 个活的门控(gated)事件测定的复份样品的平均通道(channel)荧光(MCF)。 (B)非 P1 特异性抗体 PTmAb0017。

10 图 26, PTmAb0011 对 IgE 与原代人 B 细胞上 FcεRII 结合的影响。将外周血单核细胞(1×10^6 /ml)在冰上与嵌合 IgE ($1 \mu\text{g/ml}$)和抗 IgE mAb ($10^{-0} \mu\text{g/ml}$; 空心)或相同浓度的同种型匹配的对照 mAb (实心)孵育 1 小时。将所述 IgE 和抗 IgE 于室温预温育 1 小时, 然后加入细
15 胞中。用 FITC-山羊抗人 IgE 检测结合的 IgE, 用 PE 缀合的抗 CD19 显示原代 B 细胞。显示通过流式细胞术分析 5,000 个活的门控事件测定的复份样品的平均通道荧光(MCF)。

图 27, PTmAb0011 对原代人 B 细胞分泌 IgE 的影响。

20 外周血单核细胞(2×10^5 /孔)在补充 IL-4 (10ng/ml)和抗 CD40 抗体 ($1 \mu\text{g/ml}$)的培养液中培养。加入 PTmAb0011 或一种同种型匹配的对照 mAb ($1 \mu\text{g/ml}$)达 14 天, 然后收获细胞上清液, 并通过 ELISA 分析总 IgE 含量。结果以在缺乏任何抗体的情况下分泌的 IgE 量的百分比表示。

25 图 28, 抗人 IgE 单克隆抗体在变应性(A)和非变应性(B)人嗜碱性粒细胞中的过敏原性。来自变应性供体或用 $1 \mu\text{g/ml}$ 嵌合 IgE 被动敏化的非变应性供体的 PBMC 用 mAb 于 37°C 处理 30 分钟。通过特异性 EIA 测定组胺的释放。数据为每个不同供体 3 个独立实验的平均值。

图 29, 抗人 IgE 单克隆抗体在敏化(A)和非敏化(B)人肺肥大细胞中的过激原性。敏化或非敏化的粗制人肺肥大细胞悬浮液用抗体于 37°C 处理 45 分钟。通过比色分析, 测定上清液中类胰蛋白酶的释放。数据为来自一个代表实验的复份测定的平均值。

5 图 30, 抗人 IgE 抗体在 RBL J41 细胞中通过人 FcεR1 (A)和小鼠 FcεR1 (B)的过激原性。RBL J41 细胞用嵌合人 IgE 或小鼠 IgE 敏化, 然后用抗体于 37°C 处理 30 分钟。通过比色分析, 测定上清液中的 β-氨基己糖苷酶释放。数据为来自一个代表性实验的三份平行测定的平均值。

10 图 31, PTmAb0011 对人嗜碱性粒细胞中变应原触发的组胺释放的抑制。将 PBMC 与 PTmAb0011 或者直接(变应性测定(A))于 37°C 温育 30 分钟, 或者将它们与 IgE (阻断测定(B))一起于 37°C 温育 30 分钟。随后细胞用抗原于 37°C 触发 30 分钟, 然后通过特异性 EIA 测定组胺的释放。数据为不同供体的 3 个独立实验的平均值 ± s.e.m..

15 图 32, PTmAb0011 和 PTmAb0005 对猴皮肤中被动皮肤过激反应的抑制。单克隆抗体 Dec7B (stanworth 十肽)用作对照。

通过以下实施例说明本发明, 但本发明不限于以下实施例。

20 部分 1 本发明的模拟表位和免疫原

实施例 1.

1.1 表面暴露表位的鉴定、化学缀合和血清学方法

用 Padlan 和 Davies 描述的人 IgE 的建模结构(*Mol. Immunol.*, 23, 1063-75, 1986), 鉴定 IgE Cε2 区的表面暴露表位。鉴定出连续的溶剂暴露的肽。这通过以下步骤完成: 采用分子模拟软件(MSI)计算每种
25 IgE 氨基酸的可及性, 在 5 残基滑动窗口范围平均所述可及表面, 由此鉴定出 IgE 肽中 5-mer 内平均值大于 80Å²的区域。试验结果示于图 1.

结果

从图 1 以及采用 1990 Helm 等模型(于 2/10/90 以 PDB 存储的 2IgE 模型结构(Protein Data Bank, Research Collaboratory for Structural Bioinformatics))的同一方法的多次重复来看, 有许多天然肽可以用作用以产生抗 IgE 抗体的免疫原。

表 1, 天然表面暴露的连续 IgE 肽。

肽名称	序列	定位序列和 IgE 区	SEQ ID NO.
P1	EDGQVMDVD	Cε2 (Glu270-Asp278)	1
P2	STTQEGEL	Cε2 (Ser283-Leu290)	2
P3	SQKHWSLSDRT	Cε2 (Ser300-Thr309)	3
P4	GHTFEDSTKK	Cε2 (Gly318-Lys327)	4
P5	GGGHFPPT	Cε2 (Gly245-Thr250)	5
P6	PGTINI	Cε2 (Pro262-Ile267)	6
P7	FTPPT	Cε2 (Phe231-Thr235)	7

10 合成这些肽或其模拟表位, 并且或者将其与载体蛋白缀合, 或者将其置于肝炎核心抗原构建体中, 以形成表达重组肽的病毒样粒子。

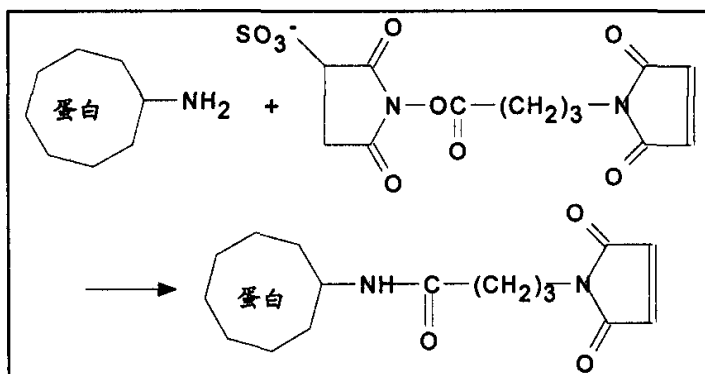
1.2 采用琥珀酰亚胺-马来酰亚胺交联剂合成 IgE 肽/D 蛋白缀合物

15 采用马来酰亚胺-琥珀酰亚胺交联剂, 可以将 D 蛋白直接与 IgE 肽缀合, 形成本发明的抗原。这种化学通过固定琥珀酰亚胺基团提供载体残基的受控 NH₂ 活化。所述马来酰亚胺基团是一个半胱氨酸结合位点。因此, 对于以下实施例的目的, 待缀合的 IgE 肽需要加入一个 N 末端半胱氨酸。

20 所述偶联剂是一种选择性异双功能交联剂, 该化合物的一端通过琥珀酰亚胺基酯活化蛋白载体的氨基, 而另一端通过马来酰亚胺基团

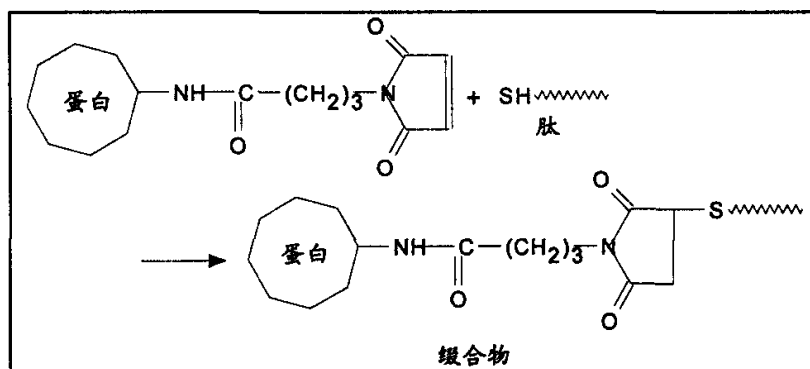
偶联所述肽的巯基。反应方案如下:

a. 通过赖氨酸和琥珀酰亚胺基酯之间的反应活化蛋白:



5

b. 通过与马来酰亚胺基反应在活化蛋白和所述肽的半胱氨酸之间
偶联:



10

1.3 IgE 肽-D 蛋白缀合物的制备

将 D 蛋白以 2.5 mg/ml 的浓度溶于 pH 7.2 的磷酸缓冲盐溶液中。将偶联剂(N-[γ -马来酰亚胺基丁酰氧基]琥珀酰亚胺酯 - GMBS)以 102.5 mg/ml 溶于 DMSO 中, 并加入所述蛋白溶液中。1 mg D 蛋白使用 1.025 mg GMBS。将反应溶液于室温温育 1 小时。通过在 sephacryl 200HR 渗透凝胶上脱盐步骤除去副产物。所用的洗脱液是磷酸缓冲盐溶液 Tween 80 0.1% pH 6.8。收获并合并所述活化蛋白。将所述肽(在表 1 中鉴定的, 或其衍生物或模拟表位)以 4 mg/ml 溶于 0.1 M 乙酸中,

以避免形成二硫键。偶联使用每 1 分子活化 D 蛋白 2-20 个肽的摩尔比。将所述肽溶液缓慢加入到所述蛋白中，并且将混合物于 25℃ 温育 1 小时。在偶联期间，将 pH 保持在 6.6。通过于 25℃、pH 6.5 下加入半胱氨酸(以 4 mg/ml 溶于 0.1 M 乙酸中每 mg 活化 PD 0.1 mg 半胱氨酸)达 30 分钟，进行一个猝灭步骤。对 NaCl 150 mM Tween 80 0.1% 透析 2 次，以除去过量的半胱氨酸或肽。

最后一个步骤是在 0.22 μm 膜上进行过滤除菌。终产物是澄清的可过滤溶液，将其保存于 4℃。可以通过氨基酸分析测定最终的肽/PD 比。

10 以类似的方式，可以将本发明的肽与其它载体包括 BSA 缀合。一种 P1 的模拟表位是合成的 CLEDGQVMDVDLL (P15, SEQ ID NO. 8)，采用上述技术将其与 D 蛋白和 BSA 两者缀合。

1.4 ELISA 法

15 抗肽或抗肽载体 ELISA

用以下概述的 ELISA 技术，研究抗肽和抗载体免疫应答。微量滴定板(Nunc)用 PBS 中的特定抗原包被(4°过夜)，然后进行以下两者之一：2μg/ml 链霉抗生物素蛋白(然后与生物素酰化肽(1μM)于 37℃ 温育 1 小时)、洗涤 3X PBS-Tween 20 0.1%。用 PBS-BSA 1%-Tween 20 20 0.1% (饱和缓冲液)将板于 37°饱和 1 小时。加入第一(1°)抗体 = 以两步稀释的血清(于饱和缓冲液中)，于 37°温育 1 小时 30 分钟。洗涤 3 次。加入与 HRP 偶联的第二(2°)抗小鼠 Ig (或抗小鼠同种型特异性单克隆抗体)，于 37°温育 1 小时。洗涤 5 次。用 TMB 于室温避光显色 10 分钟。用 0.4N H₂SO₄ 阻断反应。

25

检测小鼠血清中抗人 IgE 反应性的方法(IgE 板结合 ELISA)

ELISA 板用 pH 9.6 碳酸盐/碳酸氢盐包被缓冲液中的 1μg/ml 人嵌合 IgE 于 37℃ 包被 1 小时，或于 4℃ 包被过夜。用含 5% w/v Marvel

奶粉的 PBS/0.05% Tween-20 于 37℃ 1 小时封闭非特异性位点。随后加入小鼠血清在 PBS/0.05% Tween-20/1% w/v BSA/4% 新生小牛血清中的连续稀释液于 37℃ 达 1 小时用山羊抗小鼠 IgG-生物素(1/2000), 然后用链霉抗生物素蛋白-HRP (1/1000), 检测多克隆血清结合。用 TMB 底物于 450 nm 检测缀合的抗体。在每个板上包括一条 PTmAb0011 标准曲线, 以便可以以 $\mu\text{g/ml}$ 计算血清样品中的抗 IgE 反应性。

检测小鼠血清中抗人受体结合 IgE 反应性的方法

10 ELISA 板用 pH 9.6 碳酸盐/碳酸氢盐包被缓冲液中的 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 重组人 Fc ϵ R1 α 于 37℃ 包被 1 小时, 或于 4℃ 包被过夜。用含 5% w/v Marvel 低脂奶粉的 PBS/0.05% Tween-20 于 37℃ 1 小时封闭非特异性位点。然后加入 1 $\mu\text{g/ml}$ 人 IgE 于 37℃ 达 1 小时。随后加入小鼠血清在 PBS/0.05% Tween-20/1% w/v BSA/4% 新生小牛血清中的连续稀释液于 37℃ 达 1 小时。用山羊抗小鼠 IgG-生物素(1/2000), 然后用链霉抗生物素蛋白-HRP (1/1000), 检测多克隆血清结合。用 TMB 底物于 450 nm 检测缀合的抗体。在每个板上包括一条 PTmAb0011 标准曲线, 以便可以以 $\mu\text{g/ml}$ 计算血清样品中的抗 IgE 反应性。

20 用模拟表位肽 - 可溶性 IgE 或 PTmAb0011 竞争 IgE 结合

在预封闭的聚丙烯 96 孔板中, 将多克隆小鼠血清的单一稀释液与单一浓度的或者模拟表位肽或人 IgE 混合。将混合物于 37℃ 温育 1 小时, 然后加入到 IgE 包被的 ELISA 板中于 37℃ 达 1 小时。用山羊抗小鼠 IgG-生物素(1/2000), 然后用链霉抗生物素蛋白-HRP (1/1000), 检测多克隆血清结合。用 TMB 底物于 450 nm 检测缀合的抗体。对于血清和 PTmAb0011 竞争 IgE 的结合, 将血清和 PTmAb0011-生物素的混合物加入到 IgE 包被的 ELISA 板中。用链霉抗生物素蛋白-HRP (1/1000) 检测 PTmAb0011 的结合。

1.5 人嗜碱性粒细胞测定

用人嗜碱性粒细胞(HBA)进行两种类型的测定，一种测定是测定所述单克隆抗体的过敏原性，包括将所述抗体加入到分离的 PBMC
5 中；第二种测定是测量通过所述 HBA 与所述单克隆抗体的预温育对 *Lol p I* (一种强变应原)触发的组胺释放的抑制。

通过静脉穿刺术从变应性供者将血液收集到含有 0.1 体积 2.7% EDTA, pH 7.0 的试管中。然后将其用等体积的含 0.1%人血清白蛋白的 HBH 培养液(HBH/HSA)以 1/2 稀释。将所产生的细胞悬浮液铺在
10 50%体积的 Ficoll-Paque 上，然后以 400g 于室温离心 30 分钟。收集位于界面的外周血单核细胞(PBMC)层，并弃去沉淀。细胞在 HBH/HAS 中洗涤 1 次，对其计数，将其重悬于 HBH/HAS 中，细胞密度为 2.0×10^6 /ml。将 100 μ l 细胞悬浮液加入到含 100 μ l 稀释的试验样品或单克隆抗体的 V 形底 96 孔板各孔中。以一定范围的稀释液测
15 试每种试样样品，每种稀释液 6 个孔。用平板摇动器将孔内容物短暂混合，然后于 37 $^{\circ}$ C 温育 30 分钟，同时以 120 rpm 振摇。

对于每种血清稀释液，通过加入 10 μ l *Lol p I* 提取物(最终稀释度为 1/10000)触发 3 个孔，而 3 个孔含有加入的 10 μ l HBH/HSA，以评价过敏原性。用平板摇动器再次将孔内容物短暂混合，然后于 37 $^{\circ}$ C 再
20 温育 30 分钟，同时以 120 rpm 振摇。通过以 500g 离心 5 分钟终止温育。取出上清液，以采用市售组胺 EIA 测量试剂盒(Immunotech)进行组胺测定。常规包括含有细胞但无试验样品的对照孔，以测定自发释放和触发释放。也包括含细胞+ 0.05% Igepal 去污剂的孔，以测定总细胞组胺。

25 结果如下表示：

过敏原性测定

由试验样品引起的组胺释放 =

来自试样样品处理的细胞的组胺释放的百分比 - 自发组胺释放的百分比。

阻断测定

5 采用下式可以计算组胺释放的抑制程度:

抑制百分比

$$= 1 - \frac{\text{来自试样样品处理的细胞的组胺释放}^*}{\text{来自抗原刺激的细胞的组胺释放}^*} \times 100$$

(来自抗原刺激的细胞的组胺释放*)

根据自发释放校正数值。

10

实施例 2, 用 P15 缀合物(P15-BSA 或 P15 -PD)免疫小鼠, 诱导抗人 IgE 抗体的产生。

将在 1.4 中描述的包含模拟表位 P15 (25 μ g 蛋白/剂量)的缀合物给予各组的 10 只 BalbC 小鼠, 用 WO 95/17210 中描述的含有 QS21 和 3D-MPL 的水包油乳液作为佐剂。在第 21 天和第 42 天进行加强, 并且可以在第 42 天和第 56 天收集血清。用实施例 1 所述方法, 测定免疫应答抗肽和抗平板结合 IgE。

结果

20 在第 3 次接种后第 14 天测量的抗肽和抗 IgE 应答的结果示于表 2 中。

表 2, P15 免疫原性结果

模拟表位 缀合物	抗肽应答 (中点效价)			抗 IgE 应答 (μ g/ml (PTmAb0011))		
	平均	标准偏差	几何平均	平均	标准偏差	几何平均
P15-PD (n=16)	41391	26858	36154	1.6	4.5	0.3
P15-BSA (n=10)	49591	9259	48719	2.2	2.5	1.0

实施例 3, 用缀合物免疫后在小鼠中诱导的抗 IgE 是非过敏原性的

可以在存在从变应性患者新收集的外周血的嗜碱性粒细胞的情况下, 测试全血清或从缀合物免疫小鼠纯化的 IgG 的几种稀释液。

5 如下所述, 通过测量由待测试抗体诱导的组胺释放, 可以评价过敏原性:

■ 在葡萄糖葡聚糖梯度上从外周血中取出红细胞

■ 洗涤细胞, 并且加入待测试样品(例如变应原、抗体、变应原 + 抗体、...)

10 ■ 温育后, 收集上清液, 按照生产商的说明(Immunotech, 组胺酶免疫测定试剂盒)测量组胺释放

用或者 P15-BSA 或者 P15-PD 产生的抗血清都未表现出过敏原性。

15 **实施例 4, 用缀合物免疫后在小鼠中诱导的抗 IgE 能够阻断变应原触发变应性患者的嗜碱性粒细胞诱导的 IgE 介导的组胺释放。**

可以测量在存在或缺乏全血清或从缀合物免疫小鼠纯化的 IgG 的几种稀释液的情况下用不同浓度变应原触发的嗜碱性粒细胞样品中的组胺释放。通过测量由所述变应原诱导的组胺释放的抑制, 评估

20 抗血清中抗 P15 抗体的阻断活性。如实施例 3 所述, 测量组胺释放和抑制。由于 P15 是一种 P1 的模拟表位, 因此将 PTmAb0011 用作对照, 因为已知它与同一表位(P1)结合。结果示于表 3 中。

表 3, 对变应性人嗜碱性粒细胞组胺释放的抑制

抗血清	稀释度	组胺释放的抑制百分比
P15-PD (小鼠 4.12)	1/30	79
P15-PD (小鼠 4.5)	1/30	57
P15-BSA (小鼠 7.3)	1/30	67
P15-BSA (小鼠 7.5)	1/30	57

PTmAb0011	0.1 μ g/ml	56
PTmAb0011	1 μ g/ml	90
抗 BSA 血清	1/30	40
抗 PD 血清	1/30	40

实施例 5, P2 和 P3 的模拟表位的免疫原性

用实施例 1.2 所述技术, 将以下模拟表位与 BSA 缀合, 并且采用实施例 2 所述的相同制剂和方案, 用所述缀合物免疫小鼠。

P16	CSTTQEGELA-NH ₂	P2 模拟表位	SEQ ID NO. 24
P17	CSQKHWLSDRT-NH ₂	P3 模拟表位	SEQ ID NO. 26

5

在最后一次免疫后给小鼠放血, 并在 IgE 平板结合 ELISA 中测试抗 IgE 反应性。以下总结了单个结果、平均结果(Av)、几何平均结果(GM)(SD = 标准偏差)。

10 表 4, P16 和 P17 免疫原性结果

抗肽免疫应答/小鼠(第 3 次接种后的第 14 天), 中点效价													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Av	SD	GM
P1 6	1891	649	1299	2349	591	1474	4605	918	4177	865	1882	1436	1478
P1 7	100	4349	2850	3434	6133	2231	5085	2991	13070	8874	5446	3515	4656

实施例 6, P1 模拟表位的产生和其免疫原性/功能活性

6.1 免疫原的产生

通过噬菌体展示技术或通过对 IgE Cε2 区的 C-D 环分子建模进行合理设计, 衍生 P1 的模拟表位。合成以下肽, 并将其构建为 BSA-肽缀合物, 也将其构建到 HepB 核心抗原重组构建体中。

肽名称	序列	SEQ ID NO.	
C67/8	CFINKQMADLELCPRE	P1 模拟表位	12
PT1079	CLEDGQVMDVDLCPREAAEGD	P1 模拟表位	14
PT1079GS	CLEDGQVMDVDLCGGSSGGP	P1 模拟表位	15
PT1078	CLEDGQVMDVDCPREAAEGDK	P1 模拟表位	16

如下产生所述肽/蛋白载体构建体。如方案 1 (图 2) 所示, 在固相上制备酰基胍肽衍生物。用众所周知的‘Fmoc’法, 在全自动仪器中, 采用或者聚酰胺或者聚乙二醇-聚苯乙烯(PEG-PS)支持体, 通过本领域众所周知的技术[用于固相合成的技术和方法由 E. Atherton 和 R.C. Sheppard 描述于‘Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach’, 由 IRL at Oxford University Press 出版 (1989)], 可以容易地制备这些肽衍生物。酸介导的切割提供了线性、去保护、经修饰的肽。用 D. Andreau 等在‘Methods in Molecular Biology, 第 35 卷: Peptide Synthesis Protocols (M.W. Pennington 和 B.M. Dunn 编著), 第 7 章, 第 91-171 页中概述的方法, 可以容易地将这种肽氧化和纯化, 得到二硫桥修饰的表位。

采用以下技术, 可以将由此合成的肽与蛋白载体(在这种情况下为牛血清白蛋白, BSA)缀合:

6.2 修饰载体的合成

采用如方案 2 所述(图 3, 有关进一步的细节参见 WO 98/17628)制备的琥珀酰亚胺基活性酯(BAL-OSu), 引入芳基醛官能团。将 BAS

5 (牛血清白蛋白)的氨基官能取代至约 50%，得到常规可溶性的修饰蛋白。对所述 BSA 进行更多的取代，产生不溶性构建体。在 DMSO/缓冲液(参见方案 3, 图 3)中将等摩尔浓度的 BSA 和 BAL-OSu 混合 2 小时。这种实验性衍生的方案导致通过荧光胺试验判断，BSA 中约 50% 游离氨基被取代。

6.3 肽-BSA 构建体:

修饰的肽和衍生化 BSA 的简单组合提供容易通过透析分离的肽-BSA 构建体(方案 4, 图 4)。用 SDS-PAGE 来证实分子量的增加。

10

6.4 肝炎核心抗原构建体

用 EP 0 421 635 B 中描述的分子生物学技术，也制备了肝炎核心抗原重组构建体(HBC)。在这些 HBC 实验中，对 PT1079 加以修饰，以除去末端赖氨酸。

肽	序列	SEQ ID NO.
PT1078HBC	CLEDGQVMDVDCPREAAEGD	65
PT1079HBC	CLEDGQVMDVDLCPREAAEGD	66

15

通过用 PTmAb0005 和 PTmAb0011 进行 BIAcore 实验，证实 P1 模拟表位肽的表达。用仅为 3 μg/剂 HBC 的剂量产生免疫原性结果。

6.5 免疫原性研究

20 纯化所述模拟表位/HBC 和模拟表位/BSA 构建体，将其配制为疫苗，并且用 WO 95/17210 中描述的含有 QS21 和 3D-MPL 的水包油乳液作为佐剂(25μg BSA 缀合物剂量)。将这些疫苗给予各组的 10 只 BalbC 小鼠，并且在第 14 天和第 28 天进行加强，然后在第 42 天收集血清。然后用实施例 1.4 中描述的技术，研究对抗平板结合 IgE 和受体定向 IgE 的免疫应答。此外，用 1.5 中描述的技术，测量抗血清在
25 抑制变应性嗜碱性粒细胞释放组胺方面的活性。

6.6 结果

当所述 IgE 直接结合于 ELISA 板时，以及定向到高亲和性受体时，所有 BSA 和 HBC 构建体均诱导高效价的抗 IgE 抗体。而且，证实所有这些应答均是特异性的，因为它们受到游离 IgE 和所述模拟表位本身的竞争，并且不受非特异性肽的竞争。由这些免疫原诱导的抗 IgE 能够抑制来源于变应性供体(黑麦草, LOLP1)的人嗜碱性粒细胞释放组胺。

C67-8 的结果参见图 5、6、13 和 15。PT1078 的结果参见图 9、10、14 和 15。PT1079 的结果参见图 7、8、14 和 15。PT1079GS 的结果参见图 11、12 和 15。

此外，由这些肽模拟表位产生的免疫应答不是过敏原性的。

表 5, P1 模拟表位抗血清的过敏原性

免疫原	血清 稀释度	%组胺释放
自发释放		0.25 ± 0.06
未经试验的血清	1/50	1.9 ± 0.4
BSA	1/50	2.15 ± 0.65
BSA-IgE C67-8	1/50	2.9 ± 1.1
BSA-1078	1/50	5.00 ± 1.40
BSA-1079	1/1250	0.43 ± 0.04
HBCwt	1/50	3.5 ± 1.0
HBC-1079	1/1250	0.12 ± 0.04
HBC-1079gs	1/1250	0.02 ± 0.02
HBC-IgE C67-8	1/50	2.14 ± 0.26

表的脚注，来自 LolP1 过敏性供体的细胞用稀释的小鼠血清处理 30 分钟。通过市售的组胺特异性 EIA 测定释放的组胺。数据为平均值 ± S.E.M. (n = 10)。

部分 2 与本发明的表位和模拟表位结合的配体

肽免疫原为部分 1 中描述的肽免疫原，它们在以疫苗形式给予哺乳动物后，诱导免疫应答，所述免疫应答(a)识别 IgE，和(b)能够体外抑制组胺释放。部分 2 描述了能够与本发明的表位或模拟表位结合的配体，并且描述了其功能。已经鉴定出两种识别 IgE Cε2 的 c-d 环的单克隆抗体 - PTmAb0005 和 PTmAb0011。在部分 1 中已经表明这种肽的模拟表位是免疫原性的，并且在活性疫苗中有功能。这一节描述这些单克隆抗体的表征，并且提供它们在被动疫苗接种方面用途的证据。

10 采用噬菌体淘选技术，即多个噬菌体靶的序列对比，鉴定所述抗体的靶表位，随后精选，并通过结构域作图和定点诱变加以证实。所述抗体的功能活性不仅在体外通过分析抗 IgE 的识别和变应性介质释放的抑制得以证实，而且在体内通过猴被动皮肤过敏性(PCA)研究而得以证实。

15

实施例 7,

7.1 单克隆抗体靶的噬菌体作图

用噬菌体展示文库，采用 3 种不同的噬菌体文库，在噬菌体 gVIIIp 的 N 末端展示或者 XCX₁₅、XCX₁₀ 或者 XAX₁₀ 肽序列(其中 X 为任何氨基酸)，将所述单克隆抗体的结合位点作图。表 6 和表 7 显示分别用抗人 IgE 单克隆抗体 PTmAb0005 和选择肽配体的结果。所述肽和人 IgE 之间的氨基酸模式的相似性表明与 IgE Cε2 区中的 c-d 环的强同源性匹配。由噬菌体回复产生的同源性模式是：Q h h a h a h (其中 h = 疏水性氨基酸，而 a = 酸性氨基酸)，并且这与人 IgE Cε2 区 C-D 环中的序列 QVMDVDL (SEQ ID NO. 17)是匹配的。

25

在 IgEC67 中，也对得自噬菌体淘选实验并且对 PTmAb0005 具有最高亲和性的肽进行表位作图。通过经 PCR 诱变引入随机突变，并且亚克隆到 Fuse 5 载体中用于次要丝状噬菌体蛋白 gIIIp 展示，进

行这种作图。将 IgEC67 突变体按与 PTmAb0005 结合的顺序分等级，如表 8 中所示。这些结果和其它结果表明了 IgEC67 中与所述 C ϵ 2 表位匹配的氨基酸的重要性。例如，L8P、D10G、L11M、E12G 和 L13R 突变体均降低与抗 IgE PTmAb0005 的结合(数据未显示)。其它位点的突变对与 PTmAb0005 的亲合性几乎没有影响。

由最高亲合性 PTmAb0005 和 PTmAb0011 噬菌体展示衍生肽制备随机亚文库，以采用先前描述的方法(Yu, J.和 Smith, G. P. (1996) “噬菌体展示的肽配体的亲合性突变” *Methods in Enzymology*, 267, 3-27)增强所述肽对所述抗体的亲合性，这涉及借助一个随机 PCR 步骤，将 DNA 亚克隆从所述主要外壳蛋白(gVIIIp)丝状噬菌体展示载体转移至较低拷贝数的次要噬菌体外壳蛋白(gIIIp)展示载体。由包括最高亲合性 PTmAb0005 配体 IgEC67 和 IgE C67-8 在内的几个噬菌体序列制备亚文库。C67 和 C67-8 的亲合性成熟(matured)序列分别示于表 8 和表 9。在所述表中包括等级次序，也包括 BIAcore 亲合性(如果可得到的话)。当用表达 IgEC67-8 的噬菌体作为免疫原时，IgEC67-8 能够在小鼠中诱导抗人 IgE 应答。

7.2 通过结构域作图证实靶

产生大量构建体，以将 PTmAb0005 和 PTmAb0011 对 IgE 恒定区的结合特异性作图。产生以下构建体：C ϵ 2-4、C ϵ 2-3、C ϵ 3-4、C ϵ 3-4L (C ϵ 3-4 加 C ϵ 2 区和 C ϵ 3 区之间的接头序列)和单独的 C ϵ 2。

用衍生自杂交瘤系 JW8/5/13 的 cDNA，克隆包含不同人 IgE Fc 区的片段，所述杂交瘤系表达嵌合人 IgE (Neuberger, MS 等(1985) *Nature* 314 268-270; Bruggemann, M 等(1987) *J Exp Med* 166 1351-61)。用合适的引物对并用 JW8/5/3 cDNA 作为模板，扩增所述 IgE Fc 片段。c ϵ 2-4 片段编码氨基酸(aa) S225-K547。c ϵ 3-4 片段编码 aa G335-547。c ϵ 3-4L 片段(结构域 3-4 加连接 c ϵ 2 至 c ϵ 3 的接头序列)编码 aa E322-K547。c ϵ 2-3 片段编码 aa S225-G436。c ϵ 2 片段编码 aa S225-

S324. 所有的构建体均含有一个 COOH 末端六组氨酸尾, 以用于检测和纯化。将这些片段克隆到真核生物表达载体中, 且与得自 CD33 的前导编码序列符合读框, 以指导所表达片段的分泌。这使得能够在哺乳动物细胞系中表达。该载体衍生自 pcDNA3.1+ (Invitrogen)。为了
5 表达所克隆的片段, 将合适的克隆转染到 COS-7 细胞中, 并且在转染后 48-60 小时收获所产生的条件培养液。

通过 ELISA 测定, 通过使所述构建体与 EILSA 板结合, 然后与 PTmAb0005 和 PTmAb0011 温育, 并且用抗小鼠抗体显示, 研究 PTmAb0005 和 PTmAb0011 与所表达的 IgE 区的结合。此外, 通过众
10 所周知的蛋白质印迹技术, 研究与变性构建体的结合。

PTmAb0005 的结果显示, 与天然形式的 C ϵ 2-4、C ϵ 2-3 和 C ϵ 2 强结合, 在蛋白质印迹中也与变性后的 C ϵ 2-4 和 C ϵ 2 结合。在两种测定中都未观察到与 C ϵ 3-4 或 C ϵ 3-4L 的结合。

PTmAb0011 也与天然形式的 C ϵ 2-4、C ϵ 2-3 和 C ϵ 2 结合; 也与变
15 性形式的 C ϵ 2-4 和 C ϵ 2 结合。

因此, 显然这两种抗体均识别 IgE C ϵ 2 区中存在的一个靶表位。

7.3 通过定点诱变证实靶

结构域作图研究证明, 两种 mAb 均能够与单独的 C ϵ 2 区结合。
20 对衍生自噬菌体展示肽文库的生物淘选序列的分析表明, PTmAb0005 衍生序列显示出与 P1 的显著相似性。在 IgE 模型结构中该区在 C ϵ 2 的 C-D β 链之间形成一个环。进行定点诱变研究以证实该序列对于 PTmAb0005 和 PTmAb0011 为表位。

经淘选的噬菌体序列的分析和所述 IgE 模型结构(Helm 等 1990,
25 参见上文)与已知的人 IgG1 Fc 结构(Deisenhoffer, J., 1981, Biochemistry, 20, 2361-2370)的比较, 导致鉴定出 3 个可能参与抗体识别的残基。这些残基是谷氨酰胺(Q) 273、甲硫氨酸(M) 275、天冬氨酸

酸(D) 276。将这 3 个残基中的每个残基变为丙氨酸(A)，而至少另一个氨基酸残基如下。

Q273: A 和 E (谷氨酸)

M275: A; Q 和 K (赖氨酸)

5 D276: A 和 N (天冬酰胺)

所述丙氨酸突变既改变所述靶残基的结构，又改变所述靶残基的化学，而另一突变保持结构(尽可能地接近)，但改变电荷，例如 Q273E。这里，谷氨酸具有与谷氨酰胺基本相同的结构，但带负电，而不是中性的。

10 在 Cε2-4 构建体中独立地产生每种突变。每种突变多肽的表达水平与野生型(WT) Cε2-4 相似，并且在基于 ELISA 的测定中，每种突变多肽均能够同 WT cε2-4 产物同样有效地与重组 FcεR1α胞外域结合。总之，这些数据表明，所述突变对在所述表达系统中所述多肽的产生/分泌没有影响，并且大体上不影响 cε2-4 片段的结构。

15 除 D276N 外，所有的突变均基本上消除了与 PTmAb0005 和 PTmAb0011 的结合，D276N 将与 PTmAb0005 的结合仅降低约 50% (表 10)。进行 Cε2 内的可变谷氨酰胺残基 Q317 的突变，以作为这些实验的对照。产生 Q317E 和 Q317K 突变体，并且发现它们对 PTmAb0005 和 PTmAb0011 识别 Cε2-4 的能力没有影响。同样，不影响 FcεR1α的
20 识别。

因此，PTmAb0005 和 PTmAb0011 的结合活性特异性地受 Cε2 的 C-D 环内突变的影响。

总之，序列 P1 包含对 PTmAb0005 和 PTmAb0011 两者的主要结合决定簇。

25

表 10, PTmAb0005 和 PTmAb0011 对 IgE 结构域构建体的识别

突变	被 PTmAb0005 识别	被 PTmAb0011 识别	被 FcεR1α 胞外域 识别
WT cε2-4	++++	++++	++++
Q273A	-	-	++++
Q273E	-	-	++++
M275A	+/-	+/-	++++
M275Q	+/-	+/-	++++
M275K	+/-	+/-	++++
D276A	-	-	++++
D276N	++	-	++++
Q317E	++++	++++	++++
Q317K	++++	++++	++++

7.4 IgE Cε2 的 C-D 环的精细建模

5 由于尚未确定人 IgE 的实际结构(尽管可得到一种模型), 因此在详细水平上检查后该模型结构仍有可能出错。因此, 本发明人通过将 IgE 的 Cε2 环区作图至人 IgG1 Cγ2 的等同区(Deisenhoffer J 1981 参见上文), 改进了 IgE 的 Cε2 环区的这种模型。

10 根据关于所述结构特征范围的这一新信息, 设计了一种环化肽, 所述环化肽当合成时, 应该采取非常类似全 IgE 分子环境中 Cε2 的 C-D 环构象的构象。这种肽 - Ac-CLEDGVQMDVDLCPREAAEGDK(Ac)-NH₂ 被命名为 PT1079 (SEQ ID NO. 14)。

用 BIAcore 技术, 测量 PT1079 与 PTmAb0005 和 PTmAb0011 两者的亲和性, 发现 PT1079 表现出对这两种单克隆抗体非常强的识别

此，采用基于这些肽的免疫原的疫苗接种将具有相同的功能特征。

实施例 8,

8.1 材料和方法

5 8.1.1 *FcεRIα*结合测定(A 蛋白平板)

在该测定中，用重组形式的 IgE 高亲和性受体α链的胞外域(α胞外域)，结合嵌合 IgE。将所述α胞外域的羧基末端与人 IgG1 Fc 序列融合。这使得所述重组分子能够通过所述 Fc 区，结合 A 蛋白包被的微量滴定板。因而，大多数所述α胞外域分子应该可得到结合配体，
10 并且提供一种用于分析 IgE-受体相互作用的系统。下述测定形式的目的是检测阻断抗 IgE 抗体活性的(高亲和性)受体。

8.1.2 用于检测 IgE 与高亲和性受体α链胞外域结合的 ELISA 方案

用在封闭缓冲液(PBS/5% BSA/0.05% Tween-20)中稀释至
15 0.25μg/ml 的 100μl/孔α胞外域(α-ecto)-Ig 融合蛋白包被 A 蛋白板。于 37°C 温育 1 小时。在 10%猪血清中将嵌合 IgE 稀释至 0.03125μg/ml。在该 IgE 溶液中将抗 IgE 抗体稀释至合适的试验浓度。于室温温育 1 小时。运用洗板机，用 PBS/0.05% Tween-20 洗板 3 次。加入 100μl/孔的 IgE:抗 IgE 溶液(每个抗 IgE 浓度分析 4 个平行测定)。于 37°C 温
20 育 1 小时。运用洗板机，用 PBS/0.05% Tween-20 洗板 3 次。加入 100μl/孔的山羊抗小鼠λ链 HRPO 缀合的抗体在封闭缓冲液中稀释的 1:6000 稀释液。于 37°C 温育 1 小时。运用洗板机，用 PBS/0.05% Tween-20 洗板 3 次。加入 200μl/孔的 OPD 底物，并于室温避光温育 2-10 分钟。加入 25μl 25% H₂SO₄ 终止反应。在平板摇动器上慢速混合已终止的反
25 应物。于 490nm 读出 OD。

可以计算出关于对 IgE 与其受体结合的抑制百分比的图。根据仅在 10%猪血清中含有 IgE (即无抗 IgE)的一组孔的平均值，确定 IgE 的最大结合值。

因此，抑制百分比值计算为：

$$(\text{最大 IgE 值} - \text{抗 IgE 平行测定的平均值}) / \text{最大 IgE 值} \times 100$$

8.1.3 FcεRIα 结合测定(经修剪的胞外域)

5 该测定基本上与前一测定相同，只是 FcεRIα胞外域/IgG 构建体用蛋白水解酶 - 因子 X 处理，以切割所述两个部分。用 A 蛋白微珠 (bead) 除去 IgG Fc 部分，而用链霉抗生物素蛋白微珠除去因子 X，因此留下基本纯的 α 链胞外域产物。在该测定形式中，所述 α 胞外域直接与塑料微量滴定板结合，所有其它测定细节如上所述。

10

8.1.4 CD23 结合测定(FcεRII, 低亲和性受体)

该测定或者在 RPMI 8866 细胞上或者在原代人 B 细胞上进行；可以使用两种形式，一种形式用于检测与结合了 FcεRII 的 IgE 结合的 mAb，而第二种形式分析所述 mAb 是否干扰结合了 FcεRII 的 IgE。

15 对于第一种测定，在 PBS, 1% FBS, 0.1% NaN₃ 中，在冰上向细胞加入嵌合 IgE (1 μg/ml) 达 1 小时。除去过量的 IgE 并加入抗 IgE mAb。结合的 mAb 均用 FITC 缀合的大鼠抗小鼠 IgG₁ 抗体显现。对于第二种测定，将嵌合 IgE (1 μg/ml) 与抗 IgE mAb 于室温预温育 1 小时，同时温和混合，然后将其加入到细胞中。将该混合物与所述细胞在冰上孵

20 育 1 小时，然后洗涤以除去未结合的 IgE。用 FITC-山羊抗人 IgE 检测结合的 IgE，或者用 FITC-缀合的大鼠抗小鼠 IgG₁ 抗体检测结合的抗 IgE mAb。当在 PBMC 上进行研究时，用 PE 缀合的抗 CD19 抗体鉴定组分 B 细胞。通过流式细胞术分析样品。

25 8.2 结果

PTmAb0005 和 PTmAb0011 的结果示于图 16-21。

图 16 显示单克隆抗体与平板结合的 IgE 的浓度依赖性结合。图 17 显示 PTmAb0005 和 PTmAb0011 对 IgE 与 FcεRIα/IgG 构建体结合

5 的浓度依赖性抑制。图 18 显示抗体 PTmAb0005 和 PTmAb0011 对 IgE 与直接结合于塑料板的 FcεRIα 经修剪的胞外域结合的抑制。图 19 显示抗体 PTmAb0005 (克隆 GE-1) 和 PTmAb0011 对 IgE 与 FcεRII (CD23) 的结合没有抑制作用。图 20 和 21 显示抗体 PTmAb0005 和 PTmAb0011 对变应性人血液嗜碱性粒细胞组胺释放的浓度依赖性阻断作用。

10 PTmAb0011 是一种对人 IgE 有特异性的小鼠单克隆抗体，表明与其它人 Ig 同种型或大鼠/小鼠 IgE 没有交叉反应性。当以随机方向与 ELISA 板结合时，PTmAb0011 与天然 IgE 和经热处理的 IgE 均结合，表明 IgE 上的其识别位点不是热不稳定的。当通过抗原与 ELISA 板结合时，PTmAb0011 也识别 IgE。重要的是，这种 mAb 可以完全阻断人 IgE 与高亲和性 IgE 受体 (FcεRI) 的 α 链结合组分之间的相互作用。然而，这种 mAb 当预结合于 FcεRI 时仍识别人 IgE，表明该 mAb 结合位点在受体结合时未丧失。

15 实施例 9,

9.1 通过普通 EILSA 和抗原定向 ELISA 分析 PTmAb0011 的 IgE 结合特性

20 如实施例 1 中所述，通过用人嵌合 IgE、骨髓瘤 IgE、人 Ig 同种型或啮齿动物 IgE (1μg/ml, 在 pH 9.6 碳酸盐/碳酸氢盐包被缓冲液中) 包被平板，进行普通的 IgE 结合 ELISA 法。对于抗原定向 ELISA，以饱和浓度包被 NP-BSA，然后加入嵌合 IgE (1μg/ml)。另一方面，包被可溶性人 FcεRI α 链 (0.25μg/ml)，然后包被嵌合 IgE。如实施例 1 所述 (用于检测小鼠抗人 IgE mAb 的 ELISA 方案) 进行其余的 ELISA。

25 9.2 结果

图 22 说明，PTmAb0011 当以随机定向方式结合于 ELISA 板时，与人/小鼠嵌合 IgE 和人骨髓瘤 IgE 均结合。同样，与抗原定向 IgE 的结合 (即与平板结合 NP-BSA 结合的 IgE) 是剂量依赖性的。也分析了

PTmAb0011 识别在 56°C 热处理一定时间后的嵌合 IgE 的能力。图 22 也表明, PTmAb0011 对 IgE 的结合容量不受热处理影响。

进一步扩展所述 mAb 的表征, 以确定 PTmAb0011 是否能够抑制 IgE 与高亲和性 IgE 受体的 α 链组分的相互作用(图 23)。将 IgE 与 PTmAb0011 预温育, 然后加入到平板结合的 Fc ϵ RI α 链中, 导致对 IgE 与 Fc ϵ RI α 链相互作用的剂量依赖性抑制。PTmAb0011 也(图 24)以剂量依赖性方式识别 Fc ϵ RI α 链连接的 IgE。

实施例 10

10.1 原代人 B 细胞分泌 IgE 的分析

在 96 孔 U 形孔板中, 在补充 IL-4 和抗 CD40 的培养液中以 2×10^5 细胞/孔接种 PBMC。加入 PTmAb0011 或同种型匹配的对照 mAb, 并且在收获上清液进行 IgE 分析之前将细胞培养 14 天。通过用 0.5M 碳酸盐/碳酸氢盐缓冲液中 (pH9.6) 的兔抗人 IgE 抗体 (10 μ g/ml) 包被 ELISA 板, 测量总 IgE 水平。用 PBS, 0.05% Tween 20, 5% BSA 封闭经洗涤的板。将细胞上清液和 IgE 标准与饱和量的 PTmAb0011 (10 μ g/ml) 于室温温育 1 小时, 然后加入至 ELISA 板中, 以让其形成 IgE/抗 IgE 复合物。在温育和洗涤步骤后, 用 HRP-绵羊抗人 IgE, 然后用 OPD 底物, 检测结合的 IgE。然后估计相对于标准曲线的细胞上清液中的 IgE 水平。

10.2 结果

将 IgE 与剂量范围为 10 μ g/ml 至 0.5 μ g/ml 的 PTmAb0011 预温育, 并检查其对随后的 IgE 与人 B 细胞系 RPMI8866 上 Fc ϵ RII 结合的影响。图 25 说明, IgE 与 PTmAb0011 的预温育增强了 IgE 与 Fc ϵ RII 的结合。非 P1 特异性单克隆抗体 (PTmAb0017) 不增加 IgE 与 Fc ϵ RII 受体的结合。PTmAb0011 也增加 IgE 与原代 B 细胞上 Fc ϵ RII 的结合(图 26)。

10.3 PTmAb0011 对原代人 B 细胞分泌 IgE 的影响

在加入 IL-4 和抗 CD40 抗体的情况下，用 PTmAb0011 培养外周血单核细胞，以促进 B 细胞同种型转换为 IgE 分泌。开发了一种 ELISA 测定，该测定提供对总 IgE (即游离 IgE 和 PTmAb0011 复合的 IgE) 水平的测量。为了达到这种定量，将分泌的 IgE 与饱和水平的 PTmAb0011 一起预温育，以让所有 IgE 复合。相对于也已经与饱和水平的 PTmAb0011 复合的 IgE 的标准曲线，对组织培养上清液中的总 IgE 定量。图 27 说明，在三种不同供体中，原代 B 细胞与 PTmAb0011 (1 μ g/ml) 的温育导致分泌 IgE 总水平的显著降低。用所述同种型匹配的对照抗体没有观察到这种抑制作用。

10.4 人嗜碱性粒细胞组胺释放的测定

采用两种测定形式。用 1 μ g/ml 嵌合 IgE 于 37 $^{\circ}$ C 被动敏化得自非变应性供体的 PBMC，洗涤，然后用单克隆抗体于 37 $^{\circ}$ C 处理 30 分钟。或者，用单克隆抗体于 37 $^{\circ}$ C 将得自 LolP1 敏化的供体的 PBMC 直接处理 30 分钟。通过离心终止反应。通过特异性免疫测定(Immunotech 2562)，测定细胞上清液的组胺释放。在用 0.5% Igepal 去污剂裂解的细胞中测定总细胞组胺含量。

20

10.5 嗜碱性粒细胞阻断测定

通过将得自非变应性供体的 PBMC 与嵌合 IgE 在存在单克隆抗体和 IL-3 的情况下于 37 $^{\circ}$ C 温育 30 分钟，测定抗 IgE 抗体阻断嵌合 IgE 与人嗜碱性粒细胞上 Fc ϵ R1 结合的能力。洗涤细胞，并用 NP-BSA 于 37 $^{\circ}$ C 再触发组胺释放达 30 分钟。通过离心终止反应，并如上所述测定组胺释放。

25

10.6 变应性嗜碱性粒细胞抑制测定

通过将得自 LolP1 敏化供体的 PBMC 与单克隆抗体于 37℃ 预温育 30 分钟, 然后用 LolP1 触发, 来研究抗 IgE 抗体抑制变应原触发的脱颗粒的能力。

5

10.7 人肺肥大细胞类胰蛋白酶释放的测定

通过用包含饱和透明质酸酶、链霉菌蛋白酶和 DNA 酶的混合剂进行酶消化, 由人肺组织制备粗制肥大细胞悬浮液。或者直接使用细胞, 或者用嵌合 IgE 预敏化细胞, 然后用抗 IgE 抗体处理。通过对颗粒酶类胰蛋白酶的比色测定, 测定肥大细胞的脱颗粒。

10

10.8 用人 FcεR1α 转染的 RBL 细胞的 β-氨基己糖苷酶释放的测定

从 University of Sheffield 的 B. Helm 博士获得转染的细胞系 RBL J41。用或者小鼠单克隆 IgE 抗 DNP 或者人嵌合 IgE 抗 NP 被动敏化细胞, 然后用抗人 IgE 抗体触发。通过对 β-氨基己糖苷酶释放的比色测定, 测定脱颗粒。

15

10.9 结果

10.9.1 抗 IgE 单克隆抗体在人嗜碱性粒细胞中的过敏原性

对多种不同的抗 IgE 单克隆抗体分析其既触发变应性嗜碱性粒细胞的组胺释放、又触发非变应性嗜碱性粒细胞的组胺释放的能力(图 28)。与其它抗体相对比, PTmAb0011 一致地不能产生显著的组胺释放。

20

10.9.2 抗 IgE 单克隆抗体在人肺肥大细胞中的过敏原性

在敏化和非敏化人肺肥大细胞中, PTmAb0011 也都不能释放显著量的类胰蛋白酶(图 29)。多克隆抗人 IgE 在这些细胞中产生 60-70% 的释放。

25

10.9.3 抗 IgE 单克隆抗体在用人 FcεR1α 转染的 RBL 细胞中的过敏原性

用嵌合人 IgE 抗 NP 被动敏化的 RBL J41 细胞可以用抗原 NP-BSA 以及用多克隆抗人 IgE 触发, 而不能用 PTmAb0011 触发(图 30)。相反, 当细胞用小鼠 IgE 抗 DNP 敏化时, 两种抗人 IgE 抗体均没有作用。所述细胞仍可以被抗原 DNP-BSA 触发。

10.9.4 嗜碱性粒细胞阻断测定

PTmAb0011 在非变应性嗜碱性粒细胞中能够阻断 IgE 与 FcεR1 的结合, 因此抑制随后的用 NP-BSA 抗原的触发。该活性的 IC₅₀ 值约为 60ng/ml (图 31)。PTmAb0011 也能够有效地抑制 LolP1 触发的变应性嗜碱性粒细胞的组胺释放, 其 IC₅₀ 值为 40ng/ml (图 31)。

15 实施例 11, 猴被动皮肤过敏反应研究

也测试了 PTmAb0005 和 PTmAb0011 的体内活性。简而言之, 刮下非洲绿猴的局部皮肤肥大细胞, 通过在两臂皮内给予 100ng 抗 NP IgE (人 IgE 抗硝基苯乙酰(NP), 购自 Serotech)进行敏化。24 小时后, 在一臂上给予人 IgE 的相同注射位点上, 注射一定剂量范围的待测试的单克隆抗体。所述动物另一臂上的对照位点或者接受磷酸缓冲盐溶液(PBS), 或者接受非特异性人 IgE (对人巨细胞病毒(CMV)或人免疫缺陷病毒(HIV)特异性的)。5 小时后, 通过静脉注射给予 10 mg BSA-NP 缀合物(购自 Biosearch Laboratories)。15-30 分钟后, 对照动物产生容易观察到的由过敏反应所致的大致环形的肿胀, 这可以以毫米来测量。结果或者以各组 3 只猴子的平均水肿直径来表示, 或者以与 PBS 对照相比的抑制百分比来表示。描述于 EP 0 477 231 B 中的 Dec7B 识别人 IgE Cε4 区中的肽 496-506, 将其用作阳性对照。

待测试的样品量(μg)	水肿的平均直径(mm)				
	mAb0005	mAb0011	Dec7B	IgE α -CMV 对照	IgE α -HIV 对照
20	0	0	0	19.5	21
10	0	0	20	20.7	22
1	4	4.5	25	22.7	23
0.1	14.8	15.7	20	21.8	22.5
0.05	17.8	18.7	22.5	21.5	22.8
PBS	23.2	28.2	26	24.5	22.5

过敏反应的抑制百分比示于图 32 中。

表 6-根据亲和性从初次噬菌体展示生物淘选鉴定的 PTmAb0005 肽配体

人 IgE Cε2 EDGQVMDVD – SEQ ID NO. 1

名称	文库	等级 (ECL)		PTmAB BIAcore K _D ^{Rel} (μM)	SEQ ID NO.
		PTmAb0005	PTmAb0011		
IgEC67	XCX15	243	0.1	4.8	13
IgEC26	XCX15	43	3	53.4	67
IgEC29	XCX15	40	>600	>600	68
IgEC42	XCX15	15	19.4	>500	69
IgEC69	XCX15	11	6.6	6.4	70
IgEC9	XCX15	10	-	-	71
IgEC13	XCX15	5	>1000	>1000	72
IgEC56	XCX15	0	60	>1000	73
IgEC43	XCX15	0	-	-	74
IgEC81	XCX15	0	78	6.3	75
IgEC83	XCX15	0	-	-	76
IgEC70	XCX15	0	-	-	77
IgEC64	XCX15	0	-	-	78
IgEC73	XCX15	0	>600	>600	79
IgEC72	XCX15	0	-	-	80
IgEC66	XCX15	0	>600	>600	71
IgEC75	XCX15	0	-	-	82
ESC18	XCX15	0	-	-	83
ESC45	XCX15	0	-	-	84
ESC12	XCX15	0	-	-	85

名称	文库	等级 (ECL)	PTmAB BLAcore K _D ^{Rel} (μM)		SEQ ID NO.
			PTmAb0005	PTmAb0011	
ESC43	XCX15	0	-	-	86
ESC1	XCX15	0	-	-	87
ESC4	XCX15	0	-	-	88
ESC46	XCX15	0	-	-	89
ESC20	XCX15	0	-	-	90
					91
ESD36	XCX10	0	-	-	92
ESD14	XCX10	0	-	-	93
ESD38	XCX10	0	-	-	94
ESD15	XCX10	0	-	-	95
ESD6/10/40	XCX10	0	-	-	96
ESB4/35	XAX10	0	70	700	96
ESB25	XAX10	0	60	>1000	97
ESB10/38	XAX10	0	139	>1000	98
ESB8	XAX10	0	257	>1000	99
ESB29/36	XAX10	0	-	-	100
ESB15	XAX10	0	-	-	101
ESB26	XAX10	0	-	-	102
ESB12	XAX10	0	-	-	103
ESB1/6etc	XAX10	0	-	-	104
ESB7	XAX10	0	-	-	105
ESB18	XAX10	0	-	-	106
ESB9	XAX10	0	-	-	107
ESB40	XAX10	0	-	-	108
SB21/33/31	XAX10	0	-	-	109

名称	文库	等级 (ECL)		PTmAB BIAcore K _D ^{Rel} (μM)		SEQ ID NO.
		PTmAb0005	PTmAb0005	PTmAb0005	PTmAb0011	
ESB32	XAX10	0	-	-	-	110
ESB4/35	XAX10	0	-	-	-	111
ESB24	XAX10	0	-	-	-	112
ESB13	XAX10	0	-	-	-	113

表 7—根据亲和性和初次噬菌体展示生物淘选鉴定的 PTmAb0011 肽配体

人 IgE Cε2 EDGQVMDVD (SEQ ID NO. 1)

名称	文库	序列	等级 (ECL)		PTmAb BIAcore K _D ^{Rel}	SEQ ID NO.
			PTmAb0011	PTmAb0011 (μM)		
EEC39/50/129	XCX15	SCREVLGGSEMIMDCE;	1611	2.4	>1000	114
EEC131	XCX15	SCPAFPREGDLCAPPTV;	910	42	>1000	115
EEC147	XCX15	FCPEPICSPPLSRMTLS;	883	-	-	116
EEC40	XCX15	ECNQNLGSLRHVDLNC;	547	-	-	117
EEC115/3/48	XCX15	RCDQQLPRDSYTFMMS;	438	-	-	118
EEC36	XCX15	HCQQVFFPQDYLCWQRG;	158	-	-	119
EEC17/47/25	XCX15	DCEEPMCSVLLQKLP;	147	-	-	120
EEC40A	XCX15	NCQDQMLREDAGCWSKI;	80	-	-	121
EEC51/48/53	XCX15	HCEEPEYSPATRVFCGR;	75	-	-	122
EEC2/23/44/132	XCX15	DCDWINPPDPHFVKDT;	33	7	>600	123
EEC41	XCX15	ACFSRNGQVTDVPHSCY;	31	-	-	124
EEC135	XCX15	KCPTYKPNDRCLWVP;	19	-	-	125
EEC116	XCX15	YCPKYPLEGDCLLDNDY;	4	-	-	126
EEC21/19	XCX15	RCEEWLCIPPAPAFAPP;	3	27.8	14.9	127
EEC55	XCX15	TCGQSELRCASLETHV;	0	-	-	128
EEC5	XCX15	NCNDNPMLDCMPAWSS;	0	-	-	129
EEB33	XAX10	DALDERA WRARA;	15	117	>600	130
EED183	XCX10	SCQGREVRRECW;	596	-	-	131
EED35/53/164	XCX10	VCDECVSRELAL;	330	-	-	132

名称	文库	等级 (ECL)	PTmAb BIAcore K _D ^{Rcl}		SEQ ID NO.
			PTmAb0011	PTmAb0011 PTmAb0005 (μ M)	
EED38	XCX10	330	-	-	133
EED147/173	XCX10	281	-	-	134
EED35/53/164	XCX10	118	-	-	135
EED36	XCX10	52	-	-	136
EED131/138/102	XCX10	32	-	-	137
EED18/47/48	XCX10	31	-	-	138
EED132	XCX10	28	-	-	139
EED139	XCX10	26	-	-	140
EED134	XCX10	14	-	-	141
EED33	XCX10	7	-	-	142
EED50	XCX10	6	-	-	143
EED34/104	XCX10	3	-	-	144
EED41/56	XCX10	0	-	-	145
EED51	XCX10	0	-	-	146
EED57	XCX10	0	-	-	147

表 8 -对 PTmAb0005 和 PTmAb0011 亲和性改进的 IgEC67 突变体

得自所述原始序列的突变体以蓝色显示

5 人 IgE Cε2 EDGQVMDVD (SEQ ID NO. 1)

名称	PtmAb 等级	BIAcore K _D ^{Rel} (μM)		SEQ ID NO.
		0005	0011	
IgEC67	-	0.1	4.8	13
IgEC67-8	4.36	0.0094	0.066	12
IgEC67-10	4.2	-	-	148
IgEC67-1	4.1	-	-	149
IgEC67-2	3.2	-	-	150
IgEC67-3	3	-	-	151
IgEC67-12	3	-	-	152
IgEC67-9	2.7	-	-	153
IgEC67-4	2.4	-	-	154
IgEC67-5	1.9	-	-	155
IgEC67-6	1.9	-	-	156
IgEC67-11	1.8	-	-	157
IgEC67-14	1.2	-	-	158
IgEC67-13	1.1	-	-	159
IgEC67-7	1	-	-	160

表 9 -对 PtmAb0005 亲和性改进的 IgEC67-8 突变体

人 IgE Cε2 EDGQVMDVD (SEQ ID NO. 1)

克隆		相对等级 A	相对等级 B	SEQ ID NO.
IgEC67-8	GCFINKQMADLELCPRE	1.00	1.00	12
对 PtmAb0005 亲和性改进的突变体				
1-3	ADGAGCFINQMADQELCPRAAAEA;	1.73	1.31	161
2-13	ADGAGCFINKQMSDFELCPREAGEA;	1.56	2.14	162
3-11	ADGAGCFINKQMADLELC TREAAEA;	1.54	2.02	163
3-1, 3-9, 3-10	ADGAGCFINKQMADLELCPRQAAEA;	1.54	1.85	164
1-11	ADGAGCFINQMADLELCPRGGAEA;	1.45	1.32	165
2-15	ADGAGCFINKQMADWELCPREGAEA;	1.44	1.57	166
4-9	ADGAGCFINKQMADLELCPSQAAEA;	1.38	1.70	167
1-4, 1-2, 1-12	ADGAGCFINKQMADLELCPRREGAEA;	1.37	1.39	168
5-16	ADGAGCFINKQMADSELCPREPAAEA;	1.29	1.83	169
4-1	ADGAGCFIKKQMADLELCPREA WEA;	1.24	1.52	170
2-12	ADGAECFINKQMADREL CAREVAEA;	1.22	1.50	171
1-9, 2-5	ADGAGCFIDKQMADLELCPRAAEA;	1.21	1.41	172
2-9, 2-6	ADGAGCFINKQMADLELCRRREGAEA;	1.19	1.54	173
1-16	ADGAGCFKNQMVDSEL CARQAAEA;	1.14	1.17	174
1-5	ADGAGCFQNKQMADLELCPREAAEA;	1.13	1.73	175
4-2, 4-3	ADGAECFINKQRADLELC PGEAAEA;	1.11	1.60	176
1-10	ADGAGCFINKQMADSELCPAAAAEA;	1.10	1.08	177

克隆	相对等级 A	相对等级 B	SEQ ID NO.
对 PTmAB0005 亲和性相似的突变体			
5-11	1.09	1.97	178
1-8	1.08	1.32	179
5-10	1.05	1.83	180
5-2	1.04	1.24	181
1-1	1.04	1.29	182
2-3	1.03	1.31	183
2-8, 1-13, 4-11, 1-14	1.00	1.00	184
1-6	0.95	1.16	185
1-7	0.91	1.25	186
2-11, 2-4, 2-10, 2-7	0.79	1.39	187
4-4	0.69	1.03	188
对链霉抗生物素蛋白具有亲和性的突变体			
6-9, 5-1, 6-2, 6-8, 6-4	1.53	1.19	189
6-12, 5-8	0.93	0.67	190
6-10	0.91	0.69	191

说明书附图

图 1 用 Padlan 和 Davies 1986 模型的 IgE 氨基酸表面暴露

残基	表面面积	平均/5		
		>50	>80	
ARG_1	270.322723			
ASP_2	139.374542			
PHE_3	64.298927	117.361489	1	1
THR_4	46.170193	64.494911	1	0
PRO_5	66.64106	39.0209532	0	0
PRO_6	5.989833	29.3644934	0	0
THR_7	12.004753	21.4426604	0	0
VAL_8	16.016628	8.6200336	0	0
LYS_9	6.561028	10.2708042	0	0
ILE_10	2.527926	9.5044914	0	0
LEU_11	14.243686	13.375776	0	0
GLN_12	8.173189	19.2992118	0	0
SER_13	35.373051	29.1890154	0	0
SER_14	36.178207	32.6313328	0	0
CYS_15	51.976944	39.0100884	0	0
ASP_16	31.455273	45.6135238	0	0
GLY_17	40.066967	50.0871888	1	0
GLY_18	68.390228	46.9957994	0	0
GLY_19	58.546532	59.6253914	1	0
HIS_20	36.519997	63.4215874	1	0
PHE_21	94.603233	68.1998406	1	0
PRO_22	59.047947	65.8523506	1	0
PRO_23	92.281494	62.0824146	1	0
THR_24	46.809082	50.1635586	1	0
ILE_25	17.670317	38.6392736	0	0
GLN_26	35.008953	21.6261078	0	0
LEU_27	1.426522	12.5259452	0	0
LEU_28	7.215665	10.5518628	0	0
CYS_29	1.308269	3.5500722	0	0
LEU_30	7.799905	4.8164434	0	0
VAL_31	0	4.0672202	0	0
SER_32	7.758378	3.8055664	0	0
GLY_33	3.469549	9.5755666	0	0
TYR_34	0	20.7786542	0	0
THR_35	36.649906	28.9967052	0	0
PRO_36	56.015438	50.2230378	1	0
GLY_37	48.848633	57.590085	1	0
THR_38	109.601212	73.50021	1	0
ILE_39	36.835236	70.1846368	1	0
ASN_40	116.200531	73.2560022	1	0
ILE_41	39.437572	51.7217026	1	0
THR_42	64.20546	49.2710734	0	0
TRP_43	1.929714	35.2314448	0	0
LEU_44	24.58209	49.7665942	0	0
GLU_45	46.002388	50.9119188	1	0
ASP_46	112.113319	74.3084848	1	0
GLY_47	69.932083	91.0816862	1	1
GLN_48	118.912544	85.9516244	1	1
VAL_49	108.448097	91.6210626	1	1

P5
P5
P5
P5
P5
P5

P6
P6
P6
P6
P6

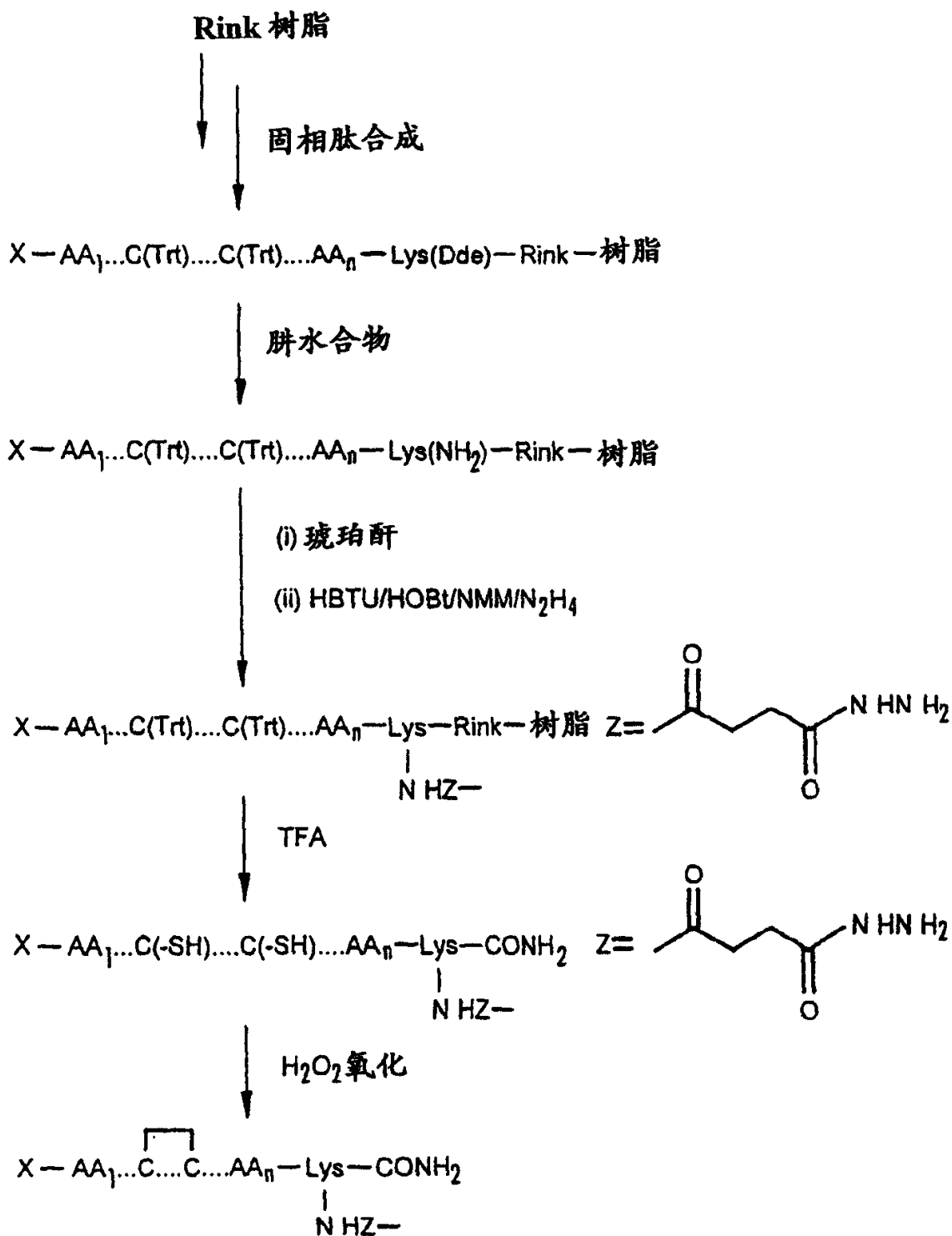
PE

MET_50	20.352079	89.4386316	1	1
ASP_51	140.46051	77.095856	1	0
VAL_52	59.019928	65.664336	1	0
ASP_53	57.198666	72.8180802	1	0
LEU_54	51.290497	45.9930286	0	0
SER_55	56.1208	49.3437382	0	0
THR_56	6.335252	47.723164	0	0
ALA_57	75.773476	43.8934994	0	0
SER_58	49.095795	51.656078	1	0
THR_59	32.142174	59.4056414	1	0
THR_60	94.933693	72.6291262	1	0
GLN_61	45.083069	73.3905916	1	0 P2
GLU_62	141.8909	99.7907822	1	1
GLY_63	52.903122	90.626043	1	1
GLU_64	164.143127	83.4067496	1	1
LEU_65	49.109997	57.2201384	1	0
ALA_66	8.986602	47.5504318	0	0
SER_67	10.957844	17.0083172	0	0
THR_68	4.554589	7.3021006	0	0
GLN_69	11.432554	7.2534874	0	0
SER_70	0.578914	5.0619186	0	0
GLU_71	8.743536	8.9567614	0	0
LEU_72	0	10.8120506	0	0
THR_73	24.028803	23.2812776	0	0
LEU_74	20.709	37.264713	0	0
SER_75	62.925049	69.375269	1	0
GLN_76	78.660713	79.6644746	1	0
LYS_77	160.55278	78.1594206	1	0
HIS_78	75.474831	77.9196576	1	0
TRP_79	13.18373	76.6092892	1	0 P3
LEU_80	61.726234	70.354977	1	0
SER_81	72.108871	73.244224	1	0
ASP_82	129.281219	81.9731098	1	1
ARG_83	89.921066	69.9061278	1	0
THR_84	56.828159	58.6259284	1	0
TYR_85	1.391324	32.7696846	0	0
THR_86	15.707874	23.8688072	0	0
CYS_87	0	12.5031754	0	0
GLN_88	45.416679	24.6922706	0	0
VAL_89	0	22.314276	0	0
THR_90	62.3368	48.4045714	0	0
TYR_91	3.817901	45.5941352	0	0
GLN_92	130.451477	47.9061642	0	0
GLY_93	31.364498	62.7324992	1	0
HIS_94	11.560145	91.805003	1	1
THR_95	136.468475	85.5324108	1	1
PHE_96	149.18042	87.190961	1	1
GLU_97	99.088516	90.6138422	1	1
ASP_98	39.657249	75.8683994	1	0
SER_99	28.674551	62.1985202	1	0
THR_100	62.741261	62.538042	1	0
LYS_101	80.831024	61.892236	1	0
LYS_102	100.786125	65.3434144	1	0 P4
CYS_103	36.428219	66.2248162	1	0
ALA_104	45.930443	63.0386422	1	0
ASP_105	67.14827	64.611715	1	0

SER_106	64.900154	71.4769134	1	0
---------	-----------	------------	---	---

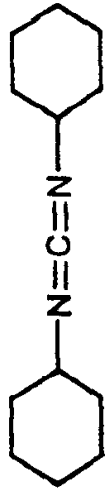
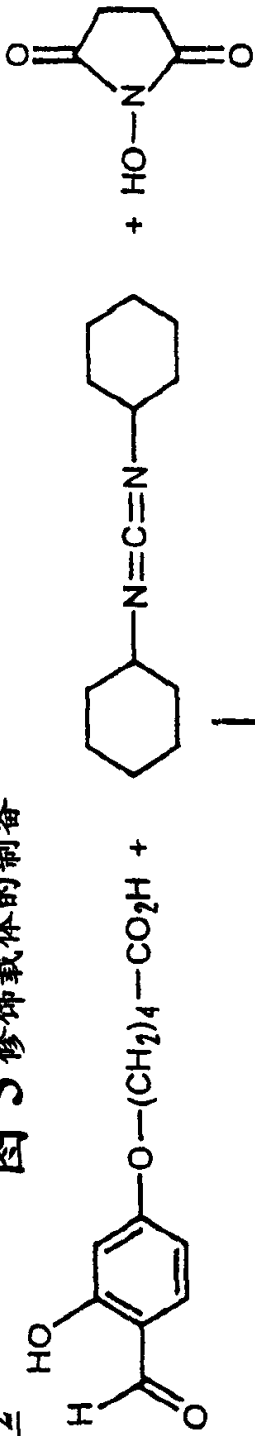
图 2 方案 1, 固相肽合成

方案 1

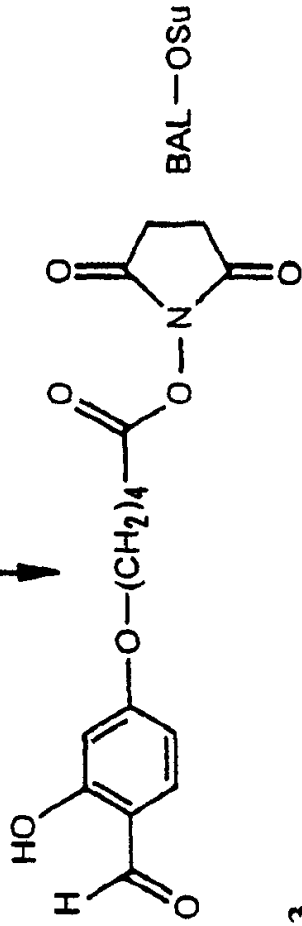


方案 2

图 3 修饰载体的制备



Dioxan



方案 3



40% DMSO/缓冲液
(pH 7.25, 0.2 M NaOAc)
2 hr.

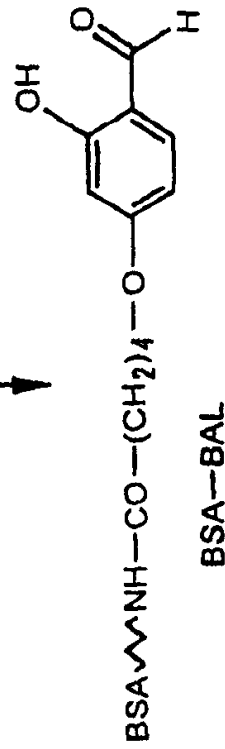


图 4 化学方案 4, 肽/载体缀合

方案 4

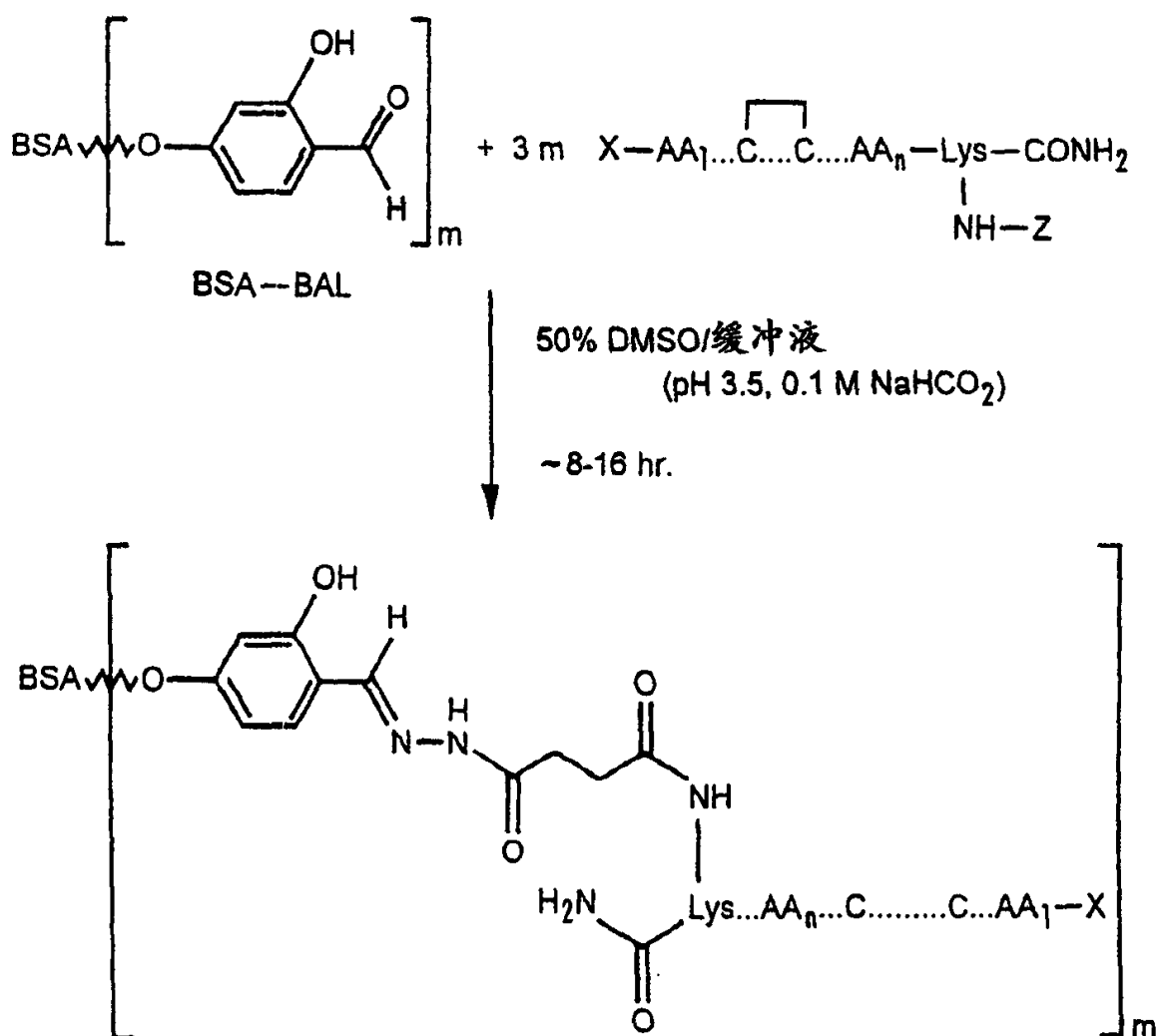


图 5 C67-8 抗 IgE 数据

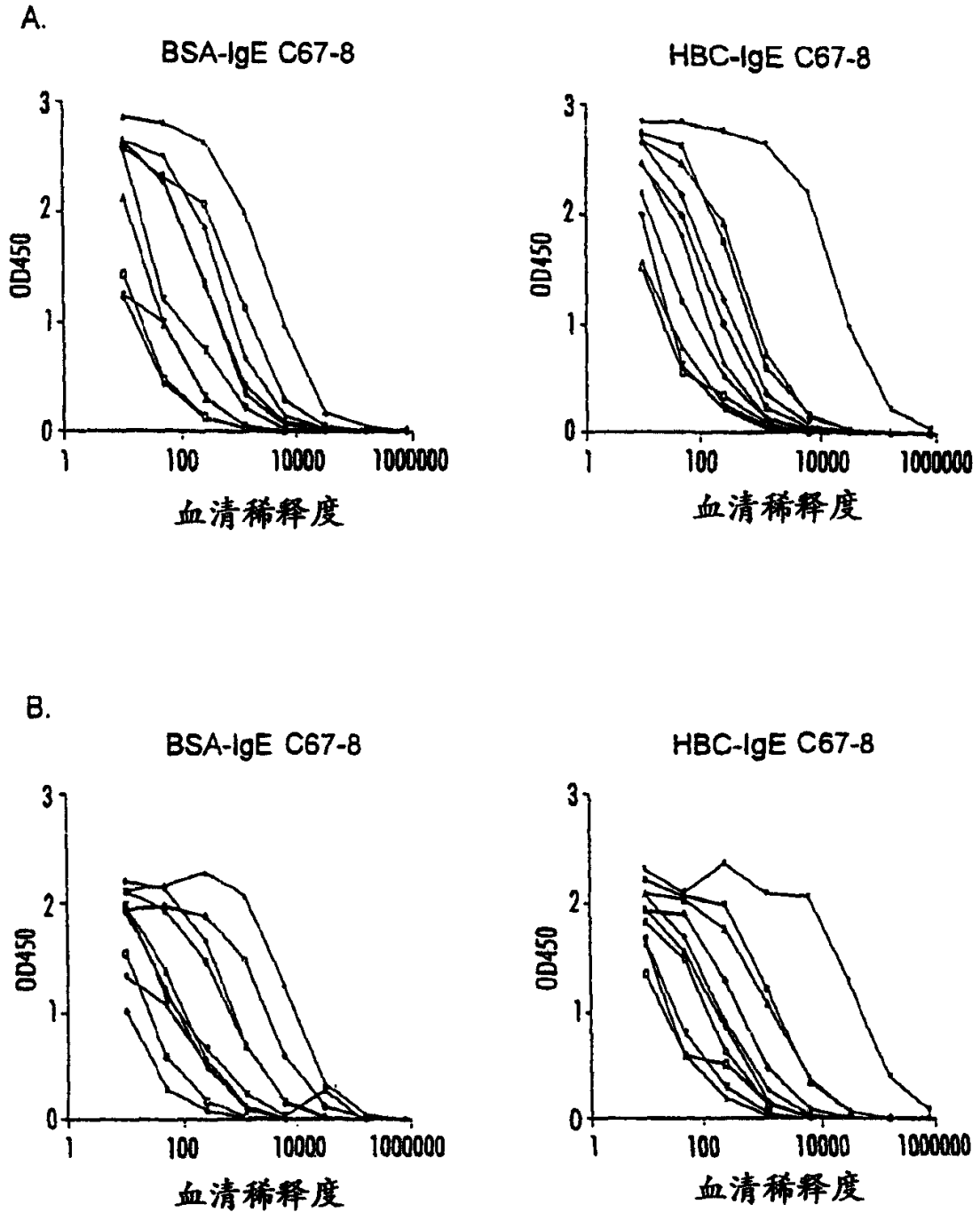


图 6 用可溶性 IgE 和 IgE C67-8 肽的竞争测定

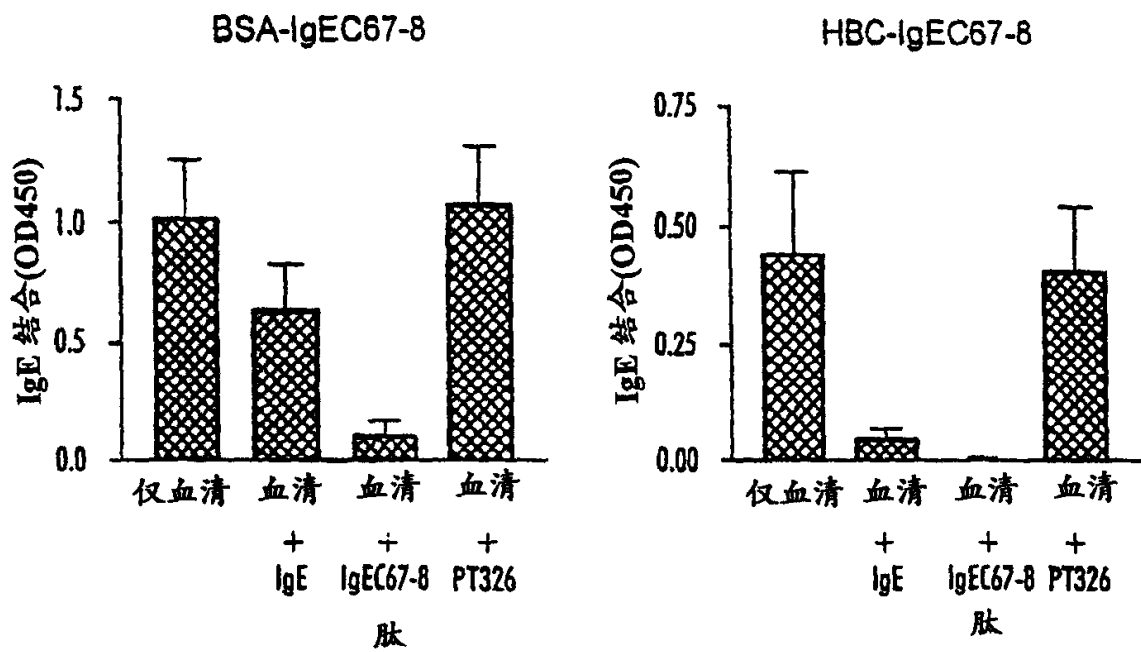


图 7 PT1079 抗 IgE 数据

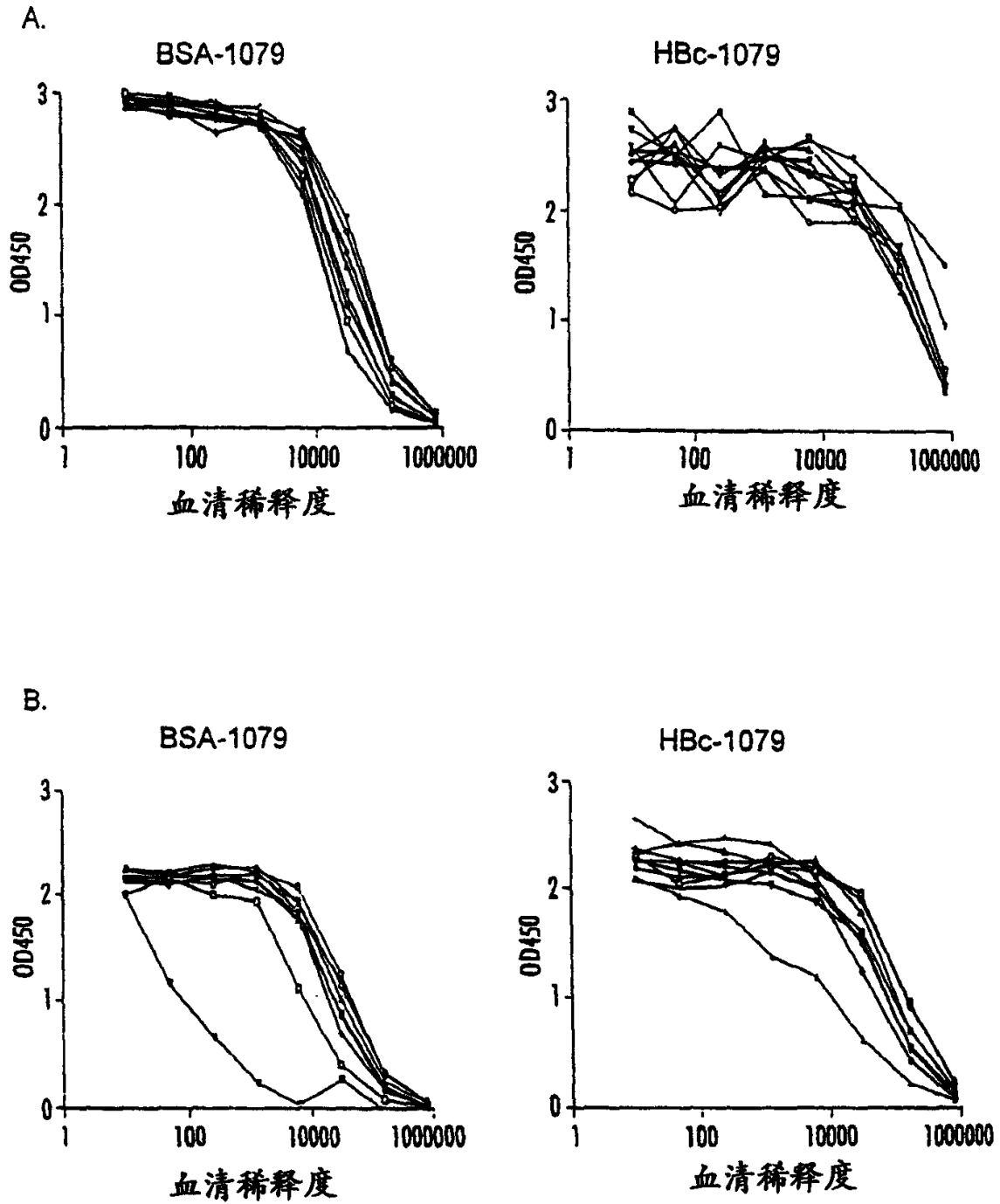


图 8 用可溶性 IgE 和 PT1079 肽的竞争测定

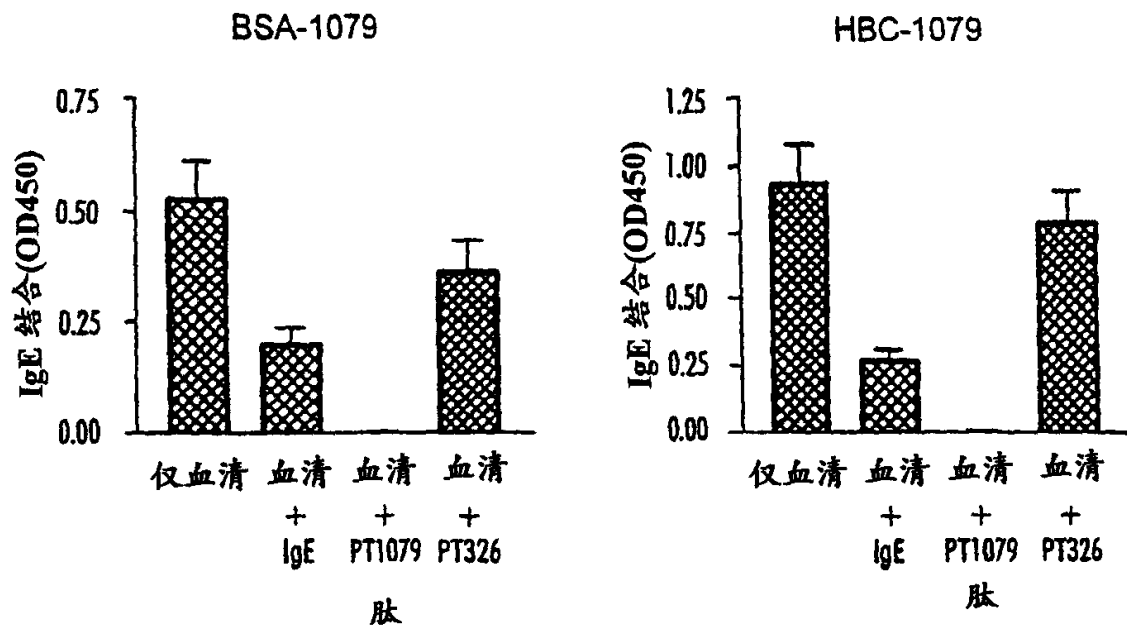


图 9 PT1078 抗 IgE 数据

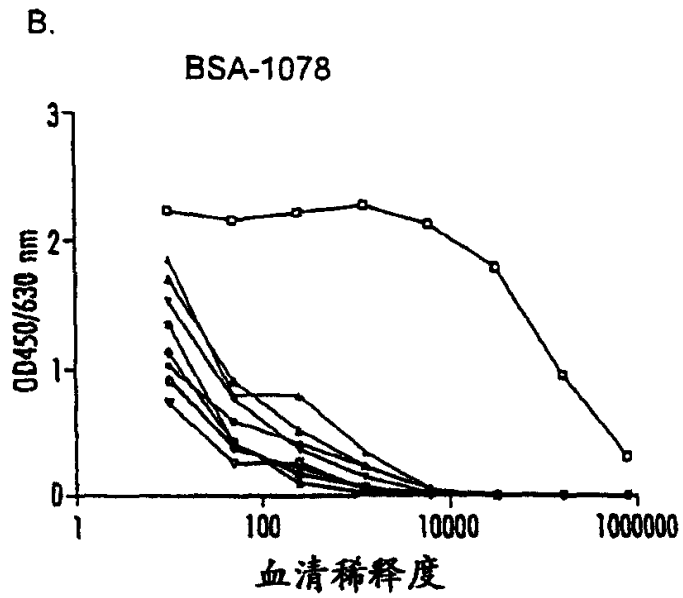
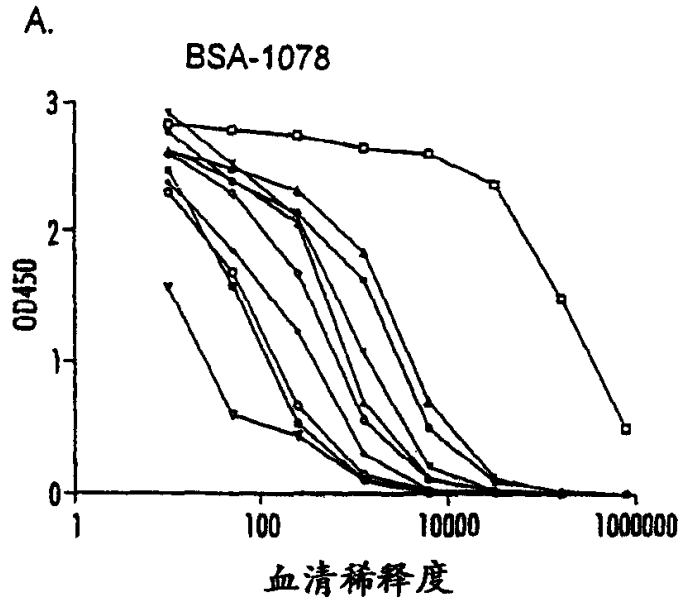


图 10 用可溶性 IgE 和 PT1078 肽的竞争测定

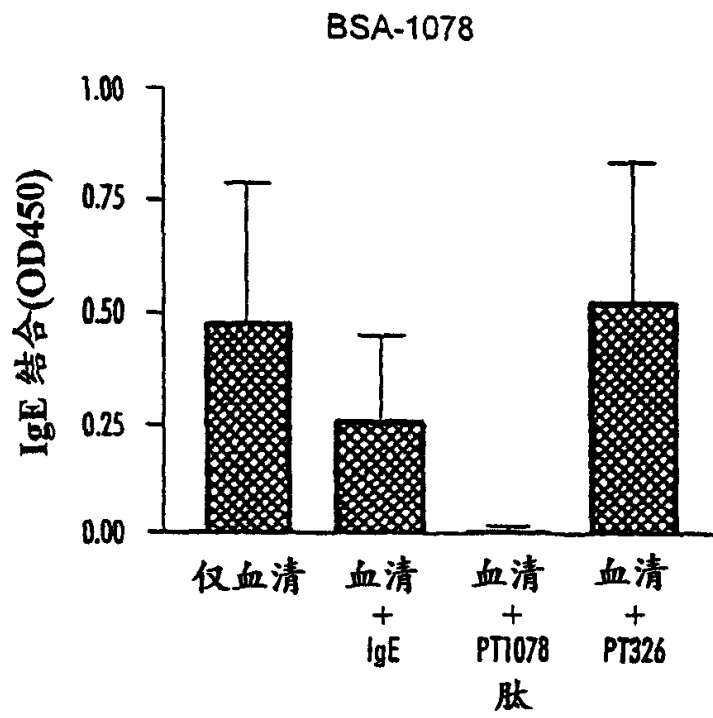


图 11 PT1079gs 抗 IgE 数据

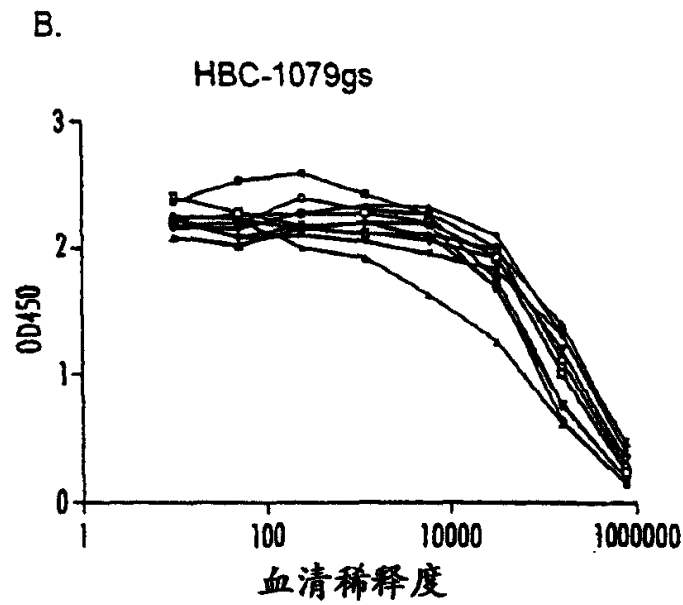
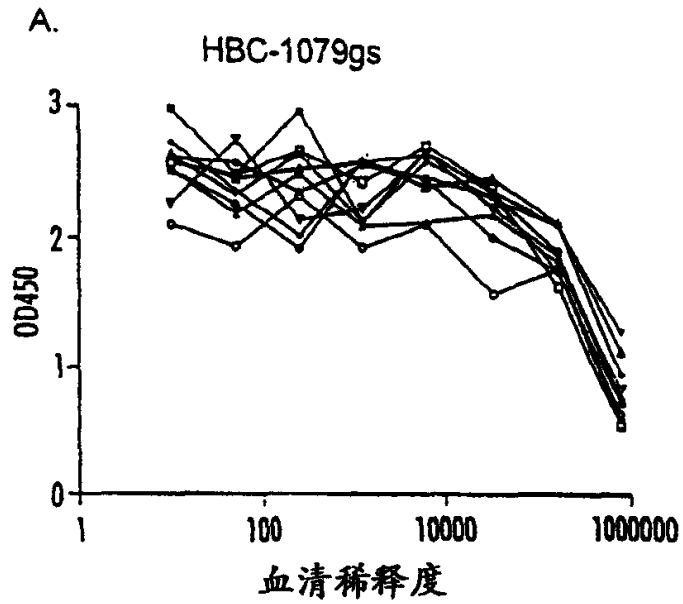


图 12 用可溶性 IgE 和 PT1079 肽的竞争测定

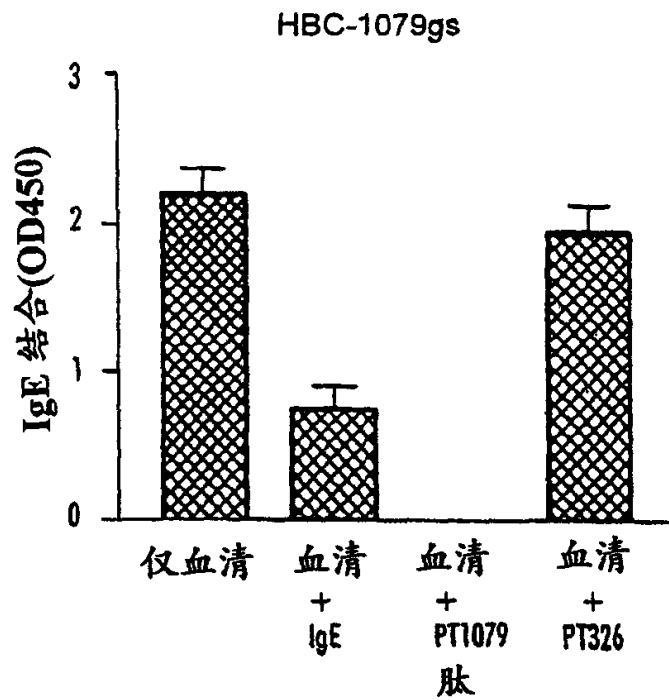


图 13 BSA-C67-8 诱导的小鼠抗血清的抑制活性

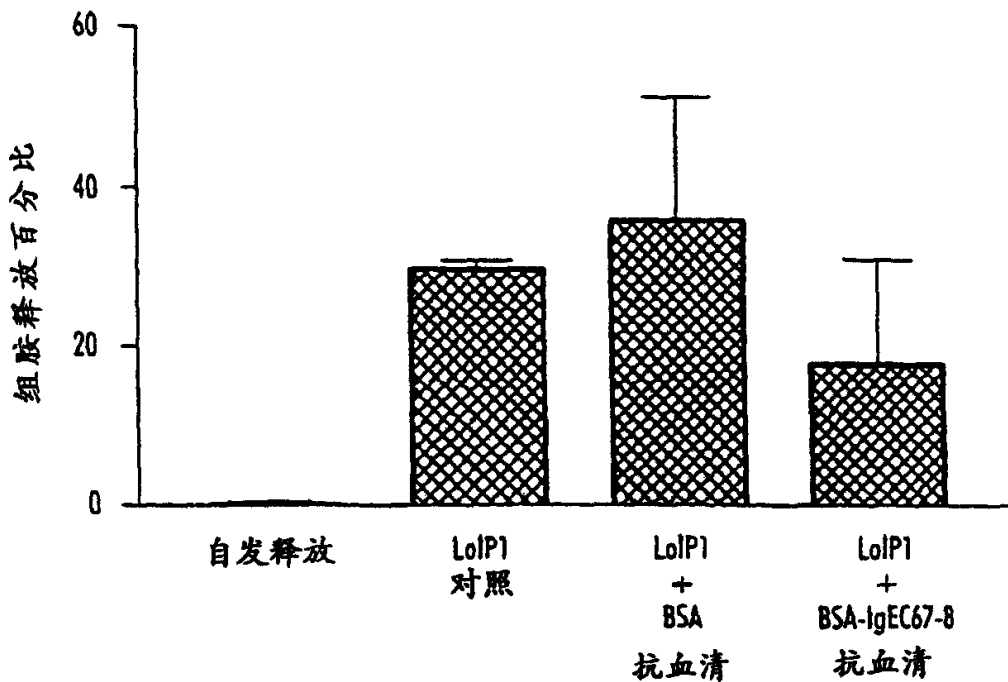


图 14 BSA-1078 和 BSA-1079 诱导的小鼠抗血清的抑制活性

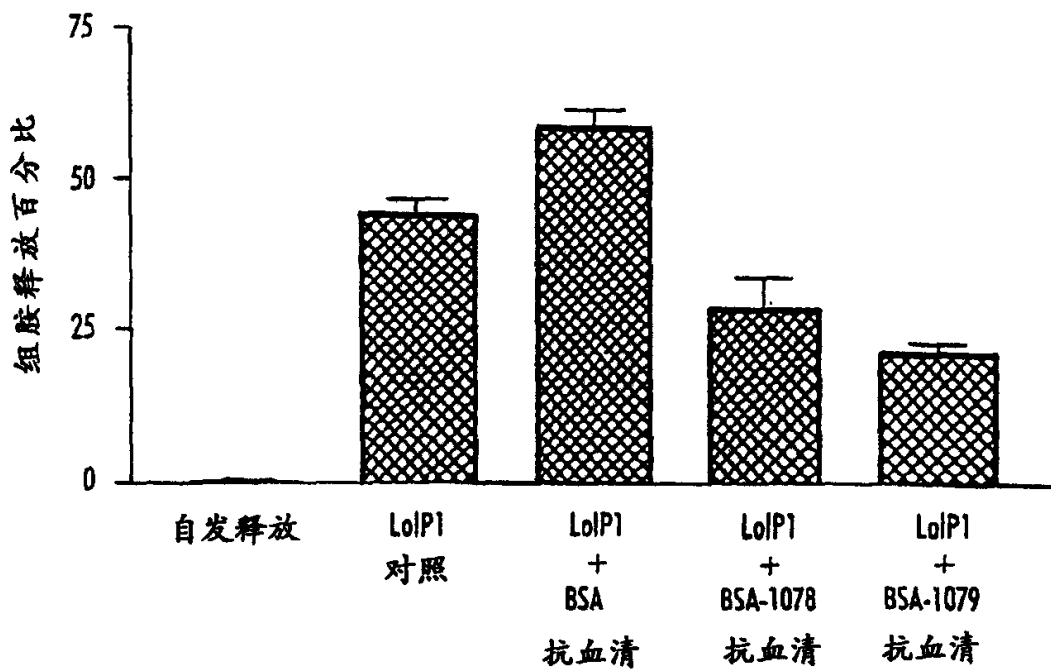


图 15 HBC-C67-8、HBC-1078、HBC-1079 和 HBC-1079gs 诱导的小鼠抗血清的抑制活性

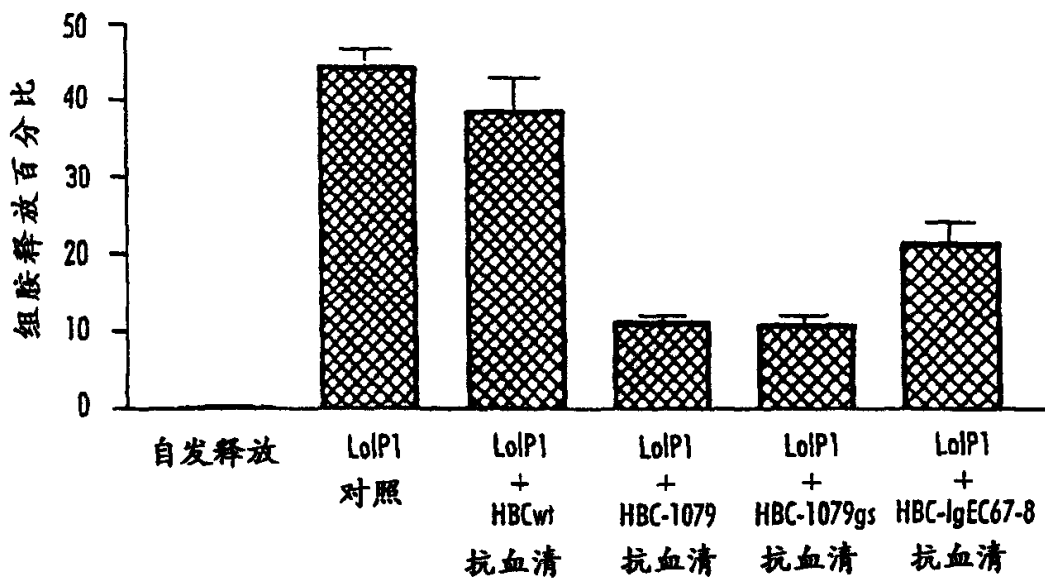


图 16 显示依赖于浓度的抗体 PTmAb0005 和 PTmAb0011 与 IgE 的结合。

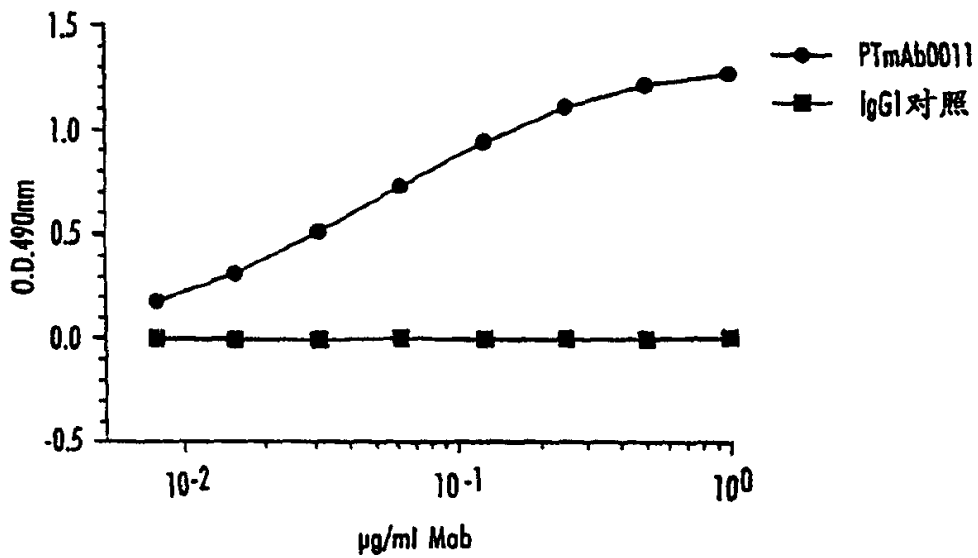
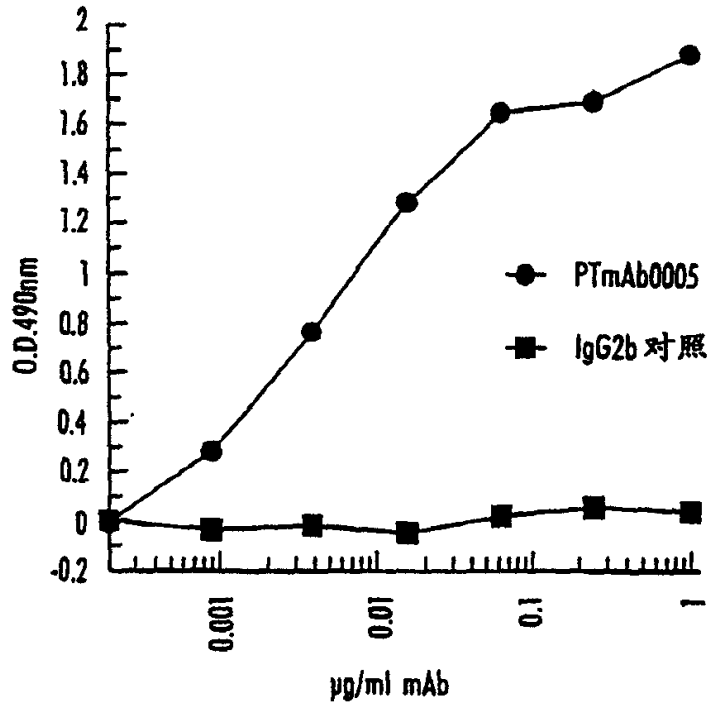


图 17 显示与对照相比的抗体 PTmAb0005 和 PTmAb0011 对 IgE 与 FcεR1α/IgG 构建体结合的浓度依赖性抑制。

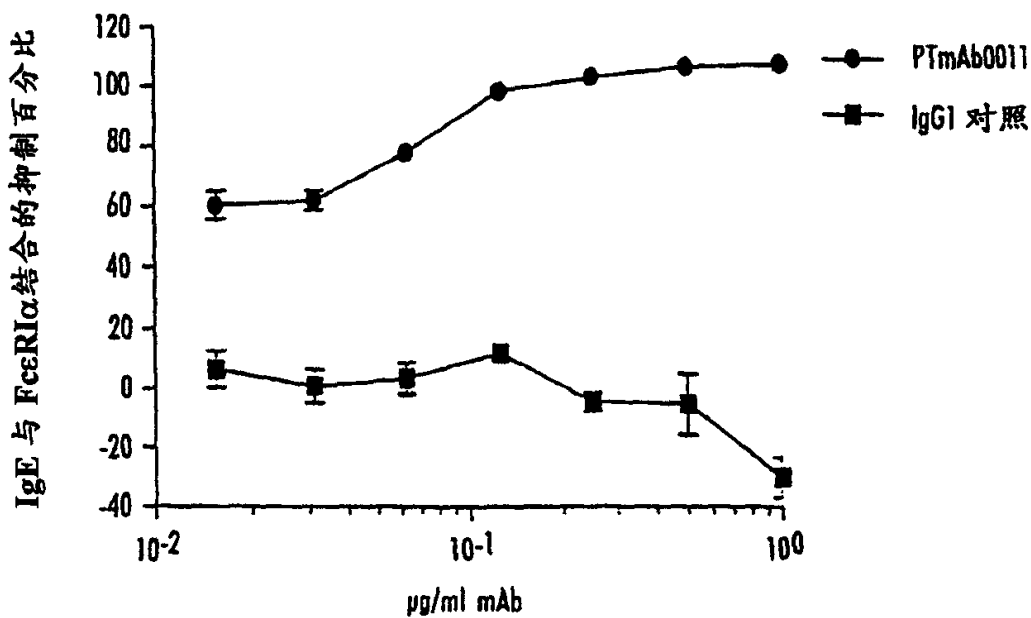
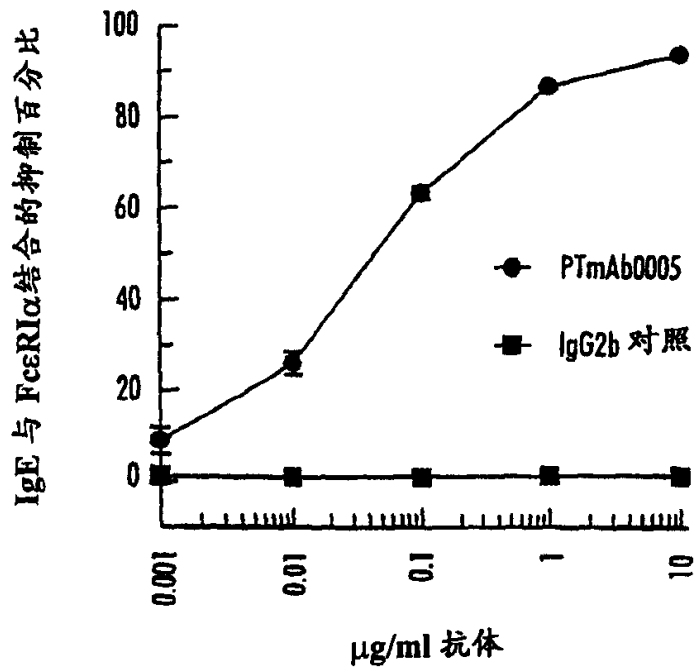


图 18 显示与对照比较的、抗体 PTmAb0005 对 IgE 与直接结合于塑料板的 FcεRIα 的修剪胞外域结合的浓度依赖性抑制。

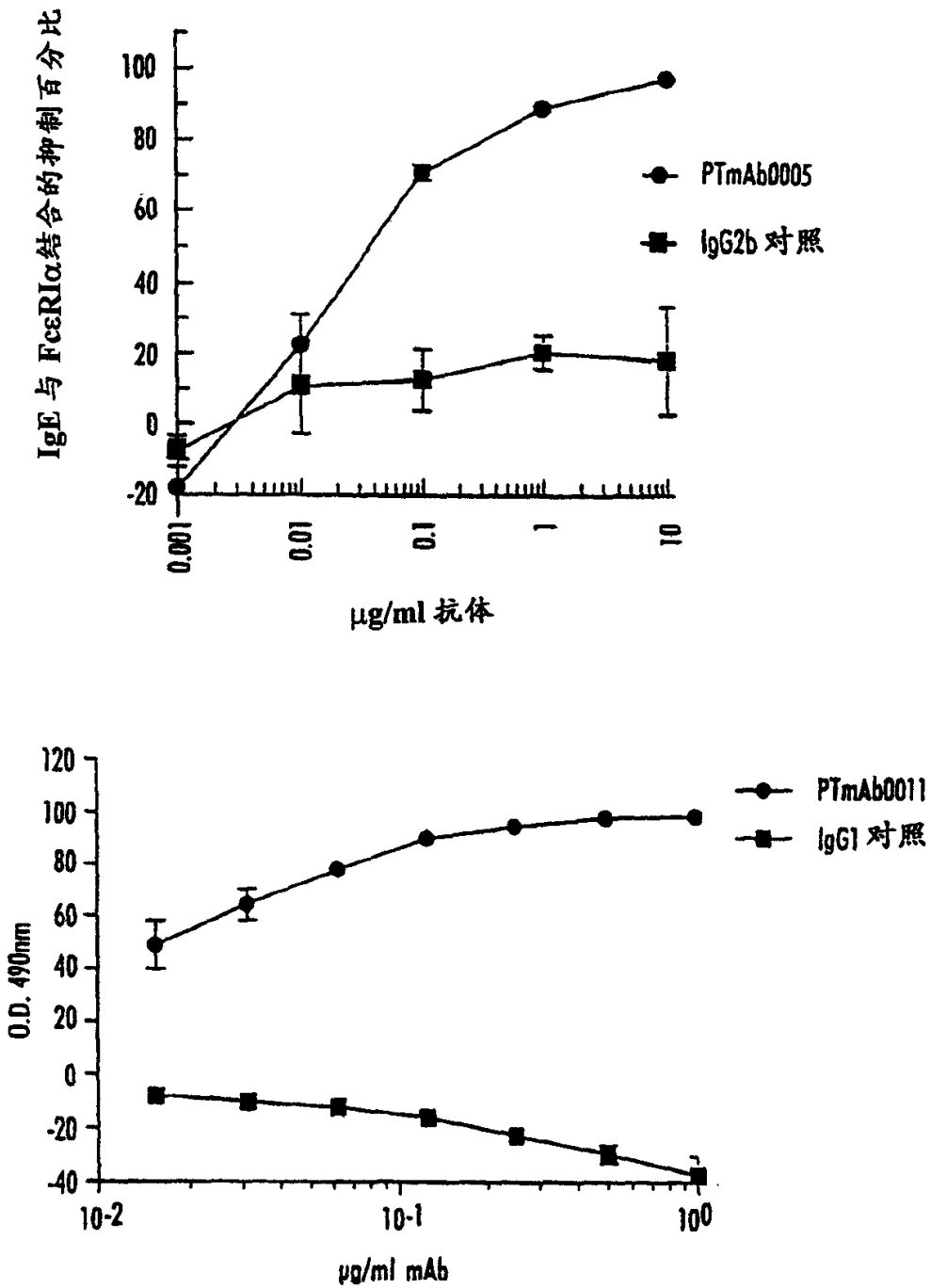


图 19 显示采用抗体 PTmAb0005 (GE-1)和 PTmAb0011 的 IgE 与 FcεRII (CD23)的结合.

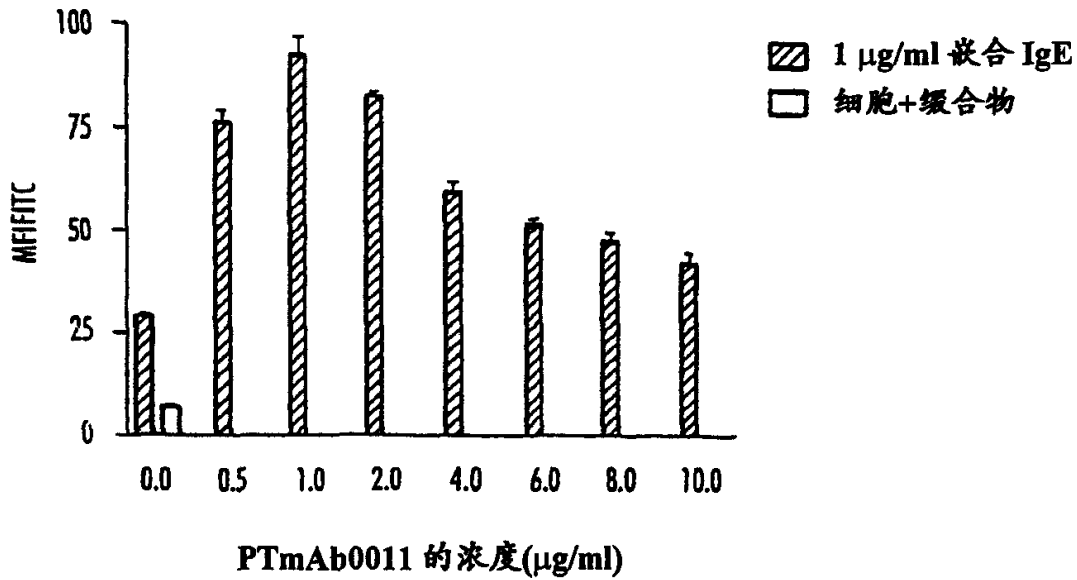
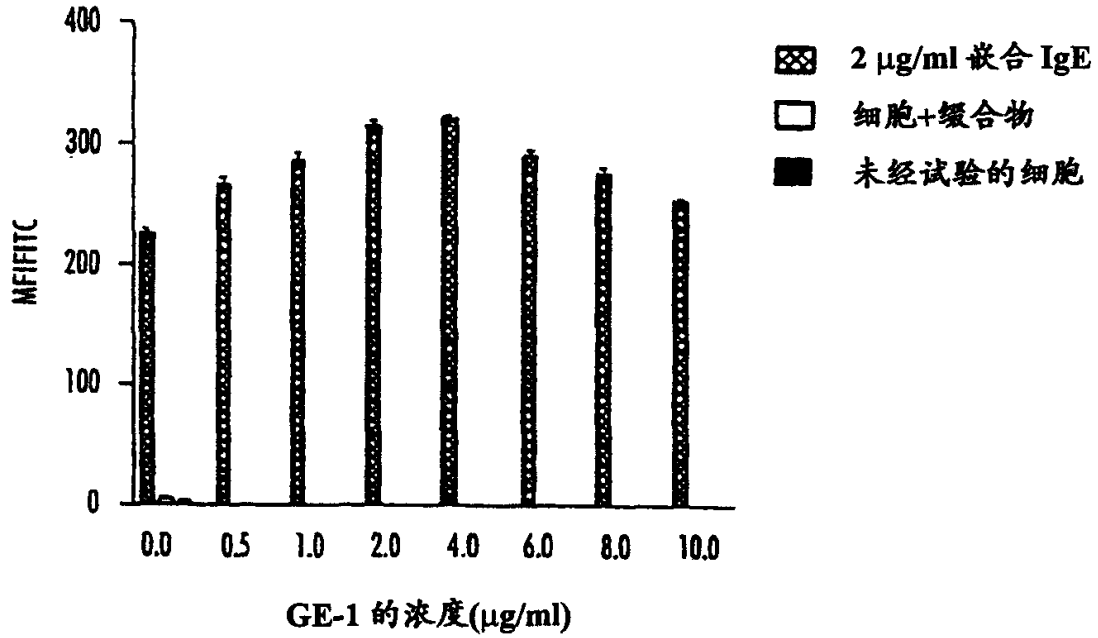


图 20 显示与对照比较的、抗体 PTmAb0005 和 PTmAb0011 对变应性人血嗜碱性粒细胞组胺释放的浓度依赖性阻断。

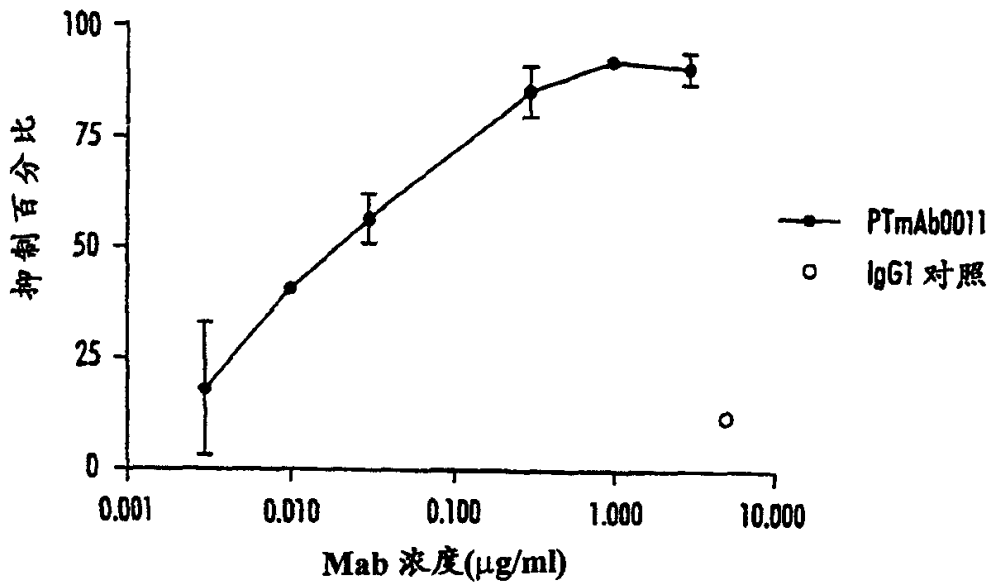
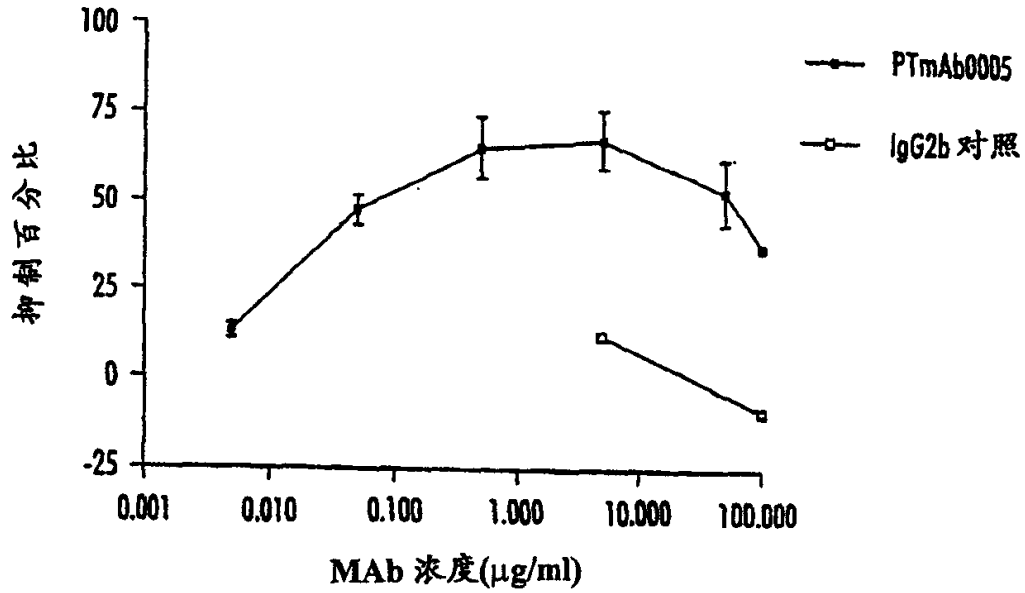


图 21

对变应性人嗜碱性粒细胞中 LolP1
触发的组胺释放的抑制

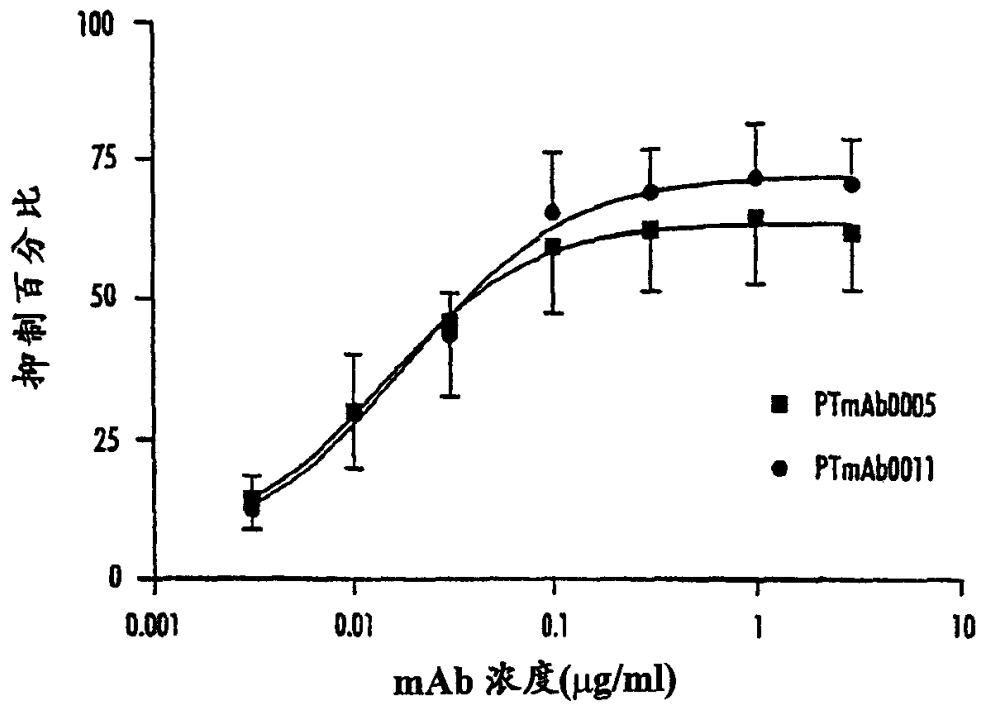
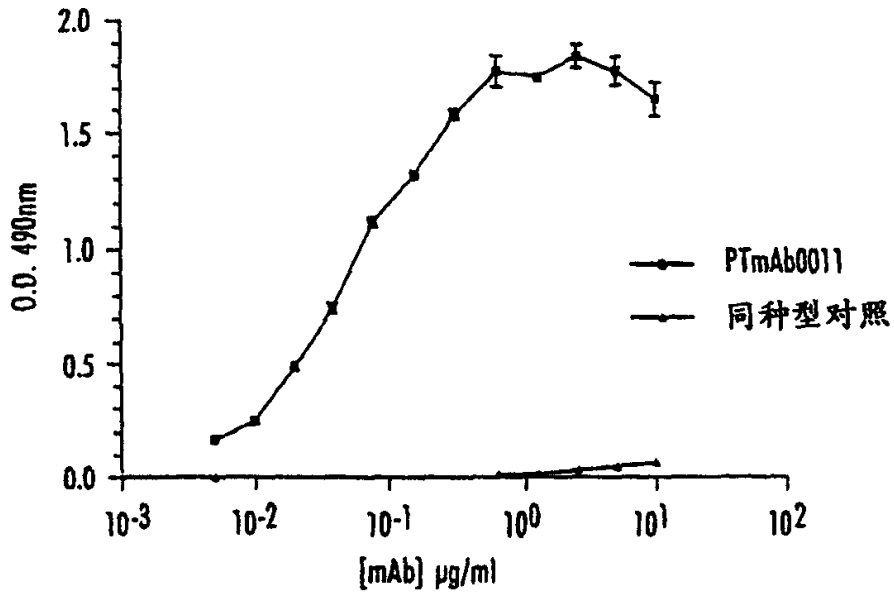


图 22 PTmAb0011 与不同 IgE 的结合

A. 嵌合 IgE



B. 与骨髓瘤 IgE 的结合

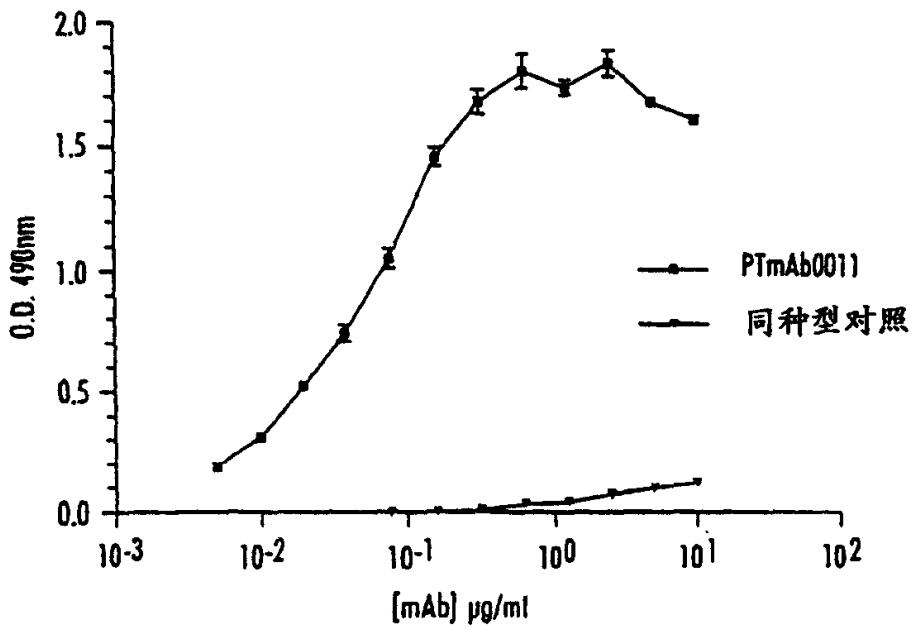
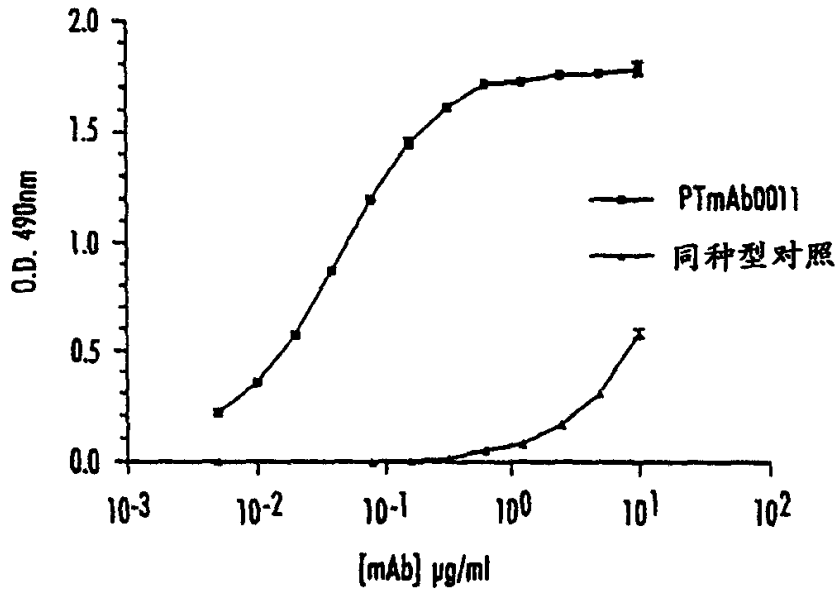


图 22

C. 与抗原定向 IgE 的结合



D. 与热变性 IgE 的结合

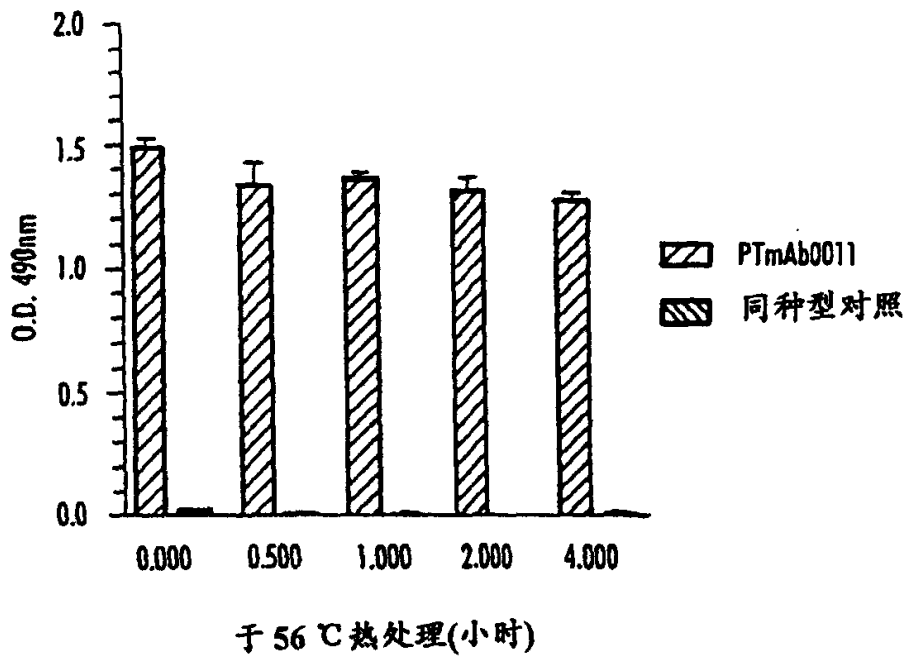


图 23 PTmAb0011 对 IgE 与 FcεR1a 结合的抑制

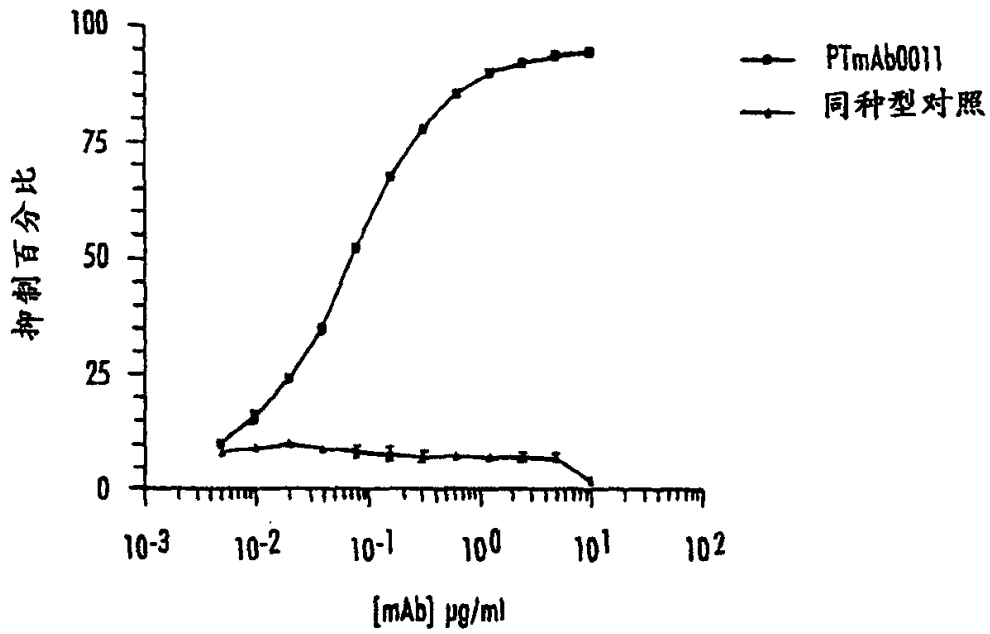


图 24 PTmAb0011 与受体结合 IgE 的结合

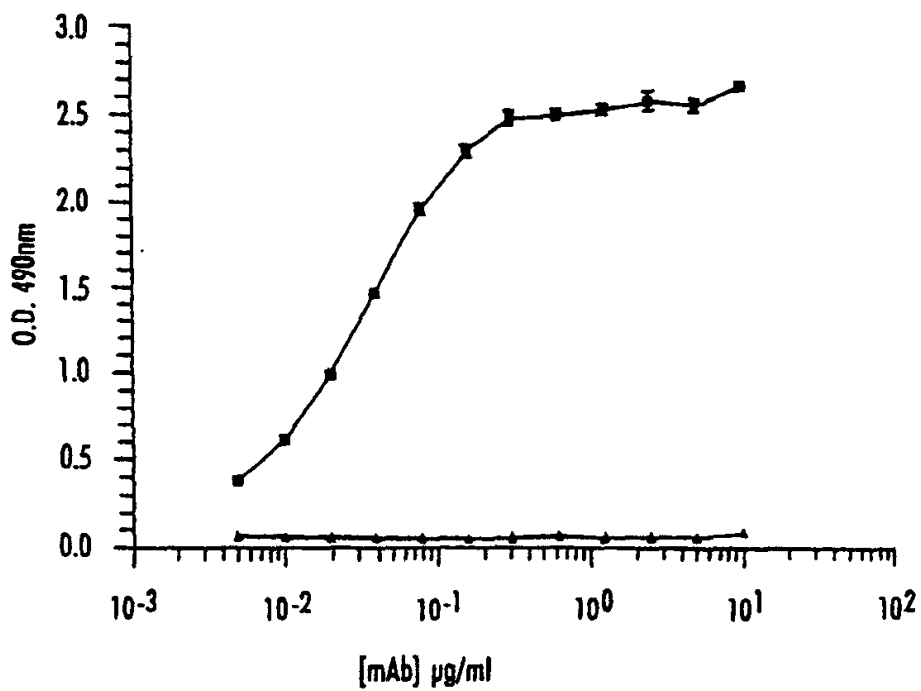


图 25 PTmAb0011 对 IgE 与 RPMI 8866 细胞上 FcεRII 结合的影响。

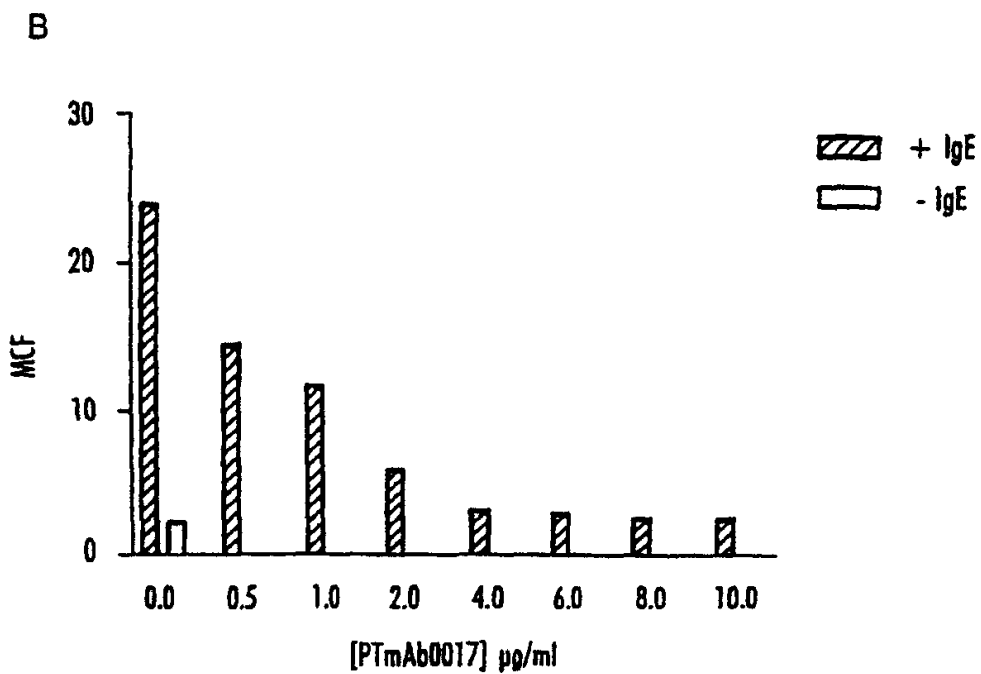
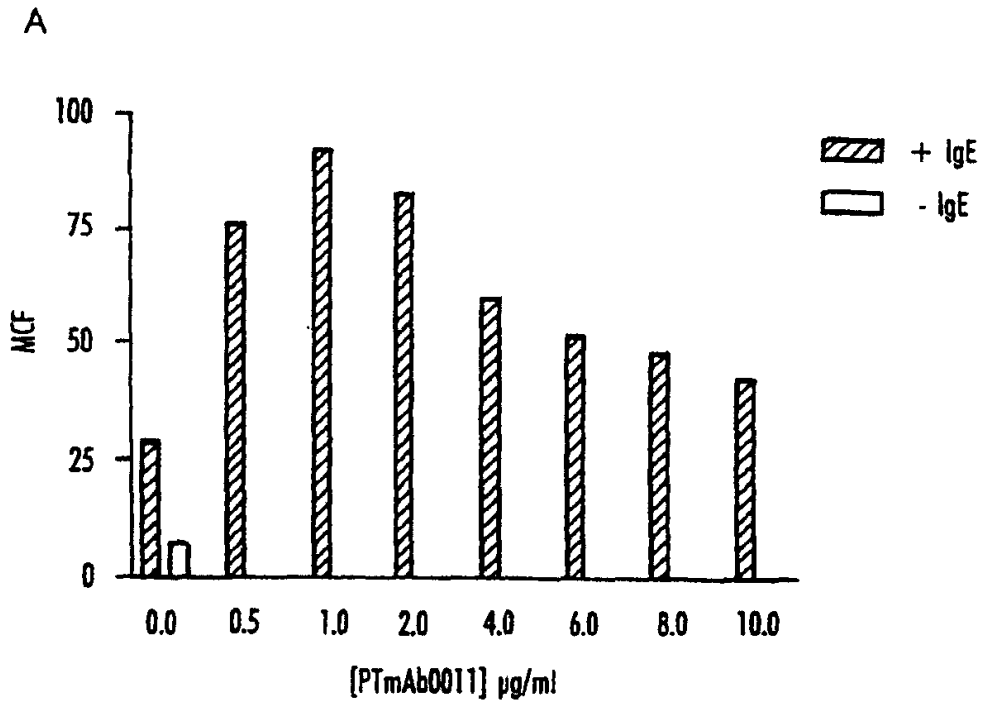


图 26 PTmAb0011 对 IgE 与原代人 B 细胞上 FcεRII 结合的影响

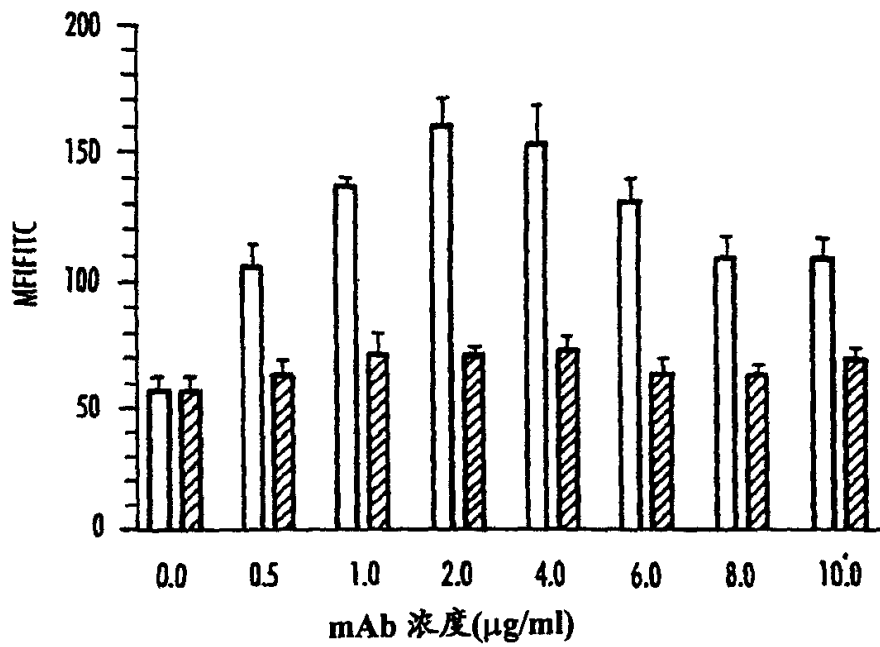


图 27 PTmAb0011 对原代人 B 细胞分泌 IgE 的影响

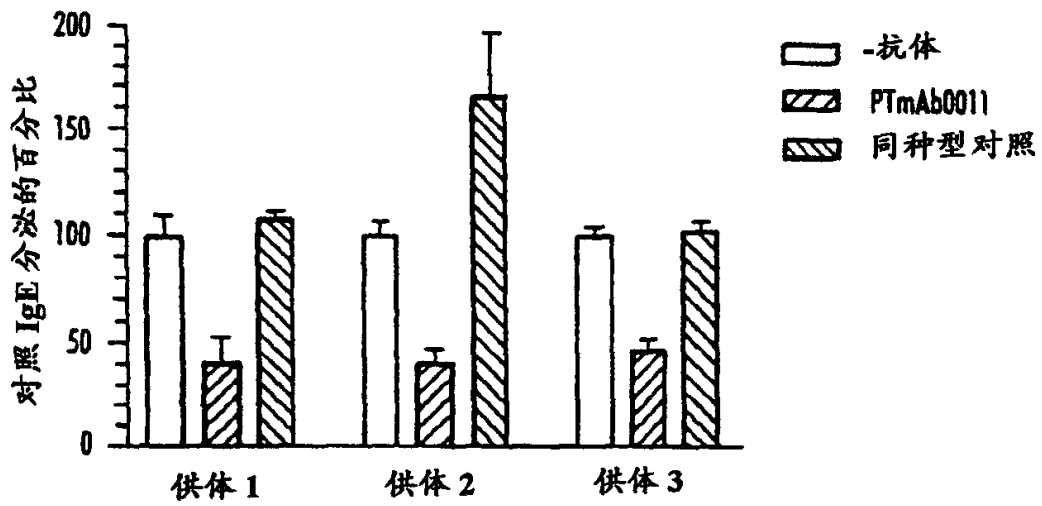


图 28 抗人 IgE 单克隆抗体在变应性(A)和非变应性(B)人嗜碱性粒细胞中的过敏原性

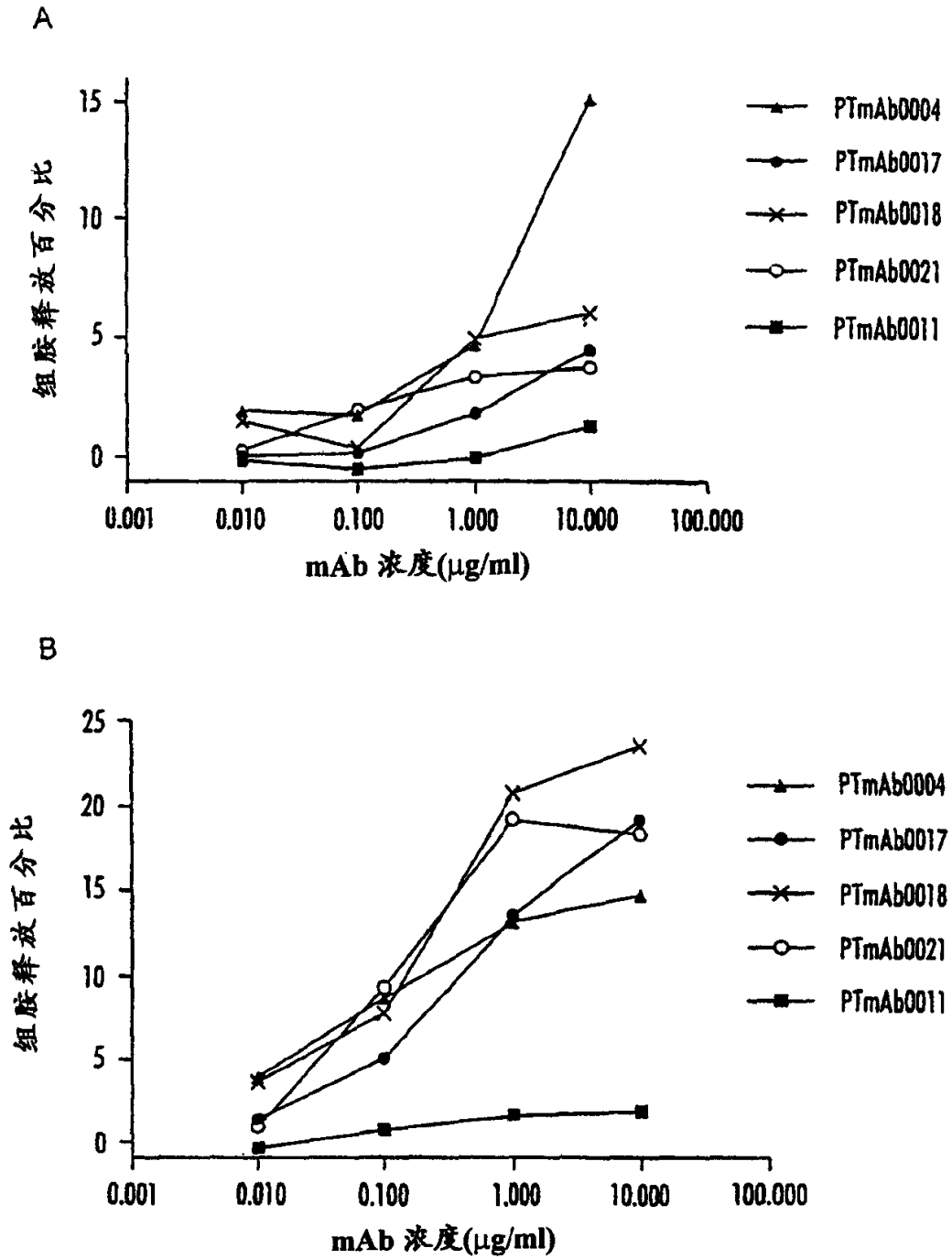


图 29 抗人 IgE 抗体在敏化(A)和非敏化(B)人肺肥大细胞中的过敏原性

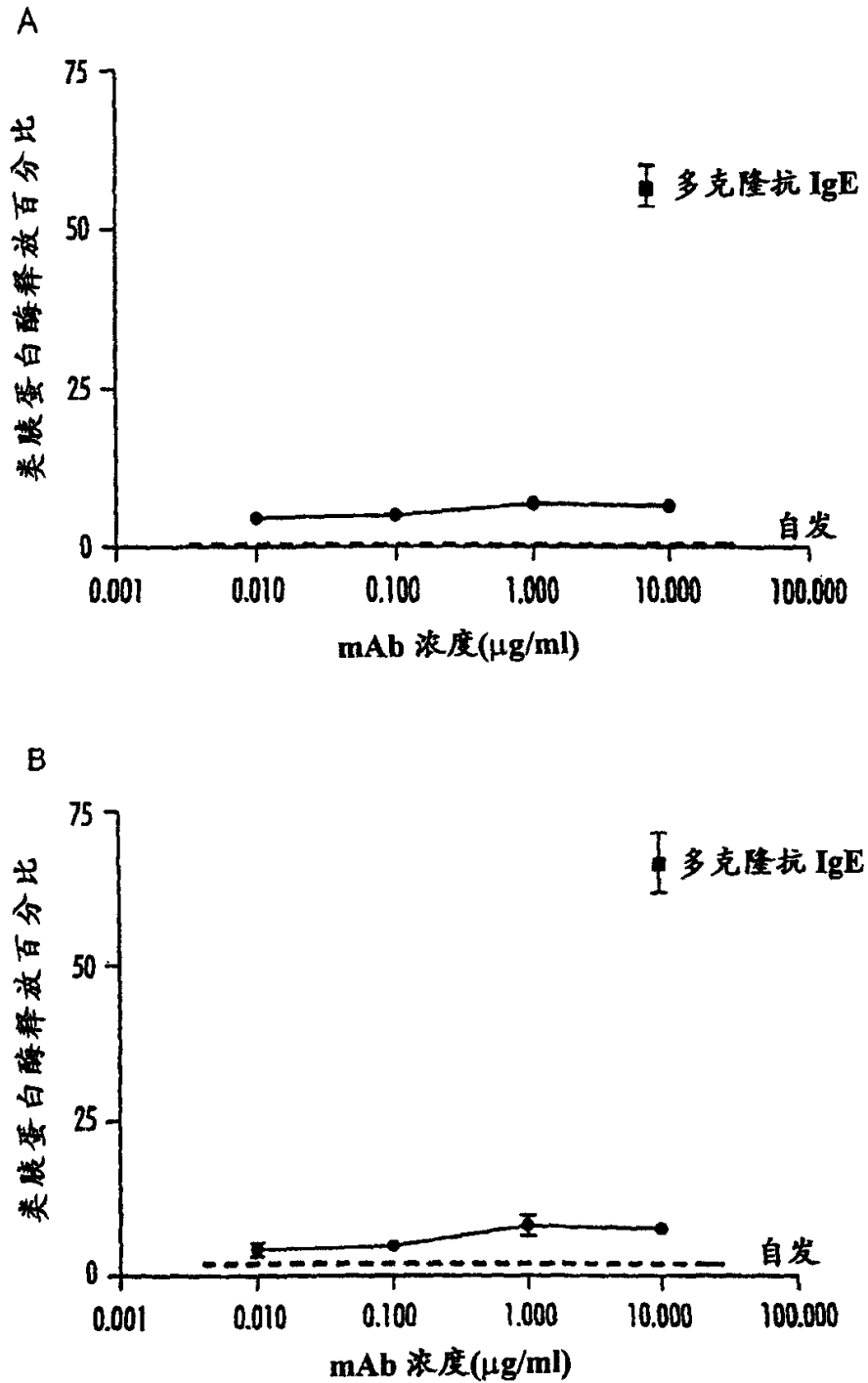


图 30 抗人 IgE 抗体在 RBL J41 细胞中通过人 FcεRI (A) 和小鼠 FcεRI (B) 的过敏原性

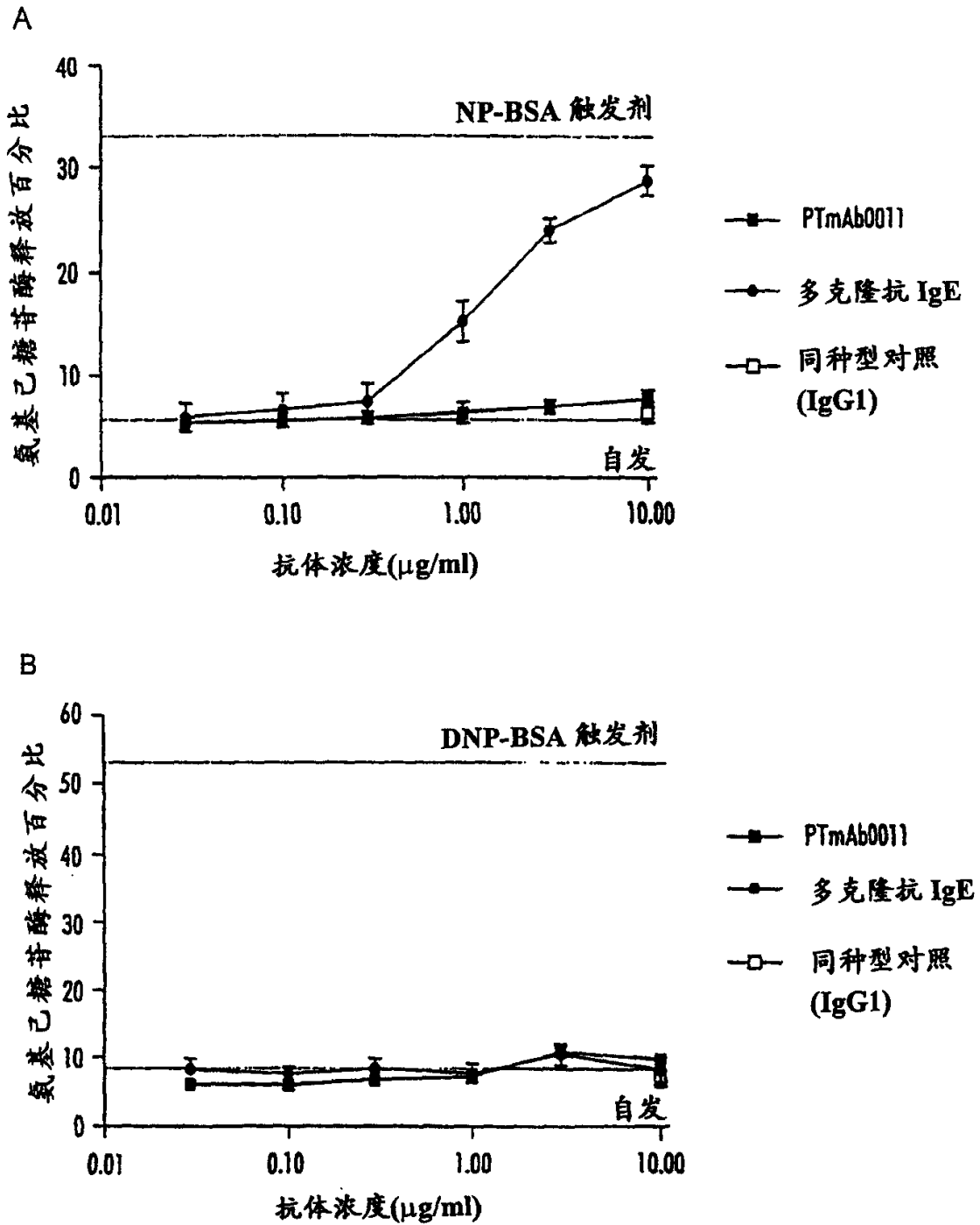


图 31 PTmAb0011 对人嗜碱性粒细胞中变应原触发的组胺释放的抑制

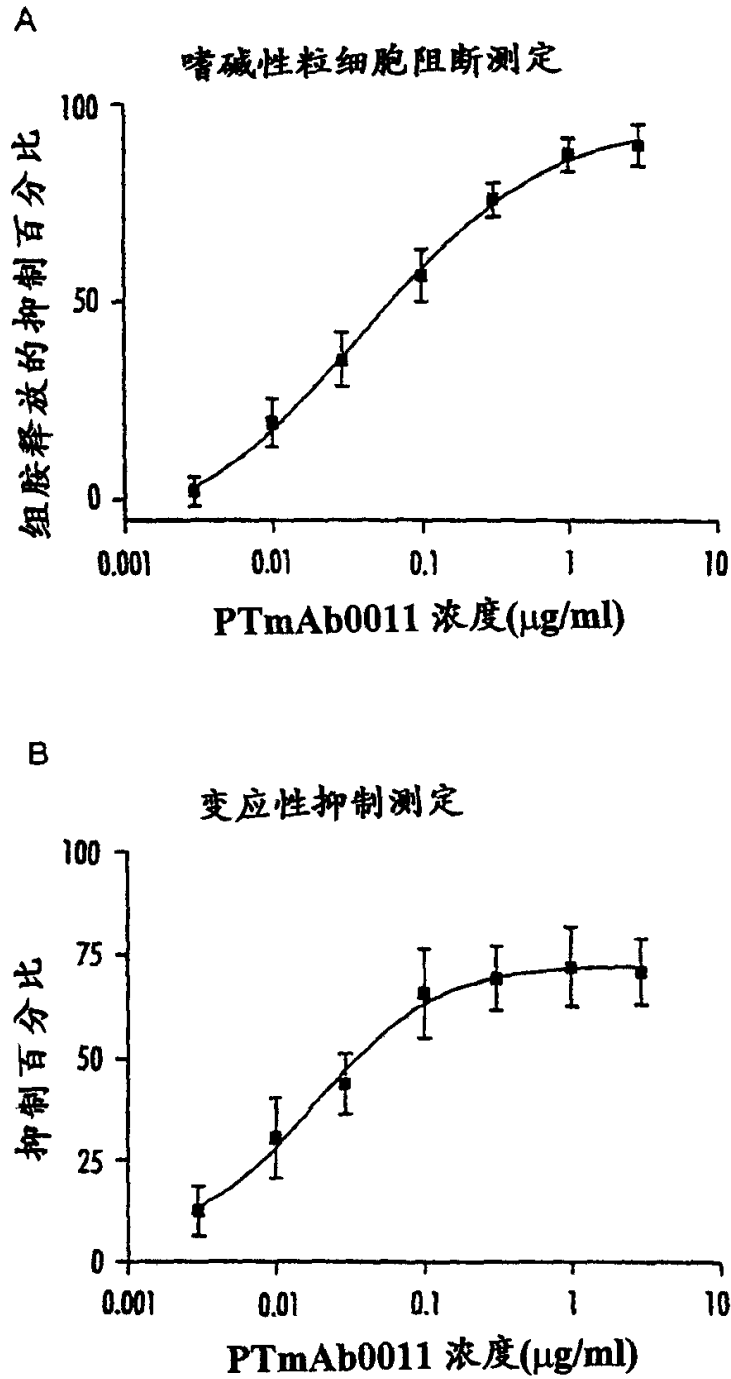
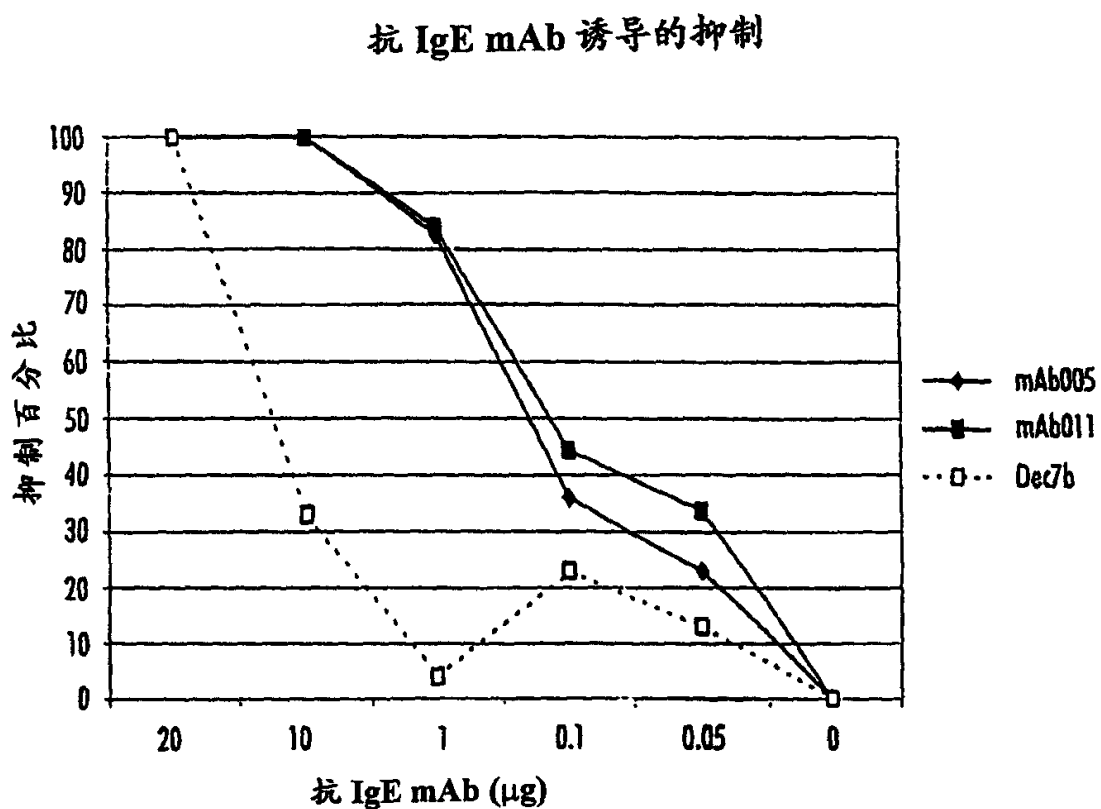


图 32 PTmAb0011 和 PTmAb0005 对猴皮肤中被动皮肤过敏反应的抑制



<210> 6
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列
 5
 <400> 6
 Pro Gly Thr Ile Asn Ile
 1 5
 10
 <210> 7
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列
 15
 <400> 7
 Phe Thr Pro Pro Thr
 1 5
 20
 <210> 8
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列
 25
 <400> 8
 Cys Leu Glu Asp Gly Gln Val Met Asp Val Asp Leu Leu
 1 5 10
 30
 <210> 9
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列
 35
 <400> 9
 Leu Leu Asp Val Asp Met Val Gln Gly Asp Glu Leu Cys
 1 5 10
 40
 <210> 10
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列
 45
 <400> 10
 Trp Leu Glu Asp Gly Gln Val Met Asp Val Asp Leu Cys
 1 5 10
 50
 <210> 11
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列
 55
 <400> 11
 Cys Leu Glu Asp Gly Gln Val Met Asp Val Asp Leu Cys
 1 5 10
 60
 <210> 12
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列
 65
 <400> 12
 Cys Phe Ile Asn Lys Gln Met Ala Asp Leu Glu Leu Cys Pro Arg Glu
 1 5 10 15

5 <210> 13
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列
 <400> 13
 Cys Phe Met Asn Lys Gln Leu Ala Asp Leu Glu Leu Cys Pro Arg Glu
 1 5 10 15
 10 <210> 14
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列
 15 <400> 14
 Cys Leu Glu Asp Gly Gln Val Met Asp Val Asp Leu Cys Pro Arg Glu
 1 5 10 15
 Ala Ala Glu Gly Asp Lys
 20
 20 <210> 15
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列
 25 <400> 15
 Cys Leu Glu Asp Gly Gln Val Met Asp Val Asp Leu Cys Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Gly Gly Pro
 20
 30 <210> 16
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列
 35 <400> 16
 Cys Leu Glu Asp Gly Gln Val Met Asp Val Asp Cys Pro Arg Glu Ala
 1 5 10 15
 Ala Glu Gly Asp Lys
 20
 40 <210> 17
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列
 45 <400> 17
 Gln Val Met Asp Val Asp Leu
 1 5
 50 <210> 18
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列
 55 <400> 18
 Lys Cys Arg Glu Val Trp Leu Gly Glu Ser Glu Thr Ile Met Asp Cys
 1 5 10 15
 Glu

5 <210> 19
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列

 <400> 19
 Ala Cys Arg Glu Val Trp Leu Gly Glu Ser Glu Thr Ile Met Asp Cys
 1 5 10 15
 Asp

 15 <210> 20
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列

 <400> 20
 Ser Cys Arg Glu Val Trp Leu Gly Glu Ser Glu Thr Val Met Asp Cys
 1 5 10 15
 Gly

 25 <210> 21
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列

 <400> 21
 Asn Cys Gln Asp Leu Met Leu Arg Glu Asp Ala Gly Cys Trp Ser Lys
 1 5 10 15
 Met

 35 <210> 22
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列

 <400> 22
 Asp Cys Glu Glu Pro Met Cys Ser Pro Val Leu Leu Gln Gln Leu Lys
 1 5 10 15
 Leu

 45 <210> 23
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列

 <400> 23
 Leu Glu Asp Gly Gln Val Met Asp Val Asp
 1 5 10

 55 <210> 24
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列

 <400> 24
 Cys Ser Thr Thr Gln Glu Gly Glu Leu Ala
 1 5 10

5 <210> 25
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列

 <400> 25
 Thr Thr Gln Glu Gly Glu
 1 5
 10
 <210> 26
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列
 15
 <400> 26
 Cys Ser Gln Lys His Trp Leu Ser Asp Arg Thr
 1 5 10
 20
 <210> 27
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列
 25
 <400> 27
 Thr Tyr Gln Gly His Thr Phe Glu Asp Ser Thr Lys Lys Cys Ala Asp
 1 5 10 15
 Ser Asn Pro Arg Gly Val
 20
 30
 <210> 28
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列
 35
 <400> 28
 Gly Gly His Phe Pro Pro
 1 5
 40
 <210> 29
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列
 45
 <400> 29
 Cys Phe Ile Asn Lys Gln Met Ala Asp Leu Glu Leu Cys
 1 5 10
 50
 <210> 30
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列
 55
 <400> 30
 Cys Phe Met Asn Lys Gln Leu Ala Asp Leu Glu Leu Cys
 1 5 10
 60
 <210> 31
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列

<400> 31
 Lys Cys Arg Glu Val Trp Leu Gly Glu Ser Glu Thr Ile Met Asp Cys
 1 5 10 15
 5 <210> 32
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列
 10 <400> 32
 His Cys Gln Gln Val Phe Phe Pro Gln Asp Tyr Leu Trp Cys Gln Arg
 1 5 10 15
 Gly
 15 <210> 33
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列
 20 <400> 33
 Ser Cys Arg Glu Val Trp Leu Gly Gly Ser Glu Met Ile Met Asp Cys
 1 5 10 15
 Glu
 25 <210> 34
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列
 30 <400> 34
 Glu Cys Asn Gln Asn Leu Ser Gly Ser Leu Arg His Val Asp Leu Asn
 1 5 10 15
 Cys
 35 <210> 35
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列
 40 <400> 35
 Asp Cys Glu Glu Pro Met Cys Ser Pro Val Leu Leu Gln Lys Leu Lys
 1 5 10 15
 Pro
 45 <210> 36
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列
 50 <400> 36
 Ser Cys Arg Glu Val Trp Leu Gly Gly Ser Glu Met Ile Met Asp Cys
 1 5 10 15
 Glu
 55 <210> 37
 <211> 17
 <212> PRT
 60

<213> 人序列和人工序列

<400> 37

5 Arg Cys Asp Gln Gln Leu Pro Arg Asp Ser Tyr Thr Phe Cys Met Met
1 5 10 15
Ser

<210> 38

10 <211> 17

<212> PRT

<213> 人序列和人工序列

<400> 38

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

<210> 39

<211> 17

<212> PRT

<213> 人序列和人工序列

<400> 39

25 Phe Cys Pro Glu Pro Ile Cys Ser Pro Pro Leu Ser Arg Met Thr Leu
1 5 10 15
Ser

<210> 40

<211> 12

<212> PRT

<213> 人序列和人工序列

<400> 40

35 Val Cys Asp Glu Cys Val Ser Arg Glu Leu Ala Leu
1 5 10

<210> 41

<211> 12

<212> PRT

<213> 人序列和人工序列

<400> 41

45 Trp Cys Leu Glu Pro Glu Cys Ala Pro Gly Leu Leu
1 5 10

<210> 42

<211> 12

<212> PRT

<213> 人序列和人工序列

<400> 42

55 Val Cys Asp Glu Cys Val Ser Arg Glu Leu Ala Leu
1 5 10

<210> 43

<211> 12

<212> PRT

60 <213> 人序列和人工序列

<400> 43
 Asp Cys Leu Ser Lys Gly Gln Met Ala Asp Leu Cys
 1 5 10

5 <210> 44
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列

10 <400> 44
 Ser Cys Gln Gly Arg Glu Val Arg Arg Glu Cys Trp
 1 5 10

15 <210> 45
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列

20 <400> 45
 Trp Cys Arg Glu Val Trp Leu Gly Glu Ser Glu Thr Ile Met Asp Cys
 1 5 10 15
 Glu

25 <210> 46
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列

30 <400> 46
 Ala Cys Arg Glu Val Trp Leu Gly Glu Ser Glu Thr Ile Met Asp Cys
 1 5 10 15
 Asp

35 <210> 47
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列

40 <400> 47
 Gly Cys Ala Glu Pro Lys Cys Trp Gln Ala Leu His Gln Lys Leu Lys
 1 5 10 15
 Pro

45 <210> 48
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列

50 <400> 48
 Glu Cys Arg Gly Pro Asn Met Gln Met Gln Asp His Cys Pro Thr Thr
 1 5 10 15
 Asp

55 <210> 49
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列

60 <210> 49
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列

<400> 49
 Gln Cys Asn Ala Val Leu Glu Gly Leu Gln Met Val Asp His Cys Trp
 1 5 10 15
 Asn
 5

<210> 50
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列
 10

<400> 50
 Cys Cys Val Ala Asp Pro Glu Thr Gln Met Thr Pro Ser Ser Glu Met
 1 5 10 15
 Phe
 15

<210> 51
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列
 20

<400> 51
 His Cys Lys Asn Glu Phe Lys Lys Gly Gln Trp Thr Tyr Ser Cys Ser
 1 5 10 15
 Asp
 25

<210> 52
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列
 30

<400> 52
 Gln Cys Arg Gln Phe Val Met Asn Gln Ser Glu Lys Glu Phe Gly Gln
 1 5 10 15
 Cys
 35

<210> 53
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列
 40

<400> 53
 Asn Cys Phe Met Asn Lys Gln Leu Ala Asp Leu Glu Leu Cys Pro Arg
 1 5 10 15
 Glu
 45

<210> 54
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列
 50

<400> 54
 Ser Cys Ala Tyr Thr Ala Gln Arg Gln Cys Ser Asp Val Pro Asn Pro
 1 5 10 15
 Gly
 55

<210> 55
 60

<211> 19
<212> PRT
<213> 人序列和人工序列

5 <400> 55
Gly Cys Phe Met Asn Lys Gln Met Ala Asp Leu Glu Leu Cys Pro Arg
1 5 10 15
Thr Ala Ala

10 <210> 56
<211> 19
<212> PRT
<213> 人序列和人工序列

15 <400> 56
Ala Cys Phe Met Asn Lys Gln Met Ala Asp Leu Glu Leu Cys Pro Arg
1 5 10 15
Val Ala Ala

20 <210> 57
<211> 19
<212> PRT
<213> 人序列和人工序列

25 <400> 57
Gly Cys Phe Ile Asn Lys Gln Leu Ala Asp Leu Glu Leu Cys Pro Arg
1 5 10 15
Val Ala Ala

30 <210> 58
<211> 19
<212> PRT
<213> 人序列和人工序列

35 <400> 58
Gly Cys Phe Met Asn Lys Gln Leu Ala Asp Trp Glu Leu Cys Pro Arg
1 5 10 15
Ala Ala Ala

40 <210> 59
<211> 19
<212> PRT
<213> 人序列和人工序列

45 <400> 59
Glu Cys Phe Met Asn Lys Gln Leu Ala Asp Ser Glu Leu Cys Pro Arg
1 5 10 15
Val Ala Ala

50 <210> 60
<211> 19
<212> PRT
<213> 人序列和人工序列

55 <400> 60
Gly Cys Phe Met Asn Lys Gln Leu Ala Asp Pro Glu Leu Cys Pro Arg
1 5 10 15

Glu Ala Glu

5 <210> 61
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列

10 <400> 61
Gly Cys Phe Met Asn Lys Gln Leu Val Asp Leu Glu Leu Cys Pro Arg
 1 5 10 15
Gly Ala Ala

15 <210> 62
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列

20 <400> 62
Gly Cys Phe Met Asn Lys Gln Leu Ala Asp Leu Glu Leu Cys Pro Arg
 1 5 10 15
Glu Ala Ala

25 <210> 63
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列

30 <400> 63
Gly Cys Phe Met Asn Lys Gln Gln Ala Asp Leu Glu Leu Cys Pro Arg
 1 5 10 15
Gly Ala Ala

35 <210> 64
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列

40 <400> 64
Gly Cys Phe Ile Asn Lys Gln Met Ala Asp Leu Glu Leu Cys Pro Arg
 1 5 10 15
Glu Ala Ala

45 <210> 65
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列

50 <400> 65
Cys Leu Glu Asp Gly Gln Val Met Asp Val Asp Cys Pro Arg Glu Ala
 1 5 10 15
Ala Glu Gly Asp
 20

60 <210> 66
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列

<400> 66
 Cys Leu Glu Asp Gly Gln Val Met Asp Val Asp Leu Cys Pro Arg Glu
 1 5 10 15
 5 Ala Ala Glu Gly Asp
 20

<210> 67
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列
 10

<400> 67
 Gln Cys Asn Ala Val Leu Glu Gly Leu Gln Met Val Asp His Cys Trp
 1 5 10 15
 15 Asn

<210> 68
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列
 20

<400> 68
 Cys Cys Val Ala Asp Pro Glu Thr Gln Met Thr Pro Ser Ser Glu Met
 1 5 10 15
 25 Phe

<210> 69
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列
 30

<400> 69
 Glu Cys Leu Lys Ile Glu Gln Gln Cys Ala Asp Ile Val Glu Ile Pro
 1 5 10 15
 35 Arg

<210> 70
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列
 40

<400> 70
 Ser Cys Ala Tyr Thr Ala Gln Arg Gln Cys Ser Asp Val Pro Asn Pro
 1 5 10 15
 45 Gly

<210> 71
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列
 50

<400> 71
 Glu Cys Arg Gly Pro Asn Met Gln Met Gln Asp His Cys Pro Thr Thr
 1 5 10 15
 55 Asp

60

<210> 72
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列
 5
 <400> 72
 Glu Cys Leu Val Tyr Gly Gln Met Ala Asp Cys Ala Ala Gly Gly Trp
 1 5 10 15
 Pro
 10
 <210> 73
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列
 15
 <400> 73
 Gln Cys Arg Gln Phe Val Met Asn Gln Ser Glu Lys Glu Phe Gly Gln
 1 5 10 15
 Cys
 20
 <210> 74
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列
 25
 <400> 74
 His Cys Lys Asn Glu Phe Lys Lys Gly Gln Trp Thr Tyr Ser Cys Ser
 1 5 10 15
 Asp
 30
 <210> 75
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列
 35
 <400> 75
 Cys Cys Val Thr Asp Val Gln Thr Thr Asn Met Asp Val Pro Ala Gly
 1 5 10 15
 Gln
 40
 <210> 76
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列
 45
 <400> 76
 Thr Cys Cys Val Thr Asp Ile Pro Pro Pro Asp Tyr Glu Gln Ser Leu
 1 5 10 15
 Gly
 50
 <210> 77
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列
 55
 <400> 77
 Cys Cys Glu Ser Asp Ile Pro Leu Asn Glu Leu His Ala Leu Ala Asp
 60

1 5 10 15
 Pro

5 <210> 78
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列

10 <400> 78
 Cys Cys Lys Ser Asp Ile Pro Ser Pro Val Thr Gln Phe Asn Thr Met
 1 5 10 15
 Lys

15 <210> 79
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列

20 <400> 79
 Cys Cys Gln Ser Asp Val Pro His Gln Pro Gly Ile Asn Asp Leu His
 1 5 10 15
 Val

25 <210> 80
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列

30 <400> 80
 Cys Cys Met Ser Asp Thr Pro Asp Ile Ser Arg Leu Pro Val Pro Asp
 1 5 10 15
 Ser

35 <210> 81
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列

40 <400> 81
 Cys Cys Met Ser Asp Ser Pro Ala Asp Pro Asn Arg Gly Leu Pro Ile
 1 5 10 15
 Trp

45 <210> 82
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列

50 <400> 82
 Cys Cys Leu Ser Asp Asp Ala Pro Thr Leu Pro Val Arg Arg
 1 5 10

55 <210> 83
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列

60

5 <400> 83
 Cys Cys Ile Thr Asp Val Pro Gln Gly Val Met Tyr Lys Gly Ser Pro
 1 5 10 15
 Asp

10 <210> 84
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列

15 <400> 84
 Glu Cys Lys Val Asp Gly Gln Leu Ser Asp Ser Pro Leu Leu Arg Asn
 1 5 10 15
 Asn

20 <210> 85
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列

25 <400> 85
 Cys Cys Met Thr Asp Asp Pro Met Asp Pro Asn Ser Thr Trp Ala Ile
 1 5 10 15
 Arg

30 <210> 86
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列

35 <400> 86
 Cys Cys Met Thr Asp Asp Pro Met Tyr Thr Asn Ser Thr Trp Ala Ile
 1 5 10 15
 Arg

40 <210> 87
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列

45 <400> 87
 Cys Cys Val Asp Asp Thr Pro Asn Ser Gly Leu Ala Met Arg Val Ser
 1 5 10 15
 Lys

50 <210> 88
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列

55 <400> 88
 Cys Cys Glu Val Asp Asp Phe Pro Thr His His Pro Gly Trp Thr Leu
 1 5 10 15
 Arg

60 <210> 89

<211> 17
<212> PRT
<213> 人序列和人工序列

5 <400> 89
Ser Cys Asn Leu Asn His Gln Ser Cys Asp Ile Pro Pro Val Lys Gln
1 5 10 15
Ile

10 <210> 90
<211> 17
<212> PRT
<213> 人序列和人工序列

15 <400> 90
Cys Cys Met Ala Asp Gln Glu Leu Asp Leu Gly His Asn Ala Ala Asn
1 5 10 15
Ala

20 <210> 91
<211> 12
<212> PRT
<213> 人序列和人工序列

25 <400> 91
Cys Cys Val Met Asp Leu Glu Leu Ala Ser Gly Phe
1 5 10

30 <210> 92
<211> 12
<212> PRT
<213> 人序列和人工序列

35 <400> 92
Cys Cys Val Met Asp Ile Glu Val Arg Gly Ser Ala
1 5 10

40 <210> 93
<211> 12
<212> PRT
<213> 人序列和人工序列

45 <400> 93
Cys Cys Gln Arg Asp Val Glu Leu Val Phe Gly Ser
1 5 10

50 <210> 94
<211> 12
<212> PRT
<213> 人序列和人工序列

55 <400> 94
Cys Cys Arg Ala Asp Phe Glu Val Gly Asn Gly Gly
1 5 10

60 <210> 95
<211> 12
<212> PRT
<213> 人序列和人工序列

<400> 95
 Cys Cys Val Ser Asp Glu Pro Ala Gly Val Arg Asp
 1 5 10

5 <210> 96
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列

10 <400> 96
 Gly Ala Gly Trp Gln Glu Lys Asp Lys Glu Leu Arg
 1 5 10

15 <210> 97
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列

20 <400> 97
 Gly Ala Met Thr Ala Gly Gln Leu Ser Asp Leu Pro
 1 5 10

25 <210> 98
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列

30 <400> 98
 Val Ala Gly Gly Gln Val Val Asp Arg Glu Leu Lys
 1 5 10

35 <210> 99
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列

40 <400> 99
 Lys Ala Gly Glu Gln Ala Met Asp Met Glu Leu Arg
 1 5 10

45 <210> 100
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列

50 <400> 100
 Arg Gly Arg Asn Gln Ile Met Asp Leu Glu Ile
 1 5 10

55 <210> 101
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列

60 <400> 101
 Gln Ile Asp Arg Gln Ile Thr Asp Thr Leu Leu
 1 5 10

<210> 102
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列

5 <400> 102
 Arg Glu Gln Gln Ile Ser Asp Val Pro Arg Val
 1 5 10
 <210> 103
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列
 10 <400> 103
 Cys Gln Ala Met Asp Ala Glu Ile Leu Asn Gln Val
 1 5 10
 <210> 104
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列
 20 <400> 104
 Gly Gln Met Met Asp Thr Glu Leu Leu Asn Arg
 1 5 10
 <210> 105
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列
 30 <400> 105
 Ser Met Glu Gly Gln Val Arg Asp Ile Gln Val
 1 5 10
 <210> 106
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列
 35 <400> 106
 Tyr Gln Gln Arg Asp Leu Glu Leu Leu Ala Glu
 1 5 10
 <210> 107
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列
 45 <400> 107
 Ser Met Gly Gln Lys Val Asp Arg Glu Leu Val
 1 5 10
 <210> 108
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列
 50 <400> 108
 Ser Met Gly Gln Glu Val Asp Arg Glu Leu Val
 1 5 10
 <210> 109
 <211> 11
 <212> PRT
 60 <210> 109
 <211> 11
 <212> PRT

<213> 人序列和人工序列

<400> 109

5 Ala Glu Asn Asp Gln Met Val Asp Trp Glu Ile
1 5 10

<210> 110

<211> 11

<212> PRT

10 <213> 人序列和人工序列

<400> 110

15 Gly Gly Trp Gln Glu Ser Asp Ile Pro Gly Arg
1 5 10

<210> 111

<211> 11

<212> PRT

20 <213> 人序列和人工序列

<400> 111

25 Gly Gly Trp Gln Glu Lys Asp Lys Glu Leu Arg
1 5 10

<210> 112

<211> 12

<212> PRT

30 <213> 人序列和人工序列

<400> 112

35 His Cys Cys Arg Ile Asp Arg Glu Val Ser Gly Ala
1 5 10

<210> 113

<211> 12

<212> PRT

40 <213> 人序列和人工序列

<400> 113

45 Cys Ala Pro Gly Met Gly Cys Trp Glu Ser Val Lys
1 5 10

<210> 114

<211> 17

<212> PRT

50 <213> 人序列和人工序列

<400> 114

55 Ser Cys Arg Glu Val Trp Leu Gly Gly Ser Glu Met Ile Met Asp Cys
1 5 10 15
Glu

<210> 115

<211> 17

<212> PRT

60 <213> 人序列和人工序列

<400> 115

65 Ser Cys Pro Ala Phe Pro Arg Glu Gly Asp Leu Cys Ala Pro Pro Thr
1 5 10 15
Val

5 <210> 116
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列

 <400> 116
 10 Phe Cys Pro Glu Pro Ile Cys Ser Pro Pro Leu Ser Arg Met Thr Leu
 1 5 10 15
 Ser

15 <210> 117
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列

 <400> 117
 20 Glu Cys Asn Gln Asn Leu Ser Gly Ser Leu Arg His Val Asp Leu Asn
 1 5 10 15
 Cys

25 <210> 118
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列

 <400> 118
 30 Arg Cys Asp Gln Gln Leu Pro Arg Asp Ser Tyr Thr Phe Cys Met Met
 1 5 10 15
 Ser

35 <210> 119
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列

 <400> 119
 40 His Cys Gln Gln Val Phe Phe Pro Gln Asp Tyr Leu Trp Cys Gln Arg
 1 5 10 15
 Gly

45 <210> 120
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列

 <400> 120
 50 Asp Cys Glu Glu Pro Met Cys Ser Pro Val Leu Leu Gln Lys Leu Lys
 1 5 10 15
 Pro

55 <210> 121
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列

60 <210> 121
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列

<400> 121
 Asn Cys Gln Asp Gln Met Leu Arg Glu Asp Ala Gly Cys Trp Ser Lys
 1 5 10 15
 Ile
 5

<210> 122
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列
 10

<400> 122
 His Cys Glu Glu Pro Glu Tyr Ser Pro Ala Thr Arg Val Phe Cys Gly
 1 5 10 15
 Arg
 15

<210> 123
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列
 20

<400> 123
 Asp Cys Asp Trp Ile Asn Pro Pro Asp Pro Pro His Phe Trp Lys Asp
 1 5 10 15
 Thr
 25

<210> 124
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列
 30

<400> 124
 Ala Cys Phe Ser Arg Asn Gly Gln Val Thr Asp Val Pro His Ser Cys
 1 5 10 15
 Tyr
 35

<210> 125
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列
 40

<400> 125
 Lys Cys Pro Thr Tyr Pro Lys Pro Asn Asp Arg Cys Leu Trp Pro Val
 1 5 10 15
 Pro
 45

<210> 126
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列
 50

<400> 126
 Tyr Cys Pro Lys Tyr Pro Leu Glu Gly Asp Cys Leu Leu Asp Asn Asp
 1 5 10 15
 Tyr
 55

<210> 127
 60

<211> 17
<212> PRT
<213> 人序列和人工序列

5 <400> 127
Arg Cys Glu Glu Trp Leu Cys Ile Pro Pro Ala Pro Ala Phe Ala Pro
1 5 10 15
Pro

10 <210> 128
<211> 17
<212> PRT
<213> 人序列和人工序列

15 <400> 128
Thr Cys Gly Gln Ser Glu Leu Arg Cys Ala Ser Leu Glu Thr His His
1 5 10 15
Val

20 <210> 129
<211> 16
<212> PRT
<213> 人序列和人工序列

25 <400> 129
Asn Cys Asn Asp Asn Pro Met Leu Asp Cys Met Pro Ala Trp Ser Ser
1 5 10 15

30 <210> 130
<211> 12
<212> PRT
<213> 人序列和人工序列

35 <400> 130
Asp Ala Leu Asp Glu Arg Ala Trp Arg Ala Arg Ala
1 5 10

40 <210> 131
<211> 12
<212> PRT
<213> 人序列和人工序列

45 <400> 131
Ser Cys Gln Gly Arg Glu Val Arg Arg Glu Cys Trp
1 5 10

50 <210> 132
<211> 12
<212> PRT
<213> 人序列和人工序列

55 <400> 132
Val Cys Asp Glu Cys Val Ser Arg Glu Leu Ala Leu
1 5 10

60 <210> 133
<211> 12
<212> PRT
<213> 人序列和人工序列

<400> 133
 Trp Cys Leu Glu Pro Glu Cys Ala Pro Gly Leu Leu
 1 5 10
 5 <210> 134
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列
 10 <400> 134
 Asp Cys Leu Ser Lys Gly Gln Met Ala Asp Leu Cys
 1 5 10
 15 <210> 135
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列
 20 <400> 135
 Val Cys Asp Glu Cys Val Ser Arg Glu Leu Ala Leu
 1 5 10
 25 <210> 136
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列
 30 <400> 136
 Gly Cys Pro Thr Trp Pro Arg Val Gly Asp His Cys
 1 5 10
 35 <210> 137
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列
 40 <400> 137
 Arg Cys Gln Ser Ala Arg Val Val Pro Glu Cys Trp
 1 5 10
 45 <210> 138
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列
 50 <400> 138
 Ser Cys Ala Pro Ser Gly Asp Cys Gly Tyr Lys Gly
 1 5 10
 55 <210> 139
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列
 60 <400> 139
 Gly Cys Pro Met Trp Pro Gln Pro Asp Asp Glu Cys
 1 5 10
 <210> 140
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列

5 <400> 140
 Glu Cys Pro Arg Trp Pro Leu Met Gly Asp Gly Cys
 1 5 10

 <210> 141
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列

10 <400> 141
 Gly Cys Gln Val Gly Glu Leu Val Trp Cys Arg Glu
 1 5 10

 <210> 142
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列

20 <400> 142
 Gln Cys Val Arg Asp Gly Thr Arg Lys Val Cys Met
 1 5 10

 <210> 143
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列

30 <400> 143
 Thr Cys Leu Val Asp Arg Gln Glu Ser Asp Val Cys
 1 5 10

 <210> 144
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列

40 <400> 144
 Asp Cys Val Val Asp Gly Asp Arg Leu Val Cys Leu
 1 5 10

 <210> 145
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列

50 <400> 145
 Arg Cys Glu Gln Gly Ala Leu Arg Cys Val Gly Glu
 1 5 10

 <210> 146
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列

60 <400> 146
 Val Cys Pro Pro Gly Trp Lys Asn Leu Gly Cys Asn
 1 5 10

 <210> 147
 <211> 12
 <212> PRT

<213> 人序列和人工序列

<400> 147

5 Met Cys Gln Gly Trp Glu Ile Val Ser Glu Cys Trp
1 5 10

<210> 148

<211> 25

<212> PRT

10 <213> 人序列和人工序列

<400> 148

15 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Met Asn Lys Gln Met Ala Asp Leu Glu
1 5 10 15
Leu Cys Pro Arg Glu Ala Ala Glu Ala
20 25

<210> 149

<211> 25

<212> PRT

20 <213> 人序列和人工序列

<400> 149

25 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Met Asn Lys Gln Met Ala Asp Leu Glu
1 5 10 15
Leu Cys Pro Arg Thr Ala Ala Glu Ala
20 25

<210> 150

<211> 25

<212> PRT

30 <213> 人序列和人工序列

<400> 150

35 Ala Asp Gly Ala Ala Cys Phe Met Asn Lys Gln Met Ala Asp Leu Glu
1 5 10 15
Leu Cys Pro Arg Val Ala Ala Glu Ala
20 25

<210> 151

<211> 25

<212> PRT

40 <213> 人序列和人工序列

<400> 151

45 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Ile Asn Lys Gln Leu Ala Asp Leu Glu
1 5 10 15
Leu Cys Pro Arg Val Ala Ala Glu Ala
20 25

<210> 152

<211> 25

<212> PRT

50 <213> 人序列和人工序列

<400> 152

55 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Ile Asn Lys Gln Leu Ala Asp Leu Glu
1 5 10 15
Leu Cys Pro Arg Glu Ala Ala Glu Ala
20 25

60

<210> 153

<211> 25
<212> PRT
<213> 人序列和人工序列

5 <400> 153
Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Met Asn Lys Gln Leu Ala Asp Leu Glu
1 5 10 15
Met Cys Pro Arg Asp Asp Ala Glu Ala
20 25

10 <210> 154
<211> 25
<212> PRT
<213> 人序列和人工序列

15 <400> 154
Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Met Asn Lys Gln Leu Ala Asp Pro Glu
1 5 10 15
Leu Cys Pro Arg Glu Ala Glu Glu Ala
20 25

20 <210> 155
<211> 25
<212> PRT
<213> 人序列和人工序列

25 <400> 155
Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Met Asn Lys Gln Leu Val Asp Leu Glu
1 5 10 15
Leu Cys Pro Arg Gly Ala Ala Glu Ala
20 25

30 <210> 156
<211> 25
<212> PRT
<213> 人序列和人工序列

35 <400> 156
Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Met Asn Asn Gln Leu Ala Asp Trp Glu
1 5 10 15
Leu Cys Pro Arg Ala Ala Ala Glu Ala
20 25

40 <210> 157
<211> 25
<212> PRT
<213> 人序列和人工序列

45 <400> 157
Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Met Asn Lys Gln Met Ala Asp Trp Glu
1 5 10 15
Met Cys Pro Arg Ala Ala Ala Glu Ala
20 25

50 <210> 158
<211> 25
<212> PRT
<213> 人序列和人工序列

55 <400> 158
Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Met Asn Lys Gln Gln Ala Asp Leu Glu
1 5 10 15

Leu Cys Pro Arg Gly Ala Ala Glu Ala
 20 25

5 <210> 159
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列

 <400> 159
 10 Ala Asp Gly Ala Glu Cys Phe Met Asn Lys Gln Leu Ala Asp Ser Glu
 1 5 10 15
 Leu Cys Pro Arg Val Ala Ala Glu Ala
 20 25

15 <210> 160
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列

 <400> 160
 20 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Met Asn Lys Gln Leu Ala Asp Leu Glu
 1 5 10 15
 Leu Cys Pro Arg Glu Ala Ala Glu Ala
 20 25

25 <210> 161
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列

 <400> 161
 30 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Ile Asn Met Gln Met Ala Asp Gln Glu
 1 5 10 15
 Leu Cys Pro Arg Ala Ala Ala Glu Ala
 20 25

35 <210> 162
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列

 <400> 162
 40 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Ile Asn Lys Gln Met Ser Asp Phe Glu
 1 5 10 15
 Leu Cys Pro Arg Glu Ala Gly Glu Ala
 20 25

45 <210> 163
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列

 <400> 163
 50 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Ile Asn Lys Gln Met Ala Asp Leu Glu
 1 5 10 15
 Leu Cys Thr Arg Glu Ala Ala Glu Ala
 20 25

55 <210> 164
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列

60 <210> 164
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列

<400> 164
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Ile Asn Lys Gln Met Ala Asp Leu Glu
 1 5 10 15
 5 Leu Cys Pro Arg Gln Ala Ala Glu Ala
 20 25

<210> 165
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列

<400> 165
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Ile Asn Asn Gln Met Ala Asp Leu Glu
 1 5 10 15
 15 Leu Cys Pro Arg Gly Gly Ala Glu Ala
 20 25

<210> 166
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列

<400> 166
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Ile Asn Lys Gln Met Ala Asp Trp Glu
 1 5 10 15
 20 Leu Cys Pro Arg Glu Gly Ala Glu Ala
 25

<210> 167
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列

<400> 167
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Ile Asn Lys Gln Met Ala Asp Leu Glu
 1 5 10 15
 35 Leu Cys Pro Ser Gln Ala Ala Glu Ala
 20 25

<210> 168
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列

<400> 168
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Ile Asn Lys Gln Met Ala Asp Leu Glu
 1 5 10 15
 40 Leu Cys Pro Arg Glu Gly Ala Glu Ala
 20 25

<210> 169
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列

<400> 169
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Ile Asn Lys Gln Met Ala Asp Ser Glu
 1 5 10 15
 50 Leu Cys Pro Arg Glu Pro Ala Glu Ala
 20 25

<210> 169
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列

<400> 169
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Ile Asn Lys Gln Met Ala Asp Ser Glu
 1 5 10 15
 60 Leu Cys Pro Arg Glu Pro Ala Glu Ala
 20 25

<210> 170
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列
 5
 <400> 170
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Ile Lys Lys Gln Met Ala Asp Leu Glu
 1 5 10 15
 Leu Cys Pro Arg Glu Ala Trp Glu Ala
 20 25
 10
 <210> 171
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列
 15
 <400> 171
 Ala Asp Gly Ala Glu Cys Phe Ile Asn Lys Gln Met Ala Asp Arg Glu
 1 5 10 15
 20 Leu Cys Ala Arg Glu Val Ala Glu Ala
 20 25
 <210> 172
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列
 25
 <400> 172
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Ile Asp Lys Gln Met Ala Asp Leu Glu
 1 5 10 15
 30 Leu Cys Pro Arg Ala Ala Ala Glu Ala
 20 25
 <210> 173
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列
 35
 <400> 173
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Ile Asn Lys Gln Met Ala Asp Leu Glu
 1 5 10 15
 40 Leu Cys Arg Arg Glu Ala Gly Glu Ala
 20 25
 <210> 174
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列
 45
 <400> 174
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Lys Asn Lys Gln Met Val Asp Ser Glu
 1 5 10 15
 50 Leu Cys Ala Arg Gln Ala Ala Glu Ala
 20 25
 <210> 175
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列
 55
 <400> 175
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Gln Asn Lys Gln Met Ala Asp Leu Glu

1 5 10 15
 Leu Cys Pro Arg Glu Ala Ala Glu Ala
 20 25

5 <210> 176
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列

10 <400> 176
 Ala Asp Gly Ala Glu Cys Phe Ile Asn Lys Gln Arg Ala Asp Leu Glu
 1 5 10 15
 Leu Cys Pro Gly Glu Ala Ala Glu Ala
 20 25

15 <210> 177
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列

20 <400> 177
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Ile Asn Lys Gln Met Ala Asp Ser Glu
 1 5 10 15
 Leu Cys Pro Ala Ala Ala Ala Glu Ala
 20 25

25 <210> 178
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列

30 <400> 178
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Ile Asn Arg Gln Met Ala Asp Pro Glu
 1 5 10 15
 Leu Cys Pro Arg Glu Ala Ala Glu Ala
 20 25

35 <210> 179
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列

40 <400> 179
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Ile Glu Lys Gln Met Ala Asp Met Glu
 1 5 10 15
 Leu Cys Gln Ala Arg Ala Ala Glu Ala
 20 25

45 <210> 180
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列

50 <400> 180
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Ile Asn Lys Gln Met Ala Asp Trp Glu
 1 5 10 15
 Leu Cys Pro Arg Glu Ala Ala Glu Ala
 20 25

55 <210> 181
 <211> 25
 <212> PRT

60 <210> 181
 <211> 25
 <212> PRT

<213> 人序列和人工序列

<400> 181

5 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Ile Asn Asn Gln Met Ala Asp Leu Glu
1 5 10 15
Leu Cys Pro Arg Glu Ala Ala Glu Ala
20 25

<210> 182

10 <211> 25

<212> PRT

<213> 人序列和人工序列

<400> 182

15 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Ile Glu Lys Gln Met Ala Asp Met Glu
1 5 10 15
Leu Cys Gln Arg Glu Thr Ala Glu Ala
20 25

<210> 183

<211> 25

<212> PRT

<213> 人序列和人工序列

<400> 183

25 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Ile Asn Lys Gln Met Ala Asp Met Glu
1 5 10 15
Leu Cys Pro Arg Glu Ala Ala Glu Ala
20 25

<210> 184

<211> 25

<212> PRT

<213> 人序列和人工序列

<400> 184

35 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Ile Asn Lys Gln Met Ala Asp Leu Glu
1 5 10 15
Leu Cys Pro Arg Glu Ala Ala Glu Ala
20 25

<210> 185

<211> 25

<212> PRT

<213> 人序列和人工序列

<400> 185

40 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Arg Asn Lys Gln Met Ala Asp Leu Glu
1 5 10 15
Leu Cys Pro Arg Glu Ala Ala Glu Ala
20 25

<210> 186

<211> 25

<212> PRT

<213> 人序列和人工序列

<400> 186

50 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Ile Asn Lys Gln Met Ala Asp Leu Glu
1 5 10 15
Leu Cys Pro Ala Arg Ala Ala Glu Ala
20 25

5 <210> 187
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列

 <400> 187
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Ile Asn Arg Gln Leu Ala Asp Met Glu
 1 5 10 15
 10 Leu Cys Ser Arg Gly Ala Ala Glu Ala
 20 25

 15 <210> 188
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列

 <400> 188
 Ala Asp Gly Ala Glu Cys Phe Ile Asn Arg Gln Met Ala Asp Leu Glu
 1 5 10 15
 20 Leu Cys Gly Arg Glu Ala Ala Glu Ala
 20 25

 25 <210> 189
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列

 <400> 189
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Phe Ile Ser Pro Gln Leu Ala Asp Trp Lys
 1 5 10 15
 30 Arg Cys Met Arg Glu Ala Ala Glu Ala
 20 25

 35 <210> 190
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列

 <400> 190
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Ser Ile His Thr Gln Met Ala Asp Trp Glu
 1 5 10 15
 40 Arg Cys Leu Arg Glu Gly Ala Glu Ala
 20 25

 45 <210> 191
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列

 <400> 191
 Ala Asp Gly Ala Gly Cys Ser Ile His Arg Gln Met Ala Asp Trp Glu
 1 5 10 15
 50 Arg Cys Leu Arg Glu Gly Ala Glu Ala
 20 25

 55 <210> 192
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人序列和人工序列

 <400> 192

Cys Ser Ser Cys Asp Gly Gly Gly His Lys Pro Pro Thr Ile Gln Cys
1 5 10 15

5 <210> 193
<211> 20
<212> PRT
<213> 人序列和人工序列

10 <400> 193
Cys Leu Gln Ser Ser Cys Asp Gly Gly Gly His Phe Pro Pro Thr Ile
1 5 10 15
Gln Leu Leu Cys
20

专利名称(译)	衍生自IgEC ϵ 2区的表位或模拟表位、其拮抗剂以及它们的治疗用途		
公开(公告)号	CN1348466A	公开(公告)日	2002-05-08
申请号	CN00806614.0	申请日	2000-02-22
[标]申请(专利权)人(译)	史密丝克莱恩比彻姆生物有限公司		
申请(专利权)人(译)	史密丝克莱恩比彻姆生物有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	史密丝克莱恩比彻姆生物有限公司		
[标]发明人	M戴森 M弗里德 J格林伍德 E赫维特 A拉蒙特 S马森 R兰达尔 WG图内尔 MP范梅切伦 C维纳尔斯Y德巴索尔斯		
发明人	M·戴森 M·弗里德 J·格林伍德 E·赫维特 A·拉蒙特 S·马森 R·兰达尔 W·G·图内尔 M·P·范梅切伦 C·维纳尔斯·Y·德巴索尔斯		
IPC分类号	G01N33/53 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/395 A61K45/00 A61K47/48 A61P31/00 A61P37/00 A61P37/08 B01J20/281 C07K7/00 C07K14/02 C07K16/00 C07K16/42 C07K19/00 G01N30/88 A61K39/385 G01N33/577 G01N33/68		
CPC分类号	A61K47/48276 C07K2316/52 C07K16/4291 C07K2317/52 A61K47/4833 A61K2039/6068 C07K16/00 A61K2039/505 A61K47/6425 A61K47/646		
代理人(译)	姜建成		
优先权	1999004405 1999-02-25 GB 1999007151 1999-03-29 GB 1999010537 1999-05-07 GB 1999010538 1999-05-07 GB 1999018594 1999-08-07 GB 1999018603 1999-08-07 GB 1999021046 1999-09-07 GB 1999021047 1999-09-07 GB 1999025619 1999-10-29 GB 1999027698 1999-11-23 GB		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及提供用于治疗、预防或缓解变应性疾病的新药物。具体地说,所述新药物是加入IgE Cε2区表面暴露区域的表位或模拟表位的分离的肽。本发明人已经发现:这些新的区域可能是被动和主动免疫预防或免疫治疗的靶。本发明还涉及所述药物、含所述药物的药用组合物的生产方法以及所述药物和药用组合物在医药中的应用。能够结合本发明的表面暴露IgE区域的配体、尤其是单克隆抗体以及它们在医药中作为被动免疫治疗或免疫预防的应用也构成了本发明的一个方面。

残基	表面面积	平均/5	>50	>80
ARG_1	270.322723			
ASP_2	139.374542			
PHE_3	64.298927	117.361489	1	1
THR_4	46.170193	64.494911	1	0
PRO_5	66.64106	39.629932	0	0
PRO_6	5.989833	29.3644934	0	0
THR_7	12.084753	21.44326604	0	0
VAL_8	16.016628	8.6280336	0	0
LYS_9	6.581028	10.2788842	0	0
ILE_10	2.527926	9.5044914	0	0
LEU_11	14.243686	13.375776	0	0
GLN_12	8.173189	19.2992118	0	0
SER_13	35.373051	29.1890154	0	0
SER_14	36.178207	32.6313328	0	0
CYS_15	31.976944	39.0180884	0	0
ASP_16	31.455273	45.6135238	0	0
GLY_17	40.066967	50.0871888	1	0
GLY_18	68.390228	46.9979994	1	0
GLY_19	58.546332	59.6253914	1	0
HIS_20	36.519977	63.4913874	1	0
PHE_21	94.603233	68.1998406	1	0
PRO_22	59.047947	45.8523506	1	0
PRO_23	92.281494	62.0824146	1	0
THR_24	46.809082	50.1635586	1	0
ILE_25	17.670317	38.6377736	0	0
GLN_26	35.008953	21.6261078	0	0
LEU_27	1.426522	12.5259452	0	0
LEU_28	7.215665	10.5518628	0	0
CYS_29	1.308269	3.5500722	0	0
LEU_30	7.797905	4.8164534	0	0
VAL_31	0	4.0672202	0	0
SER_32	7.58378	3.8052644	0	0
GLY_33	3.469549	5.5755666	0	0
THR_34	0	20.7766542	0	0
THR_35	36.649906	58.9767032	1	0
PRO_36	56.015438	50.2230378	1	0
GLY_37	48.848633	57.590885	1	0
THR_38	109.601212	73.50021	1	0
ILE_39	36.835236	70.1846368	1	0
ASN_40	116.200531	73.2560022	1	0
ILE_41	39.437572	51.7217026	1	0
THR_42	64.20546	49.2710734	0	0
TRP_43	1.929714	35.2314448	0	0
LEU_44	24.58039	49.7663942	0	0
GLU_45	46.002388	50.9119188	1	0
ASP_46	112.113319	74.3084848	1	0
GLY_47	49.320883	91.0816662	1	1
GLN_48	118.912544	85.9516244	1	1
VAL_49	108.448097	91.6210626	1	1

P5
P5
P5
P5
P5
P6
P6
P6
P6