



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104519896 B

(45)授权公告日 2017. 11. 10

(21)申请号 201280075163.5

(22)申请日 2012.06.15

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104519896 A

(43)申请公布日 2015.04.15

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2015.02.06

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2012/042552 2012.06.15

(87)PCT国际申请的公布数据
W02013/187906 EN 2013.12.19

(73)专利权人 免疫治疗有限公司
地址 美国宾夕法尼亚州

(72)发明人 威廉·赫尔 特瑞·海兰

(74)专利代理机构 中原信达知识产权代理有限
责任公司 11219

代理人 杨青 穆德骏

(51)Int.Cl.
A61K 38/00(2006.01)

(56)对比文件
WO 01/76642 A1,2001.10.18,
WO 94/24281 A1,1994.10.27,
WO 2006/099574 A2,2006.09.21,
WO 01/76642 A1,2001.10.18,
WO 2006/099574 A2,2006.09.21,
WO 02/080851 A2,2002.10.17,
WO 94/11512 A3,1994.05.26,
WO 02/080851 A2,2002.10.17,

审查员 李恩

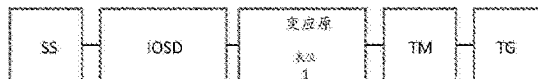
权利要求书1页 说明书39页
序列表84页 附图25页

(54)发明名称

用于治疗变态反应的核酸

(57)摘要

本发明提供用于治疗变态反应的DNA疫苗。所述疫苗包含一种或多种变应原性表位、优选衍生所述表位的变应原性蛋白质的完整蛋白质序列的编码序列,所述编码序列与溶酶体相关膜蛋白(LAMP)的腔内域和LAMP的靶向序列框内融合。所述疫苗使得能递呈正确构型的三维表位供产生免疫应答。所述疫苗可为多价分子,并且/或者可作为含有两种或更多种DNA构建体的多价疫苗的一部分提供。



SS =信号序列
iOSD =细胞器内稳定化域
TM =跨膜
TG =靶向

1. 一种编码嵌合蛋白的核酸分子,其中所述嵌合蛋白由选自SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:9的氨基酸序列构成。
2. 根据权利要求1所述的核酸分子,其中所述嵌合蛋白由SEQ ID NO:5的氨基酸序列构成。
3. 根据权利要求1所述的核酸分子,其中所述嵌合蛋白由SEQ ID NO:3的氨基酸序列构成。
4. 根据权利要求1所述的核酸分子,其中所述嵌合蛋白由SEQ ID NO:9的氨基酸序列构成。
5. 根据权利要求1-3任一项所述的核酸分子,其中所述核酸分子包含DNA。
6. 一种表达载体,其包含根据权利要求5所述的核酸分子。
7. 一种药物组合物,其包含根据权利要求6所述的表达载体。
8. 根据权利要求7所述的药物组合物,其还包含药学上可接受的载体。
9. 根据权利要求6所述的表达载体在制备药物组合物中的应用,所述药物组合物用于治疗花粉变态反应。
10. 一种核酸疫苗,其包含根据权利要求7或8所述的药物组合物。
11. 根据权利要求7或8所述的药物组合物在制备核酸疫苗中的应用,所述核酸疫苗用于治疗花粉变态反应。
12. 根据权利要求4所述的核酸分子,其中所述核酸分子包含DNA。
13. 一种表达载体,其包含根据权利要求12所述的核酸分子。
14. 一种药物组合物,其包含根据权利要求13所述的表达载体。
15. 根据权利要求14所述的药物组合物,其还包含药学上可接受的载体。
16. 根据权利要求13所述的表达载体在制备药物组合物中的应用,所述药物组合物用于治疗花生变态反应。
17. 一种核酸疫苗,其包含根据权利要求14或15所述的药物组合物。
18. 根据权利要求14或15所述的药物组合物在制备核酸疫苗中的应用,所述核酸疫苗用于治疗花生变态反应。

用于治疗变态反应的核酸

[0001] 相关专利申请的交叉引用

[0002] 本专利申请依赖于2011年6月14提交的美国临时专利申请No.61/496,866的公开内容并且要求该临时专利申请的权益,特此将该临时专利申请的整个公开内容以引用的方式并入本文。

背景技术

技术领域

[0003] 本发明涉及分子生物学和医学领域。更具体地讲,本发明涉及用作DNA疫苗的核酸以及将其用于治疗遭受变态反应或易受变态反应影响的受试者的方法。

[0004] 相关领域的论述

[0005] 变态反应是表征为产生对抗变应原(或引起变态反应的分子)的IgE抗体的超敏反应性疾病。变态反应影响超过25%的人口。变态反应可通过许多途径(包括呼吸道、皮肤接触、摄食、昆虫叮咬或药物注入)进入人体。

[0006] 变态反应疾病管理包括诊断和治疗。变态反应学家使用多种技术,如皮肤点刺测试、基于放射变应原吸附的技术、ELISA或激发测试来证明变应原特异性IgE以及来鉴定变应原来源而诊断变态反应。变态反应的治疗最通常分为两类:回避和施与抗组胺剂。第三种替代方法即变态反应免疫疗法,其要求患者每周接受由小量攻击性变应原组成的注射剂以帮助免疫系统重新训练(reeducate)其对变应原的应答。

[0007] 变应原融合蛋白的使用和产生是本领域所熟知的。例如,美国专利No.7,566,456教导了具有IgE和IgG结合域以及编码变应原的融合蛋白。另外,WO 97/07218教导了供在变态反应免疫疗法中使用的变应原-抗CD32融合蛋白。然而,这两篇文献均没有教导它们各自的融合蛋白如何通过抗原递呈而与T细胞相互作用来诱导或改变Th1应答。此外,在引导含抗CD32的疫苗至树突细胞到实现Th1细胞的正诱导之间没有理论联系。这两篇文献均教导了一种组合物,该组合物在治疗上引入一种变应原,使得该变应原可作为变应原融合蛋白存在于血清中。

[0008] 已经由Toda等人(2002)确定,可将变应原的T细胞表位(在本例中是位于氨基酸247-258处的Cry J2表位)衔接至融合蛋白并且可用于进行变态反应特异性免疫疗法。Toda等人(2002)描述的特异性组合物是DNA疫苗的使用,该DNA疫苗编码与II类相关恒定链肽(CLIP)衔接的Cry J2的主要CD4 T细胞表位(位于氨基酸247-258)。CLIP含有溶酶体/内体运输序列并且含有结合至MHC II的肽结合槽的域。Toda等人(2002)显示,用Cry J2肽/CLIP DNA疫苗免疫导致使小鼠启动主要的Th1应答,该应答表征为较高的IFN- γ 和IgG2a产生。然而,Toda等人没有教导可用于进行变态反应特异性免疫疗法的变应原的整个蛋白质编码序列的细胞内靶向。

[0009] 美国专利No.6,982,326和美国专利No.6,090,386描述了编码日本柳杉(*Cryptomeria japonica*)主要花粉变应原Cry J1、Cry J2、Jun s I和Jun v I的核酸序列

以及其片段或肽。该发明还提供了在用编码Cry J1、Cry J2、Jun s I和Jun v I或其至少一种片段、以及Cry J1、Cry J2、Jun s I或Jun v I的片段或者其至少一种片段的核酸序列转化的宿主细胞中产生的纯化的Cry J1、Cry J2、Jun s I和Jun v I以及其至少一种片段,以及合成制备的Cry J1、Cry J2、Jun s I或Jun v I的片段。Cry J1、Cry J2、Jun s I和Jun v I以及其片段被公开可用于诊断、治疗和预防日本柳杉花粉症。该发明还提供Cry J1和Cry J2的分离的肽。在该发明范围内的肽包含Cry J1或Cry J2的至少一个T细胞表位,或者优选至少两个T细胞表位。该发明还涉及经修饰的肽,该肽具有与对应的天然存在的变应原或其部分相似的或增强的治疗特性但具有减少的副作用。还提供了治疗或诊断个体中对日本柳杉花粉敏感的方法以及包含一种或多种该发明的肽的治疗组合物和多重肽制剂(multi-peptide formulation)。该发明没有教导如何将表位或变应原合并进具有免疫刺激特性的DNA疫苗中。

[0010] 美国专利No.7,547,440和美国专利No.7,112,329通过用涵盖日本扁柏(hinoki)花粉变应原一级结构的重叠肽对建立自遭受日本扁柏花粉变态反应的患者的T细胞系进行刺激,鉴定了日本扁柏花粉变应原分子上的T细胞表位位点。该肽可用于针对患有春天树木花粉症的患者(包括与日本扁柏花粉有交叉反应性的日本扁柏花粉症患者)的基于肽的免疫疗法。该肽还可用于诊断春天树木花粉症。该发明局限于诊断学和表位的多肽递送。

[0011] DNA疫苗已发展为传统的全细胞或全病毒疫苗的替代形式。一般而言,DNA疫苗是经工程改造的核酸,其包含编码一种或多种表位的序列。将该核酸递送至细胞,通常是抗原递呈细胞(APC),使该核酸表达,所表达的蛋白质上存在的表位在内体/溶酶体区室中加工,并最终递呈在细胞的表面上。授予August等人的美国专利No.5,633,234公开并表征了溶酶体相关膜蛋白(LAMP)的内体/溶酶体靶向序列。该专利鉴定了该蛋白质C端区域中的关键残基,该关键残基对该蛋白质靶向至内体/溶酶体区室是必要的。该专利公开了,抗原肽与C端LAMP靶向序列融合可为免疫应答的产生提供增强的表位加工和递呈。

[0012] 此外,授予Harris等人的美国专利申请公开No.2004/0157307公开了LAMP腔内域(lumenal domain)作为“运输域”来引导由DNA疫苗表达的嵌合蛋白穿过一个或多个细胞区室/细胞器如穿过溶酶体囊泡途径的用途。该嵌合蛋白包括LAMP多肽的腔内域、包含此前从抗原蛋白质鉴定和选择的肽表位序列的抗原域、跨膜域和内体/溶酶体靶向序列。

[0013] 已提出将DNA疫苗作为变应性疾病的治疗方法(Raz等人,1996;Hartl等人,2004;Hsu等人,1996;Cramer 2007;Weiss等人,2006)。基本原理是,由DNA疫苗编码的变应原蛋白质将优先激活变应原特异性Th1细胞应答,伴随着由APC、自然杀伤细胞(NK)和T细胞产生干扰素,而不是激活特征性的Th2型应答,如IL-4、IL-5和IL-13的分泌,以及由B淋巴细胞形成IgE和在晚期反应中嗜酸性粒细胞的成熟和募集。然而,Th1和Th2T细胞表型的差异性诱导的根本机制看起来涉及大量的因素,例如疫苗制剂的细菌DNA的独特性质(如未甲基化的和CpG DNA残基)、由先天免疫引起的细胞因子环境和变应原的细胞运输特性(Chen等人,2001;Kaech等人,2002)。尚没有发明或方法成功地解决通过递送编码变应原的核酸所进行的变态反应治疗的不确定性。因而,至今尚未实现这样一种变态反应治疗方法。此外,施用DNA疫苗用于治疗变应性疾病已导致变应原肽分泌进细胞外环境,从而有可能导致通过激活IgE而意外地诱导变应性应答。

发明内容

[0014] 本发明提供编码变应原性蛋白质、变应原性多肽和变应原性肽的核酸(本文也称为“构建体”)。该核酸设计用于递送至免疫细胞以及在那些细胞中产生变应原性蛋白质、多肽和肽。所编码的蛋白质、多肽和肽具有靶向序列,用于将该蛋白质靶向至MHC-II区室供一种或多种表位的加工和展示,从而导致对所述表位的免疫应答。一般而言,该核酸包含以下域,所述域与所编码的蛋白质的各个域相关:信号序列域;细胞器内稳定化域;变应原域;跨膜域;和胞质溶酶体/内体靶向域。

[0015] 在编码的蛋白质的语境中,提供信号序列来将所编码的蛋白质引导至内质网或溶酶体。细胞器内稳定化域是设计为耐受蛋白水解的并且设计用于保护蛋白质的其余部分(尤其是变应原域)免于在加工供细胞进行表位递呈之前被降解的序列。在示例性的实施例中,细胞器内稳定化域是LAMP-1的腔内域。变应原域包含一种或多种变应原性表位的序列,所述变应原性表位可用来在所述表位在其中递呈的动物中引起免疫应答。通常,变应原域包含一种或多种变应原蛋白质,但在一些实施例中,可使用变应原性蛋白质的免疫原性多肽或肽片段。在下文论述的示例性实施例中,表位是植物变应原的表位。在本发明的编码的蛋白质中,变应原域不包括信号肽,例如作为变应原蛋白质的一部分天然存在的信号肽。变应原域可包含单种变应原性蛋白质、多肽或肽,或者可包含两种或更多种变应原性蛋白质、多肽或肽。若存在两种或更多种变应原,则每种变应原可来自相同的物种/来源或者一种或多种可来自一种或多种不同的来源。若存在两种或更多种变应原,则它们可协同表达以在所表达的蛋白质中提供相等拷贝数的每种编码区。跨膜域可以是适于引导蛋白质插入膜和穿过膜运输的任何序列。许多这类序列是本领域已知的或者可容易地设计。溶酶体/内体靶向域可以是能够将肽引导至溶酶体或内体的任何序列。这类序列是本领域已知的并且在本文中通过LAMP-1的胞质尾部序列示例。

[0016] 如上文所提及的,在优选的实施例中,该核酸包含变应原域,该变应原域包括变应原性蛋白质的整个变应原性编码序列,但缺少变应原的信号序列的编码序列。在一些实施例中,本发明的核酸不包含整个变应原性编码序列,而是仅包含足够量的该编码序列而使得所编码的多肽在表达时能够折叠而实现该多肽上存在的至少一个表位的天然三维结构。如在包含整个变应原编码序列的构建体中,若存在短于整个编码序列,则该核酸构建体还缺少变应原性多肽或肽的天然存在的信号肽的编码序列。

[0017] 在优选的实施例中,核酸构建体在变应原域中包含多个变应原性蛋白质、多肽和/或肽的编码序列。存在的每个变应原可来自相同来源,每者来自不同来源,或它们的任何组合。

[0018] 本发明的核酸,以及因而所编码的蛋白质、多肽和肽可用于治疗遭受变态反应或潜在发展变态反应的受试者,尤其是动物受试者的方法中。一般而言,根据本发明的治疗方法包括将本发明的核酸以足以将所述核酸递送至免疫系统的一种或多种免疫细胞,并且优选递送至一种或多种抗原递呈细胞(APC)的量施用给受试者。一旦递送,所述核酸就表达,所编码的蛋白质在细胞内进行加工,并且表位展示在细胞的表面上。该治疗方法可认为是使用核酸和蛋白质来提供治疗性或预防性免疫应答的方法。

附图说明

[0019] 图1是根据本发明的一个实施例的核酸的示意图,其中在变应原域中提供包含单个表位的单个抗原。

[0020] 图2示出了根据本发明的核酸的载体图谱,其中变应原域包含在人LAMP N-端序列(SS和ISOD)和人LAMP C-端序列(TM和TG)之间插入的CryJ2变应原(来自日本柳杉的变应原),但没有信号序列。

[0021] 图3为根据本发明的一个替代实施例的核酸的示意图,其中在变应原域中提供单一变应原的多个表位序列。

[0022] 图4为根据本发明的一个替代实施例的核酸的示意图,其中在变应原域中提供多个不同的变应原序列。

[0023] 图5示出了根据本发明的核酸的载体图谱,其中变应原域包含变应原CryJ1(来自日本柳杉的变应原)和变应原CryJ2(来自日本柳杉的变应原)的变应原序列(无信号肽)。

[0024] 图6A示出了在变应原域中包括三个花生变应原(AraH1、AraH2和AraH3,都缺少信号序列)的核酸的载体图谱。

[0025] 图6B示出了由图6A的核酸编码的蛋白质的示意图。

[0026] 图7示出了根据本发明的核酸的载体图谱,绘出了缺少CryJ1变应原序列的天然存在的信号序列。该特定构建体用于下文详细描述的实验中以显示移除变应原序列的天然信号序列的重要性。

[0027] 图8示出了不被本发明涵盖的核酸构建体的载体图谱,其中CryJ2变应原在质粒骨架上编码,但是缺少SS、IOS、TM和TG域。该构建体在下文详细描述的实验用作比较对照。

[0028] 图9示出了蛋白质印迹,其绘出了根据本发明的构建体在293细胞中的表达。分图A示出了当用抗CryJ2抗体测定时,根据本发明的构建体中的CryJ1-CryJ2组合变应原(见图5)和单独的CryJ2变应原(见图2)的表达。分图B示出了当用抗CryJ1抗体测定时,CryJ1-CryJ2组合变应原和CryJ1变应原(缺少其天然的信号序列;见图7)的表达。分图B还显示,在其中未移除CryJ1变应原的天然信号序列的构建体(载体图谱未示出)中CryJ1变应原的表达是不可检测的。

[0029] 图10示出了线图,该图绘出了根据本发明的核酸构建体与包含变应原序列的其他构建体相比的效力。分图A显示,与包含与CryJ2编码序列融合的质粒骨架的构建体(见图8)相比,由于施用本发明的CryJ2-LAMP构建体(见图2)而见到IgG1产量和检测值的显著增加。分图B显示,与包含与CryJ2编码序列融合的质粒骨架的构建体(根据分图A)相比,由于施用本发明的CryJ2-LAMP构建体(根据分图A)而见到IgG2a产量和检测值的显著增加。

[0030] 图11绘出了条形图,该图示出了CryJ2-LAMP构建体在小鼠中的剂量效应。分图A绘出了与单独注射载体DNA相比,在以10 μ g至100 μ g范围的多种量注射DNA疫苗后21天和28天时的IgG2a检测值。分图B绘出了与单独注射载体DNA相比,在以10 μ g至100 μ g范围的多种量注射DNA疫苗后21天和28天时的IgG1检测值。

[0031] 图12绘出了条形图,该图示出了与单独的载体相比,用本发明的CryJ2-LAMP构建体处理的小鼠脾脏培养物中IL-4和IFN- γ 的诱导效果。分图A示出了IL-4的效果。分图B示出了IFN- γ 的效果。

[0032] 图13绘出了线图,该图显示了用CryJ2-LAMP DNA疫苗免疫先前致敏的小鼠的效力。分图A示出了随时间推移的IgG1滴度。分图B示出了随时间推移的IgG2a滴度。

[0033] 图14绘出了条形图,该图示出了小鼠脾细胞培养物中IFN- γ (分图A)和IL-4 (分图B)的诱导。

[0034] 图15绘出了条形图,该图示出了免疫的小鼠中循环CryJ2蛋白的定量。

[0035] 图16绘出了豚鼠数据的条形图,该图示出了用CryJ2-LAMP构建体免疫且用重组CryJ2攻击的豚鼠的IgG1检测值(分图A)和IgG2检测值(分图B)。

[0036] 图17绘出了条形图,该图示出了在85天毒理学GLP安全性研究期间用CryJ2-LAMP DNA疫苗免疫的新西兰白兔中的抗CryJ2应答。

[0037] 图18绘出了蛋白质印迹,其示出了来自根据本发明的构建体的花生变应原H1、H2和H3的共表达。

具体实施方式

[0038] 现在将详细参考本发明的各个示例性实施例。应当理解,下面对示例性实施例的论述无意于限制本发明,而是在本文中广义地公开。相反,提供下面的论述以使读者对本发明的某些方面和特征有更详细地理解。除非另外指明,否则本发明的实践采用本领域技术人员技术范围内的常规分子生物学、微生物学和重组DNA技术。这类技术充分解释于这些领域中的普通技术人员已知的文献中,因而不需要在本文中详细描述。同样,关于医学治疗的本发明实践遵循本领域已知的标准方案,并且那些方案不需要在本文中详细描述。

[0039] 在详细描述本发明的实施例之前,应当理解本文所用的术语仅是为了描述特定实施例的目的,而无意于限制。另外,若提供了值的范围,则应该理解,除非上下文另有明确规定,否则也具体公开了该范围上限和下限之间的每个居间的值,至下限的十分之一单位。任何声明的值之间的每个较小的范围或声明的范围中的每个居间的值以及该声明的范围中的任何其他声明的或居间的值涵盖于本发明内。这些较小的范围的上限和下限可独立地包括或排除在该范围内,并且其中限值中的一者、二者包括在该较小范围中或者限值中的二者均不包括在该较小范围中的每个范围也涵盖于本发明内,所声明范围中的任何具体排除的限值除外。若所声明的范围包括限值中的一者或二者,则排除了那些包括的限值中的一者或二者的范围也包括在本发明中。因而应当理解,若给出了值的范围,则该范围内的每个值,以及落入该范围内的每个范围也被固有地叙述,并且不对每个值以及每个可能的值的范围进行具体叙述不是忽略那些值和范围,而是方便读者以及为了本公开简洁起见。

[0040] 除非另外限定,否则本文所用的所有技术和科学术语具有与所述术语所属领域的普通技术人员通常所理解的含义相同的含义。尽管与本文所述的材料和方法类似或等同的任何方法和材料均可用于实践或测试本发明,但现在描述优选的方法和材料。本文提及的所有出版物以引用的方式并入本文以结合所述出版物引用的方法和/或材料公开和描述方法和/或材料。当本公开与任何并入的出版物冲突时以本公开为准。

[0041] 如本文和所附权利要求中所用,单数形式“一个”、“一种”和“该”包括多个指代物,除非上下文另有明确规定。因而,例如,提及“变应原”包括多个这种变应原,并且提及“该样品”包括提及一个或多个样品以及其本领域技术人员已知的等同物,等等。此外,使用可用等同术语描述的术语包括使用那些等同术语。因而,例如,使用术语“受试者”应该理解为包

括术语“动物”、“人”和本领域用于指经受医学治疗者的其他术语。

[0042] 如本文所用,术语“包含”旨在意指构建体、组合物和方法包括所述的元素和/或步骤,但不排除其他元素和/或步骤。“基本上由…组成”在用于限定构建体、组合物和方法时,意指排除任何对所述构建体、组合物和方法具有重要意义的其他元素和步骤。因而,基本上由本文所限定的元素组成的组合物将不排除来自分离和纯化方法的痕量污染物和药学上可接受的载体,如磷酸盐缓冲盐水、防腐剂等等。“由…组成”意指排除衡量元素之外的其他成分以及施用本发明组合物的基本方法步骤。由这些过渡术语每一者限定的实施例在本发明的范围内。

[0043] “嵌合DNA”是较大DNA分子中可鉴定的DNA区段,该DNA区段在天然条件下不与该较大分子相关联存在。因而,当嵌合DNA编码蛋白质区段时,该区段编码序列的旁侧将为在任何天然存在的基因组中不处于该编码序列旁侧的DNA。在旁侧DNA编码多肽序列的情形中,所编码的蛋白质称为“嵌合蛋白”(即具有非天然存在的融合在一起的氨基酸序列的蛋白质)。等位变异或天然存在的突变事件不会产生本文所定义的嵌合DNA或嵌合蛋白。

[0044] 如本文所用,术语“多核苷酸”和“核酸分子”可互换使用来指任何长度的核苷酸聚合形式。多核苷酸可含有脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸和/或它们的类似物。核苷酸可具有任何三维结构,并且可执行任何已知的或未知的功能。术语“多核苷酸”包括例如单链、双链和三螺旋分子、基因或基因片段、外显子、内含子、mRNA、tRNA、rRNA、核糖酶、反义分子、cDNA、重组多核苷酸、支链多核苷酸、适体、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。核酸分子还可包含经修饰的核酸分子(如包含经修饰的碱基、糖和/或核苷酸间连接)。

[0045] 如本文所用,术语“肽”是指两个或更多个亚单元氨基酸、氨基酸类似物或模拟肽的化合物。亚单元可通过肽键或通过其他键(如,作为酯、醚等)连接。术语“肽”在本文中一般用来指肽(即2至约20个残基的多聚氨基酸)、多肽(即约20个残基至约100个残基的肽)和蛋白质(即具有约100个或更多个残基的肽)。

[0046] 如本文所用,术语“氨基酸”是指天然的和/或非天然的或合成的氨基酸,包括甘氨酸以及D或L光学异构体二者,以及氨基酸类似物和模拟肽。如果肽链短的话,三个或更多个氨基酸的肽通常称为寡肽。虽然术语“蛋白质”涵盖术语“多肽”,但“多肽”可以为短于全长的蛋白质。

[0047] 术语“变应原”是指任何天然存在的蛋白质或蛋白质的混合物,所述蛋白质或蛋白质的混合物已据报道在它们重复暴露于个体时诱导变应性反应,即IgE介导的反应。变应原是能够引起变应性反应的任何化合物、物质或材料。变应原通常理解为一亚类抗原,该亚类抗原为能够引起免疫应答的化合物、物质或材料。为了实施本发明,变应原可尤其选自天然的或原本的变应原、经修饰的天然变应原、合成的变应原、重组变应原、类变应原以及它们的混合物或组合。特别要关注的是能够引起IgE介导的速发型超敏反应的变应原。

[0048] 天然存在的变应原的例子包括花粉变应原(如树、杂草、药草和青草花粉变应原)、螨虫变应原(来自例如屋尘螨类和仓储螨类)、昆虫变应原(如吸入物、唾液和毒液起源的变应原)、来自例如动物(如狗、猫、马、大鼠、小鼠等)的唾液、毛发和皮屑的动物变应原、真菌变应原和食物变应原。变应原可以是以下形式:变应原提取物、纯化的变应原、经修饰的变应原或重组变应原或重组突变体变应原、超过30个氨基酸的变应原片段或它们的任何组

合。

[0049] 就它们的化学或生物化学性质而言,变应原可代表天然的或重组的蛋白质或肽、天然的或重组的蛋白质或肽的片段或截短形式、融合蛋白、合成的化合物(化学变应原)、模拟变应原的合成化合物、或通过化学或物理方法变更的变应原如通过热变性修饰的变应原。

[0050] 可通过若干测试将变应原归类为主要变应原。如果至少25%的患者显示出强的IgE结合(3分)并且至少50%的患者显示出中等结合(2分),则变应原通常归类为主要变应原,其中所述结合通过CRIE(交叉放射免疫电泳(Crossed Radio Immune Electrophoresis))测定(CRIE强结合,即一天后X射线胶片上可见的IgE结合;CRIE中等结合,即3天后出现的结合;CRIE弱结合,即10天后出现的结合)。至少10%的患者为强IgE结合将变应原归类为中等变应原,不到10%的患者为明显地特异性结合将变应原归类为次要变应原。其他方法也可用于测定IgE结合,例如IgE印迹法。

[0051] “表位”是一结构,通常由短的肽序列或寡糖构成,其被免疫系统的组分特异性识别或特异性结合。T细胞表位已总体显示为线性寡肽。如果两个表位可被相同抗体特异性结合,则它们彼此对应。如果两个表位二者均能够结合相同的B细胞受体或结合相同的T细胞受体,并且一种抗体与其表位的结合基本上防止另一表位的结合(如少于约30%、优选少于约20%并且更优选少于约10%、5%、1%或约0.1%的其他表位结合),则两个表位彼此对应。

[0052] 如本文所用,如果两条核酸编码序列或它们的互补序列编码相同的氨基酸序列,则这两条核酸编码序列彼此“对应”。

[0053] 如本文所用,与另一序列具有某一百分比(至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约99%)的“序列同一性”的多核苷酸或多核苷酸区域(或者多肽或多肽区域)意指,当手动或使用本领域常规的软件程序进行最佳比对时,在比较的两条序列中该百分比的碱基(或氨基酸)是相同的。

[0054] 当在所限定长度的DNA序列上至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约75%、并且优选至少约80%、并且最优选至少约90或95%的核苷酸匹配时,两条核苷酸序列是“基本上同源的”或“基本上相似的”。类似地,当在所限定长度的多肽序列上多肽的至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约66%、至少约70%、至少约75%、并且优选至少约80%、并且最优选至少约90或95%或98%的氨基酸残基匹配时,两条多肽序列是“基本上同源的”或“基本上相似的”。基本上同源的序列可使用序列数据库(sequence data bank)中可用的标准软件通过比较序列来鉴定。基本上同源的核酸序列也可在DNA杂交实验中在例如严格条件下鉴定,所述严格条件是针对特定系统定义的。定义适当的杂交条件在本领域技术内。例如,严格条件可以是:以5xSSC和50%甲酰胺于42℃下杂交,并以0.1xSSC和0.1%十二烷基硫酸钠于60℃下洗涤。

[0055] 还可提供结构域序列的“经保守修饰的变体”。关于特定的核酸序列,术语“经保守修饰的变体”是指编码相同的或基本上相同的氨基酸序列的那些核酸,或者若核酸不编码氨基酸序列,则是指基本上相同的序列。具体地讲,简并密码子置换可通过生成其中一个或多个选定的(或全部)密码子的第三个位置被混合碱基和/或脱氧肌苷残基置换的序列来实现(Batzer等人,1991,Nucleic Acid Res.《核酸研究》)19:5081;Ohtsuka等人,1985,

J. Biol. Chem. (《生物化学杂志》) 260:2605-2608; Rossolini 等人, 1994, Mol. Cell. Probes (《分子和细胞探针》) 8:91-98)。

[0056] 术语野生型蛋白质的“生物活性片段”、“生物活性形式”、“生物活性等同物”和“功能衍生物”意指使用适于检测活性的测定法测量时所具有的生物活性与野生型蛋白质的生物活性至少基本上相同(如不显著不同)的物质。例如,包含运输域的生物活性片段是可共定位至与包含该运输域的全长多肽相同的区室的片段。

[0057] 当已将外源或异源核酸引入细胞内时该细胞已被该核酸“转化”、“转导”或“转染”。转化DNA可以或不可以与构成细胞基因组的染色体DNA整合(共价连接)。在例如原核生物、酵母和哺乳动物细胞中,转化DNA可维持在附加型元件如质粒上。在真核细胞中,稳定转化的细胞是其中转化DNA已整合进染色体中使得其被子代细胞通过染色体复制而遗传的细胞。该稳定性通过真核细胞建立由一群含有该转化DNA的子代细胞组成的细胞系或克隆的能力来证明。“克隆”是通过有丝分裂衍生自单个细胞或共同祖先的一群细胞。“细胞系”是能够体外稳定生长许多代(如至少约10代)的原代细胞的克隆。

[0058] “复制子”是充当体内DNA复制的自主单位的任何遗传元件(如质粒、染色体、病毒)。

[0059] 如本文所用,“病毒载体”是指包含待体内、离体或体外递送进宿主细胞中的多核苷酸的病毒或病毒颗粒。病毒载体的例子包括但不限于腺病毒载体、腺相关病毒载体、逆转录病毒载体等。在基因转移由腺病毒载体介导的方面,载体构建体是指包含腺病毒基因组或其部分和选定的与腺病毒衣壳蛋白相关联的非腺病毒基因的多核苷酸。

[0060] 如本文所用,“核酸递送载体”是可将所关注的多核苷酸运送进细胞中的核酸分子。优选地,这种载体包含与表达控制序列有效连接的编码序列。然而,所关注的多核苷酸序列不一定包含编码序列。例如,在一个方面,所关注的多核苷酸序列是结合靶分子的适体。在另一方面,所关注的序列是调控序列的互补序列,其结合调控序列以抑制该调控序列的调控。在又一个方面,所关注的序列本身是调控序列(例如,用于滴定出细胞中的调控因子)。

[0061] 如本文所用,“核酸递送媒介物”定义为可将插入的多核苷酸携带进宿主细胞并且与如上所述核酸递送载体相伴出现的任何分子或分子群组或大分子(例如基因或基因片段、反义分子、核糖酶、适体等)。

[0062] 如本文所用,“核酸递送”或“核酸转移”是指将外源多核苷酸(例如转基因)引入进宿主细胞中,而无论用于该引入的方法如何。所引入的多核苷酸可稳定地或暂时地维持在宿主细胞中。稳定的维持通常要求所引入的多核苷酸或者含有与宿主细胞相容的复制起点或者整合进宿主细胞的复制子如染色体外复制子(如质粒)或核或线粒体染色体中。

[0063] 如本文所用,“表达”是指多核苷酸转录成mRNA和/或翻译成肽、多肽或蛋白质的过程。如果多核苷酸源自基因组DNA,则表达可包括转录自基因组DNA的mRNA的剪接。

[0064] 如本文所用,“在转录控制下”或“有效连接”是指多核苷酸序列的表达(如转录或翻译),该表达由表达控制元件和编码序列的适当毗邻控制。在一个方面,当表达控制序列控制和调节DNA序列的转录时,则该DNA序列“有效连接”至该表达控制序列。

[0065] 如本文所用,“编码序列”是当置于适当表达控制序列的控制下时转录并翻译成多肽的序列。编码序列的边界由5'(氨基)端处的起始密码子和3'(羧基)端处的翻译终止密码

子确定。编码序列可包括但不限于原核序列、来自真核mRNA的cDNA、来自真核(如哺乳动物)DNA的基因组DNA序列以及甚至合成的DNA序列。多聚腺苷酸化信号和转录终止序列将通常位于编码序列的3'。

[0066] 如本文所用,“遗传修饰”是指对细胞的正常核苷酸序列的任何添加或缺失或中断。可实现APC的遗传修饰的任何方法均处于本发明的精神和范围内。本领域认识到的方法包括病毒介导的基因转移、脂质体介导的转移、转化、转染和转导,例如病毒介导的基因转移如基于DNA病毒(如腺病毒、腺相关病毒和疱疹病毒)的载体以及基于逆转录病毒的载体的使用。

[0067] 如本文所用,“溶酶体/内体区室”是指含有膜中的LAMP分子、在抗原加工中起作用的水解酶和用于抗原识别和递呈的MHC II类分子的膜结合酸性囊泡。

[0068] 该区室充当通过包括内吞作用、吞噬作用和胞饮作用在内的多种机制中的任一种从细胞表面内化的外来物质以及通过专门的自溶现象递送至该区室的细胞内物质的降解位点(参见例如de Duve, Eur. J. Biochem. 《欧洲生物化学杂志》) 137:391, 1983)。本文所用的术语“内体”涵盖溶酶体。

[0069] 如本文所用,“溶酶体相关的细胞器”是指包含溶菌酶的任何细胞器并且包括但不限于MIIC、CUV、黑素体、分泌粒、裂解性颗粒、血小板致密颗粒、嗜碱颗粒、伯贝克颗粒、吞噬溶酶体、分泌溶酶体等。优选地,这样一种细胞器缺少甘露糖6-磷酸受体并且包含LAMP,但是可能会或可能不会包含MHC II类分子。关于综述,参见例如Blott和Griffiths, Nature Reviews, Molecular Cell Biology 《自然综述,分子细胞生物学》, 2002; Dell'Angelica等人, The FASEB Journal 《FASEB杂志》) 14:1265-1278, 2000。

[0070] 如本文所用,“LAMP多肽”是指LAMP-1、LAMP-2、CD63/LAMP-3、DC-LAMP或任何溶酶体相关膜蛋白或同源物、直系同源物、变体(如等位变体)和经修饰的形式(如包含一个或多个天然存在的或工程改造的突变)。在一个方面,LAMP多肽是哺乳动物溶酶体相关膜蛋白,例如人或小鼠溶酶体相关膜蛋白。更一般地说,“溶酶体膜蛋白”是指包含存在于内体/溶酶体区室或溶酶体相关细胞器的膜中的域并且还包含腔内域的任何蛋白质。

[0071] 如本文所用,“靶向”表示将本发明的嵌合蛋白引导至优选的位点,如发生抗原加工和与MHC II结合的细胞器或区室的多肽序列。照此,“靶向域”是指递送至细胞区室/细胞器所需的一系列氨基酸。优选地,靶向域是结合至接头蛋白或AP蛋白(例如AP1、AP2或AP3蛋白)的序列。示例性的靶向域序列在例如Dell'Angelica, 2000中描述。

[0072] 如本文所用,体内核酸递送、核酸转移、核酸疗法等是指将包含外源多核苷酸的载体直接引入进生物体(如人或非人哺乳动物)的体内,由此将该外源多核苷酸体内引入进这种生物体的细胞中。

[0073] 如本文所用,术语原位是指一种类型的体内核酸递送,其中使该核酸与靶细胞邻近(例如,不系统性地施用该核酸)。例如,原位递送方法包括但不限于在位点处直接注入核酸(例如,注入进组织,如肿瘤或心脏肌肉中)、通过开放的术野使核酸与细胞或组织接触、或者使用医学进入装置如导管将核酸递送至位点。

[0074] 如本文所用,术语“分离的”和“纯化的”有时互换使用来指与各成分(细胞及其他成分)分离,其中在自然界中多核苷酸、肽、多肽、蛋白质、抗体或其片段通常与所述成分相关。例如,对于多核苷酸,分离的多核苷酸是与5'和3'序列分离的多核苷酸,在染色体中该

多核苷酸通常与该5'和3'序列相关联。如对本领域技术人员显而易见的是,非天然存在的多核苷酸、肽、多肽、蛋白质、抗体或其片段不需要“分离”来使其与其天然存在的对应物相区分。此外,术语“分离的”和“纯化的”不意味着完全分离和完全纯化。这些术语用于表示从一些或所有天然与多核苷酸等相关存在的其他物质部分纯化和完全纯化。因而,这些术语可意指从一种天然相关的物质分离或纯化(例如,DNA从RNA分离或纯化)、从同一大类分子的其他物质分离或纯化(例如,与样品中的所有蛋白质相比,特定蛋白质显示出20%的纯度)或任何组合。分离和纯化可意指约1%至约100%(包括100%)的任何水平。照此,“分离的”或“纯化的”细胞群体基本上不含自然界中与之相关联的细胞和材料。所谓基本上不含杂质的或基本上纯化的APC意指细胞群体的至少50%是APC,优选至少70%、更优选至少80%、并且甚至更优选至少90%不含自然界中与之相关联的非APC细胞。当然,本领域的技术人员将认识到,所有具体的值,包括值的分数,均涵盖在这些范围内而无需在本文中列出每个特定的值。为了简洁起见未具体公开各值;然而,读者应该理解,每个具体的值固有地被本发明公开和涵盖。

[0075] 如本文所用,“靶细胞”或“受体细胞”是指单独的细胞或期望为或已经成为外源核酸分子、多核苷酸和/或蛋白质的接受者的细胞。该术语还旨在包括单个细胞的子代,并且由于天然的、偶然的或有意的突变,该子代可不一定与初始的亲本细胞完全相同(在形态上或在基因组或总DNA互补上)。靶细胞可与其他细胞接触(例如,如在组织中)或者可在生物体的体内循环。

[0076] 本文所用的术语“抗原递呈细胞”或“APC”意指在其表面上递呈与主要组织相容性复合体分子或其部分、或者,一种或多种非典型的MHC分子或其部分相关联的抗原的任何细胞。合适的APC的例子在下文中详细地进行了论述并且包括但不限于全细胞如巨噬细胞、树突细胞、B细胞、杂交APC和foster抗原递呈细胞。

[0077] 如本文所用,“经工程改造的抗原递呈细胞”是指在其表面上具有非天然的分子部分的抗原递呈细胞。例如,这样一种细胞在其表面上可能天然不具有共刺激分子或者在其表面上可能除了天然的共刺激分子外还具有额外的人工共刺激分子,或者可在其表面上表达非天然的II类分子。

[0078] 如本文所用,术语“免疫效应细胞”是指能够结合抗原并且介导免疫应答的细胞。这些细胞包括但不限于T细胞、B细胞、单核细胞、巨噬细胞、NK细胞和细胞毒性T淋巴细胞(CTL),例如CTL系、CTL克隆,以及来自肿瘤、炎症或其他浸润物的CTL。

[0079] 如本文所用,术语“受试者”和“患者”可互换使用来指本发明所针对的动物。术语动物应该理解为包括人和非人动物;若两者之间的区别是所需的,则使用术语人和/或非人动物。在实施例中,受试者或患者是脊椎动物,优选哺乳动物,更优选人。哺乳动物包括但不限于鼠类、猿猴、人、农场动物(如牛、绵羊、猪)、运动动物(如马)和宠物(如犬和猫)。

[0080] 临床变态反应症状对本领域技术人员是已知的,并且不需要在本文中给出详尽的清单。非限制性的例子包括鼻炎、结膜炎、哮喘、荨麻疹、湿疹,其包括皮肤、眼、鼻、上呼吸道和下呼吸道中的反应,其中共同症状是例如眼和鼻发红和瘙痒、瘙痒和流鼻涕、咳嗽、气喘、呼吸短促、瘙痒和组织肿胀。

[0081] “免疫性体内测试”的例子是皮肤点刺测试(SPT)、结膜激发测试(CPT)、用变应原进行支气管攻击(BCA)和其中对一种或多种变态反应症状进行监测的各种临床测试。参见

例如Haugaard等人, *J Allergy Clin Immunol* (《变态反应临床免疫学杂志》), 第91卷, 第3期, 第709-722页, 1993年3月。

[0082] 如本文所用, 术语“药学上可接受的载体”涵盖任何本领域已知的标准药用载体, 例如磷酸盐缓冲盐水溶液、水和乳液, 例如油/水或水/油乳液, 以及各种类型的润湿剂。该组合还可包括稳定剂和防腐剂。关于载体、稳定剂和佐剂的例子, 参见Martin Remington's *Pharm. Sei.* (《雷明顿氏药物科学》), 第15版 (伊斯顿市的马克出版公司 (Mack Publ. Co., Easton) (1975))。

[0083] 如本文所用, “治疗有效量”在本文中用于意指足以预防、校正异常的生理反应和/或使之正常化的量。在一个方面, “治疗有效量”是足以使临床重要的病理学特征 (例如肿瘤体的尺寸、抗体产量、细胞因子产量、发烧或白细胞计数或组胺水平) 减少至少约30%、更优选减少至少50%、最优选减少至少90%的量。

[0084] “抗体”是结合特异性表位的任何免疫球蛋白, 包括抗体及其片段。该术语涵盖多克隆抗体、单克隆抗体和嵌合抗体 (如双特异性抗体)。“抗体结合位点”是抗体分子的由重链和轻链可变区和高变区构成的结构部分, 该部分特异性结合抗原。示例性的抗体分子是完整的免疫球蛋白分子、基本上完整的免疫球蛋白分子, 以及免疫球蛋白分子含有互补位的那些部分, 包括Fab部分、Fab' 部分、F(ab')₂部分和F(v) 部分, 这些部分优选用于本文所述的治疗方法。

[0085] 术语“口腔粘膜施用”是指一种施用途径, 其中将剂型置于舌下或口腔别的地方以让活性成分与患者的口腔或咽的粘膜形成接触以便获得该活性成分的局部或系统效果。口腔粘膜施用途径的例子是舌下施用。术语“舌下施用”是指其中将剂型置于舌底部以便获得活性成分的局部或系统效果的施用途径。如本文所用, 术语“真皮内递送”意指将疫苗递送至皮肤中的真皮。然而, 疫苗将不必仅位于真皮中。真皮是人皮肤中位置在距表面约1.0与约2.0mm之间的皮肤中的层, 但个体之间以及身体的不同部分中存在一定量的变化。通常, 通过深入皮肤表面下1.5mm可预计到达真皮。真皮的位置在表面的角质层和表皮与下面的皮下层之间。取决于递送模式, 疫苗可最终仅仅或主要位于真皮层内, 或者其可最终分布在表皮或真皮内。

[0086] 如本文所用, 变态反应免疫疗法、变态反应治疗的语境中的术语“预防”或者描述针对变态反应患者所设计的干预的其他术语意指在所有患者的至少20%中防止IgE应答。术语“预防”不意味着在所有患者中完全防止发展IgE介导的疾病, 并且这样一个定义不在本发明通过减少变态反应症状的机制来治疗变态反应的范围内, 并且与该术语在本领域中的使用不一致。变态反应免疫疗法领域的技术人员众所周知的是, 变态反应治疗不会在100%患者中100%有效, 并因而“预防”的绝对定义在本发明上下文中不适用。本发明设想在本领域认可的预防的概念。

[0087] 本发明提供多聚核酸、多聚氨基酸以及治疗需要所述多聚核酸和多聚氨基酸的受试者的方法。从广义上讲, 该多聚核酸可以认为是用于细胞内产生变应原性序列 (多聚氨基酸) 的核酸 (如DNA、RNA) 疫苗, 该变应原性序列在施用该多聚核酸的受试者的体内引发保护性免疫应答。该多聚核酸在施用, 优先经由MHC-II途径引起细胞介导的免疫应答以及通过激活变应原特异性的1型辅助性T细胞 (Th1) 细胞应答 (伴随由APC、NK细胞和T细胞产生干扰素) 而不是Th2型应答引起IgG抗体的产生, Th2型应答涉及IgE抗体、粒细胞 (如嗜酸性粒

细胞)和其他物质的产生。在一定程度上,MHC-II和MHC-I应答二者均可产生。然而,本发明提供了一种应答,其主要或者基本上是MHC-II应答。优选地,该核酸不编码抗生素抗性基因。

[0088] 本发明至少部分地基于这样的认识:某些结构(并因而功能)元件的组合可为核酸疫苗和所编码的变应原提供有利的特性,从而使得变态反应治疗方法满足本领域尚未得到的需求。在本发明的多个实施例(旨在将这些实施例理解为作为独立的实施例单独存在以及理解为组合了独立实施例的两种或更多种特征的实施例)中,该组合包括使用溶酶体运输域来将变应原氨基酸序列引导至具有MHC II蛋白的溶酶体。这样做使得对变应原序列主要发生IgG应答而不是IgE应答。另外,独立的实施例或者实施例的组合提供构建体,该构建体含有一定长度的核酸序列,该长度足以编码可提供表位的天然存在的三维结构的氨基酸序列。在优选的实施例中,核酸序列提供/编码全长变应原编码序列,但是其缺少与该变应原序列相关联的任何天然存在的信号肽序列。在其它实施例中,该核酸序列编码变应原的至少一个变应原性区域,而不是全长变应原蛋白质(并且还缺少信号序列,如果该信号序列天然存在的话)。尽管本领域认识到可产生对抗表位的一级序列的免疫应答,但是本发明认识到,用于产生针对所编码的表位的MHC-II免疫应答的核酸疫苗优选使用这样的核酸构建体:其编码足够的序列数据以至少在将变应原性序列递送至溶酶体进行加工时,在包含变应原性表位的区域中产生正确的三维肽结构。虽然不限于任何特定的分子理论,据信将进行正确的三维折叠的蛋白质、多肽或肽递送至内体可改善变应原性表位的加工和递呈以供免疫应答。

[0089] 作为可单独地或作为实施例的组合的一部分实施的实施例的另一个例子,提供了从单个构建体表达多种变应原。至今,尚未表明可有效地制备和使用防范变应原的核酸疫苗。本发明不仅提供对抗变应原的有效核酸疫苗,而且还提供同时对抗多种变应原的有效核酸疫苗。变应原可以是来自相同来源(如单种植物)的变应原,或者可以是来自两种或更多种来源(如树、花、食物等)的变应原。如上所述,可以使用全长变应原序列(缺少变应原的任何天然相关的信号序列),或者可以使用变应原性部分。在包含多种变应原序列的构建体中,可以使用全长或截短的变应原序列的任何混合物。另外,就其他实施例而言,优选的是移除每条变应原序列的天然存在的信号序列(即每条变应原序列的天然存在的信号序列不存在于构建体中)。

[0090] 尽管已发现将信号序列用于变应原域内的独立变应原性序列对核酸构建体的功能是有利的,但已经发现,在该核酸疫苗构建体内使用信号序列区或域是一重要的特征。照此,在实施例中,核酸疫苗在信号序列域内包括至少一条信号序列以将所编码的肽引导至膜并穿过膜。尽管信号序列的氨基酸序列在构建体与构建体之间可有所不同,并且可以选择任何已知的信号序列,但已经发现在优选的实施例中,信号序列是存在的并且与变应原序列的编码序列在框内提供。单条信号序列的使用足以将整个编码的嵌合蛋白引导至膜并穿过膜。照此,信号序列用于每条变应原序列是不必要的,并且事实上,已发现对变应原表位在免疫细胞表面的正确定位、加工和表达是有利的。

[0091] 此外,在具体的实施例中以及在实施例的组合中,已经发现,在多肽从胞质向内体转移的过程中,包括在内体中在多肽切割成用于在细胞表面递呈的单元之前的时候,变应原序列的整合或物理保护在提供有用的根据本发明的核酸疫苗方面可能是重要的因素。照

此,一般而言,本发明包括包含细胞器内稳定化域(IOSD)以保护变应原序列的构建体。

[0092] 本发明的核酸包含至少以下域:信号序列域;细胞器内稳定化域;变应原域(其可包含单种变应原或两种或更多种变应原,各包含一个或多个变应原性表位);跨膜域;和胞质溶酶体/内体靶向域。各个域存在于单个嵌合的或经工程改造的核酸上。各个域可用本领域已知且广泛实践的技术以任何线性顺序组合。在优选的实施例中,对各域进行组合和布置使得它们构成编码嵌合蛋白的单个开放阅读框,该开放阅读框与足以表达该嵌合蛋白的转录元件有效连接。该核酸因而可以是表达载体,例如质粒、噬菌粒、病毒载体等。优选地,该核酸包含适于在哺乳动物细胞如人细胞中表达的转录元件。这种表达载体元件和表达载体是本领域已知并广泛使用的,如美国专利申请公开No. 2004/0157307所示例的,将该专利申请公开以引用的方式并入本文。用于产生根据本发明的核酸构建体的质粒骨架的非限制性例子在本文有时候称为“pITI”质粒,其序列以SEQ ID NO:1提供。

[0093] 本发明的核酸的三种示例性构型分别在图1、3和4中以示意图绘出。图1示出了域的顺序布置方式,其中在所编码的嵌合蛋白中包括包含单个表位的单种变应原。图3示出了域的顺序布置方式,其中单种变应原的多个不同表位包括在所编码的嵌合蛋白的变应原域内。这两个表位被布置成使得它们处于同一阅读框中并因而二者均作为嵌合蛋白的一部分产生。本领域的技术人员将立刻认识到,可使用标准的分子生物学技术在同一阅读框中在表位域内提供三个或更多个表位。图4示出了域的顺序布置方式,其中两种不同的变应原存在于变应原域中。当然,技术人员将认识到各变应原序列可含有一个或多个变应原性表位。根据本发明核酸的实施例的这三个示意图,读者将立刻认识到,来自任何数目的来源并且含有任何数目的表位的任何数目的变应原可包括在变应原域内,并且使用标准的分子生物学技术连接在框内。

[0094] 图2绘出了根据本发明的一个实施例的核酸的载体图谱(“pITI-CRY J2-LAMP”;在本文中有时候也称为“CRYJ2-LAMP”),其与图1中以示意图绘出的本发明实施例大致相关。该载体或递送媒介物包括具有pUC复制起点和用于所编码的蛋白质产生的各种转录和表达元件的质粒骨架。更具体地讲,其包括pITI骨架的序列(SEQ ID NO:1)。应该注意,根据本发明的优选实施例,该核酸构建体不包括抗生素抗性基因。该核酸还包含所编码的蛋白质的序列,该序列包含人LAMP蛋白的N端区,该N端区包括信号序列和细胞器内稳定化域。该核酸还提供所编码的蛋白质的序列,该序列包含与LAMP蛋白的N端区框内融合的CryJ2变应原序列(缺少其信号序列)。该核酸还包括编码人LAMP蛋白的C端区的一部分的序列,该部分包括跨膜区和靶向区。CRY J2-LAMP嵌合蛋白序列的编码区作为SEQ ID NO:2提供。CRY J2-LAMP嵌合蛋白的氨基酸序列作为SEQ ID NO:3提供。

[0095] 在示例性的实施例中,本发明还涉及用于日本柳杉的其他变应原(包括CryJ1变应原)的递送和表达的核酸构建体。使用相同的质粒骨架,已经产生了pITI-CRYJ1-LAMP构建体。该嵌合蛋白可引发MHC II型免疫应答。pITI-CRYJ1-LAMP构建体的编码区作为SEQ ID NO:4给出。CRY J1-LAMP嵌合蛋白的氨基酸序列作为SEQ ID NO:5提供。

[0096] 如图3和4中所示,变应原域可包括具有多个变应原性表位的变应原,或者可包括多种变应原(各具有一个或多个变应原性表位)。图5绘出了核酸构建体的一个特定示例性实施例的载体图谱,其中变应原域包括两条变应原性序列。在该示例性实施例中,变应原域含有日本柳杉的CryJ1和CryJ2变应原(各缺少其天然的信号序列),该变应原与LAMP信号序

列域和细胞器内稳定化域框内融合并且在N末端融合。CryJ1-CryJ2序列还在C末端与LAMP跨膜域和靶向域融合。该嵌合蛋白的编码区的全部核苷酸序列以SEQ ID NO:6给出。所编码的嵌合蛋白的全部氨基酸序列以SEQ ID NO:7给出,其中:残基1-27代表该嵌合蛋白的信号序列;残基28-380代表细胞器内稳定化域(取自人LAMP的序列);残基381和382代表连接物;残基383-735代表CryJ1的编码区(无其信号序列);残基736-741代表连接区;残基742-1232代表CryJ2变应原的编码区;残基1233-1234代表连接区;残基1235-1258代表跨膜和靶向域;并且残基1259-1270代表额外的C端残基。

[0097] 本发明的核酸构建体在可协同产生的变应原数目方面基本上是有限的。照此,两种、三种、四种、五种、六种、十种、二十种或更多种不同的变应原(来自相同来源或不同来源的混合物)可包括在本发明的核酸构建体中。图6A给出了根据本发明实施例的另一示例性核酸的载体图谱。该载体或递送媒介物包括具有pUC复制起点和用于所编码的蛋白质产生的各种转录和表达元件的质粒骨架。骨架可以是但不一定是SEQ ID NO:1的pITI骨架。该核酸还包含所编码的蛋白质的序列,该序列包含人LAMP蛋白的N端区,该N端区包括信号序列域和细胞器内稳定化域。该核酸还提供所编码的嵌合蛋白的序列,该序列包含花生变应原多聚蛋白AraH1/AraH2/AraH3。该核酸还包括编码人LAMP蛋白的C端区的一部分的序列,该部分包括跨膜区和靶向区。该嵌合蛋白的编码区的核苷酸序列以SEQ ID NO:8提供。由图6A的载体编码的嵌合蛋白在图6B中以示意图给出(并且以SEQ ID NO:9给出)。

[0098] 存在于本发明的核酸中的域在下文中就所编码的嵌合蛋白提供的功能进行了更详细的描述。应当理解,本发明的实践不依赖于或受限于任何特定的核酸或蛋白质序列,而是,其为给构建体提供优点和特性的各元件和各域的组合。还应当理解,当在所编码的蛋白质的物理和功能特性的语境下论述时,描述是关于核酸构建体的各域,并且反之亦然。其足以告知本领域技术人员所述核酸或蛋白质的物理和功能特性。利用计算机和遗传密码的简并性来获得编码已知蛋白质序列的所有可能的核酸分子以及来获得由核酸编码的蛋白质是简单的事情。因而,提及特定蛋白质序列的物理或功能特性就立刻给技术人员公开了与该物理或功能特性相关的所有可能的核酸序列,反之亦然。

[0099] 对两种或更多种核酸分子或序列进行设计和组合以获得编码根据本发明的嵌合蛋白的序列也完全处于本领域技术人员的技术范围内。同样,选择和组合转录和翻译控制元件来根据需要体内或体外表达编码序列和嵌合蛋白也完全在技术人员的能力范围内。因此,这些通常使用的技术不需要在本文中详细论述来使得能实践本发明。

[0100] 本发明的核酸包含信号序列域。信号序列域含有信号序列,该信号序列用于编码的嵌合蛋白插入进限定外部环境于内部环境之间的边界的生物膜中。信号序列还引导蛋白质从外部环境向内部环境的转移。信号序列的一般结构是本领域所熟知的,因为有特定信号序列的许多例子。实践者可根据针对落入本发明范围内的每个实施例的各种选择参数随意选择任何适当的信号序列。在示例性的实施例中,信号序列是将嵌合蛋白引导至内质网的信号序列。此刻值得注意的是,信号序列域仅仅是嵌合蛋白含有信号序列的部分。照此,在将变应原序列包括在构建体中之前,存在于变应原域中的变应原的天然存在的信号序列已被移除。已经发现的是,移除这些单独的信号序列可改善构建体在体内的总体性能。

[0101] 本发明的核酸包含细胞器内稳定化域(IOSD)。该IOSD包含编码氨基酸序列的序列,该氨基酸序列经由化学键与变应原域中的一条或多条序列结合并且在嵌合蛋白到达内

体/溶酶体区室中之前保护那些序列免于降解(如蛋白水解)。本质上,可将IOSD设想为变应原域序列的保护帽,防护那些序列,尤其是变应原性表位序列,以免受蛋白水解酶、低pH和其他蛋白质去稳定化物质和条件的影响。IOSD可以是许多已知的或经工程改造的序列的任一者,包括但不限于LAMP多肽腔内域和巨涎蛋白/CD68蛋白,巨涎蛋白(macrosialin)/CD68蛋白为在巨噬细胞和巨噬细胞样细胞中作为晚内体蛋白表达的高度糖基化的跨膜蛋白。IOSD的关键特征是IOSD与变应原域结合并保护其免于蛋白水解直至MHC II类分子从不变肽释放的能力。以该方式,变应原性表位的三维结构得以保持直至活性的MHC II类分子可供相互作用。在优选的实施例中,IOSD包含溶酶体蛋白的全部或部分序列。在一些实施例中,IOSD是除了LAMP多肽腔内域之外的蛋白质或多肽,例如但不限于巨涎蛋白/CD68。

[0102] 本发明的核酸构建体包含变应原域。变应原域包含编码包含一个或多个变应原性表位的变应原蛋白、多肽或肽的一条或多条序列。变应原域不包括来自存在的变应原的信号序列。许多蛋白质性变应原是本领域已知的,并且变应原和/或变应原性表位中的任一者或组合可根据本发明使用。若使用短于全长的变应原性序列,则优选地,将全长变应原蛋白的一个或多个表位于它们在该变应原性蛋白内的天然位置背景中提供。更具体地讲,本发明提供改良的核酸疫苗,其中该疫苗编码嵌合蛋白,该嵌合蛋白保留或基本保留它们的三维结构直至MHC II类分子能够结合该嵌合蛋白上的表位。以该方式,与将短肽递送至MHC II类分子相比,可引发改善的免疫应答,所述短肽通常将缺少适当的三维结构。因此,优选的是变应原域编码包括一个或更多个表位(如果最初存在于变应原蛋白质上的话)的相对较长的氨基酸序列。

[0103] 变应原域可包括两种或更多种变应原,各含有一个或更多个变应原性表位。众所周知的是某些变应原性蛋白质含有两个或更多个表位。因为本发明的优选实施例使用变应原性蛋白质的整个变应原性编码区(即缺少信号序列的编码区)或其本质部分,所以某些变应原域将包括处于其天然存在的关系的两个或更多个表位。或者,两个或更多个已知的表位可融合进一个编码区。再一次,在示例性的实施例中,两种或更多种变应原性蛋白质或其变应原性区域存在于变应原域中。若对两个或更多个表位进行工程改造而存在于单个表位域中,则所述表位可来自同一抗原蛋白。或者,它们可来自同一物种的两种不同蛋白质。再一次,它们可来自两种不同物种的同一蛋白质。此外,它们可来自两种或更多种不同物种的两种或更多种不同蛋白质。本质上,本发明设想了来自相同或不同物种的相同或不同蛋白质的表位的任何组合。同样,各变应原和表位的顺序可以可想象的任何方式变动。来自多个物种的变应原性蛋白质和/或变应原性肽的混合使得能产生稳健的核酸疫苗,该疫苗基于多种变应原可为针对单种来源的生物体(如,特定物种的树)的变态反应提供治疗,以及基于多种变应原可为针对多种来源的生物体(如,在一年的同一季节期间释放孢子的多种植物)的变态反应提供治疗。由单种核酸疫苗对抗多种变应原的能力迄今尚未证明。

[0104] 本发明的核酸构建体还包含跨膜域。跨膜域是蛋白质的众所周知的且得到充分表征的物理和功能元件,其部分存在于生物膜的两侧上。本质上,跨膜域是性质通常是疏水性或亲脂性并且用于将蛋白质锚定在生物膜处的氨基酸的线性序列。一般来讲,这类序列长度为20-25个残基。本领域的技术人员非常清楚这类序列并且可容易获得或工程改造合适的跨膜序列以用于本发明。

[0105] 除了上面论述的元件,本发明的核酸还包含靶向域。靶向域是编码氨基酸序列的

序列,该氨基酸序列用于将所编码的嵌合蛋白靶向至内体/溶酶体区室。虽然不如此受限于其身份,但在优选的实施例中,靶向域包含LAMP多肽的C端胞质靶向序列、DC-LAMP、LAMP2、LAMP-3、LIMP II、ENDOLYN或巨涎蛋白/CD68。

[0106] 在实施例中,本发明的核酸在变应原域中包含SEQ ID NO:2(即缺少其信号序列的Cry J2核苷酸序列)的序列或编码SEQ ID NO:3(即缺少其信号序列的Cry J2蛋白质序列)的另一序列作为变应原域的一部分。SEQ ID NO:2由编码Cry J2的整个蛋白质编码序列的核苷酸组成,其信号序列除外(即SEQ ID NO:2),Cry J2为存在于日本柳杉花粉中的一种果胶裂解酶蛋白。本领域众所周知Cry J2与存在雪松花粉的区域中的季节性和持续性变态反应相关。Cry J2特异性的IgE通常存在于接近雪松林的区域中的变态反应患者中。应该注意,在作为本发明公开内容的一部分提供的序列表中,对每种变应原的信号序列(如果存在的话)进行了注解。应当理解,在本发明构建体的背景下,这些信号序列不存在。

[0107] 在其它实施例中,核酸包含SEQ ID NO:4(即Cry J1核苷酸序列,缺少其信号序列)的序列或编码SEQ ID NO:5(即Cry J2蛋白质序列,缺少其信号序列)的另一序列。在其他实施例中,核酸包含SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:4二者的序列或分别编码SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:5的其他序列。在实施例中,核酸包含一种或多种本文所公开的其他序列,例如编码任何以下变应原的那些:Cry J3(Cry J3.8;日本柳杉;SEQ ID NO:10;信号序列为残基1-26)、CJP-4(日本柳杉;SEQ ID NO:11)、CJP-6(日本柳杉;SEQ ID NO:12)、CJP-8(日本柳杉;SEQ ID NO:13;信号序列为残基1-35)、CPA63(日本柳杉;SEQ ID NO:14;信号序列为残基1-20)、CJP38(日本柳杉;SEQ ID NO:15;信号序列为残基1-28)、Cha o 1(日本扁柏(C.obtuse);SEQ ID NO:16;信号序列为残基1-21)、Jun a 1(阿斯赫刺柏(J.ashei);SEQ ID NO:17;信号序列为残基1-21)、Jun v 1(北美圆柏(J.virginiana);SEQ ID NO:18;信号序列为残基1-21)、Cup a 1(亚利桑那赫克萨拉(H.arizonica);SEQ ID NO:19;信号序列为残基1-21)、Jun o 1(酸刺柏(J.oxycedrus);SEQ ID NO:20;信号序列为残基1-21)、Cup s 1(地中海柏木(C.sempervirens);SEQ ID NO:21;信号序列为残基1-21)、Cha o 2(日本扁柏;SEQ ID NO:22;信号序列为残基1-22)、Jun a 2(阿斯赫刺柏;SEQ ID NO:23;信号序列为残基1-22)、Cup a 2(亚利桑那赫克萨拉;SEQ ID NO:24)、Jun a 3(阿斯赫刺柏;SEQ ID NO:25;信号序列为残基1-16)、Jun r 3(杜松(J.rigida);SEQ ID NO:26;信号序列为残基1-26)、Cup s 3(地中海柏木;SEQ ID NO:27;信号序列为残基1-26)、Cup a 3(亚利桑那赫克萨拉;SEQ ID NO:28)、Ch4A(加州山松(P.monticola);SEQ ID NO:29;信号序列为残基1-25)、Ch4-1(花旗松(P.menziesii);SEQ ID NO:30;信号序列为残基1-26)、PT-1(火炬松(P.taeda);SEQ ID NO:31)和LTP(欧洲云杉(P.abies);SEQ ID NO:32;信号序列为残基1-25)。未参考SEQ ID NO列出的核酸和氨基酸序列也可公开获得。根据核酸序列,仅通过计算机程序实施就能获得根据本发明的蛋白质序列。当然,这些蛋白质序列的在生物化学上同源的序列也为这些实施例所涵盖。例如,与所公开的序列显示出30%或更高的同一性,例如40%或更高、50%或更高、75%或更高、90%或更高、95%或更高、98%或更高或者99%或更高的同一性的序列为这些实施例所涵盖。应当理解,该概念不仅适用于本文所公开的变应原的特定序列,而且还适用于本文提供的所有蛋白质和核酸序列。另外,如上所述,所公开的范围内的每个值应该理解为被本公开具体地涵盖。

[0108] 在本发明的特定例子中,提供了在变应原域中包含SEQ ID NO:2或编码SEQ ID

NO:3的另一序列的DNA疫苗。当将这样一种疫苗施用给存在相当的日本柳杉变态反应迹象的患者时,该疫苗导致从头合成包含变应原Cry J2(在SEQ ID NO:3中给出)的融合或嵌合(这两个术语在本文中可互换使用)蛋白。由于该嵌合蛋白上存在的域的组合,该蛋白质被从内质网引导进内吞溶酶体途径中,从而导致在MHC囊泡中将该融合蛋白加工成表位,一些表位与MHC II类分子结合,从而导致增强的体液免疫应答。

[0109] 在本发明的另一个例子中,提供了在变应原域内包含SEQ ID NO:4的序列或编码SEQ ID NO:5的另一序列的DNA疫苗。当将这样一种疫苗施用给存在相当的日本柳杉变态反应迹象的患者时,该疫苗导致从头合成包含变应原Cry J1(在SEQ ID NO:4的序列中给出)的融合或嵌合(这两个术语在本文中可互换使用)蛋白。由于该嵌合蛋白上存在的域的组合,该蛋白质被从内质网引导进内吞溶酶体途径中,从而导致在MHC囊泡中将该融合蛋白加工成表位,一些表位与MHC II类分子结合,从而导致增强的体液免疫应答。

[0110] 在本发明的另一个例子中,提供了在变应原域中包含SEQ ID NO:6的DNA疫苗。当将这样一种疫苗施用给存在相当的日本柳杉变态反应迹象的患者时,该疫苗导致从头合成包含变应原Cry J1和Cry J2(SEQ ID NO:7)的融合或嵌合(这两个术语在本文中可互换使用)蛋白。由于该嵌合蛋白上存在的域的组合,该蛋白质被从内质网引导进内吞溶酶体途径中,从而导致在MHC囊泡中将该融合蛋白加工成表位,一些表位与MHC II类分子结合,从而导致增强的体液免疫应答。

[0111] 在本发明的另一个例子中,在变应原域中提供了编码Jun a 1的整个蛋白质编码序列的核酸,Jun a 1为属于阿斯赫刺柏属的果胶酸裂解酶。Jun a 1展示出与Cry J1具有高度序列同一性并且保留与Cry J1相似的酶活性且在已知的表位中具有高度相似性。

[0112] 众所周知其他多肽与Cry J1具有交叉反应性并且该交叉反应性是由于共享与果胶酸裂解酶家族多肽的酶活性相关的表位。该家族包括日本扁柏的主要变应原(日本扁柏(Ch o 1)),并且包括来自以下的变应原:阿斯赫刺柏(Jun a 1)、北美圆柏(Jun V 1)、亚利桑那柏木(Cupressus arizonica)(Cup a 1)、酸刺柏(Jun o 1)和地中海柏木(Cups 1)。在文献中已经观察到,变态反应患者中存在对来自雪松科(柏木属(Cupressus))的花粉的强交叉反应性。下面的表I描绘了示出相关蛋白质之间的交叉反应性水平的表。虽然就Cry J1和Cry J2详细地描述了本发明,但应当理解除了Cry J1和Cry J2序列或者作为Cry J1和Cry J2序列的替代形式,还可使用本文中并且尤其是表I中公开的一种或多种变应原。

[0113] 表I:日本柳杉与其他变应原的交叉反应性

日本柳杉	Cha o 1	Jun a 1	Jun V 1	Cup a 1	Jun o 1	Cup s 1	Cha o 2	Jun a 2	Cup a 2	Jun a 3	Jun r 3	Cup s 3	Cup a 3
Cry J1	80%	79%	80%	75%	85%	85%							
Cry J2							74%	71%	80%				
Cry J3										86%	87%	85%	87%

[0114]

	日本 柳杉	Ch4A	Ch4-1	PT-1	LTP
[0115]	CJP-4	70%	57%		
	CJP-6			74%	
	CJP-8				45%
	CPA63				

[0116] 本领域众所周知的是,用于将编码区的核苷酸序列插入进不同编码区的核苷酸序列中的某些位点(即融合位点)比其他位点更有利。在例如图1-5中教导的变应原序列的位置被教导为对使用本发明中教导的组合物是有利的位置。将变应原序列的位置移至其他位置,例如LAMP多肽的腔内域或其他细胞器内稳定化域中是在本发明的范围内。然而,优选的是变应原不设置在跨膜域或胞质域的编码区内。在本发明的优选例子中,将变应原序列插入进LAMP多肽的腔内域中,在距离与跨膜域的接合点5个氨基酸和LAMP多肽腔内域的5'N端侧上最多20个氨基酸之内。

[0117] 本发明的核酸可作为纯化的或分离的分子提供。该核酸还可作为组合物的一部分提供。该组合物可基本上由核酸组成,意指该核酸是适于编码序列表达的组合物中的唯一核酸。或者,该组合物可包含本发明的核酸。在示例性的实施例中,该组合物是包含本发明的核酸以及一种或多种药学上可接受的物质或载体的药物组合物。在一些实施例中,该组合物包含促进细胞摄入核酸的物质。在一些实施例中,该组合物包含有助于将核酸递送至特定细胞类型如免疫细胞(例如APC)的靶向分子。在实施例中,所述核酸是用于递送所述核酸至细胞或组织的递送媒介物或递送载体的一部分。

[0118] 在本发明的特定例子中,该组合物包含两种DNA疫苗的混合物,其中一种疫苗包含一种变应原的序列并且其中另一种疫苗包含另一种变应原的序列。可以1:1、1:2、1:3、1:4,依序最高至1:10的比例将这两种疫苗构建体混合在一起。优选的比例是1:1。

[0119] 在本发明的特定例子中,Cry J1、Cry J2和/或Jun a2的核酸存在于核酸递送载体中。在本发明的优选实施例中,该核酸递送载体不含抗生素抗性基因,如美国专利申请公开No. 2008/006554所教导的核酸递送载体或美国专利申请公开No. 2006/003148中所公开的载体或由该专利申请公开得到的载体。在本发明的特定例子中,该核酸是病毒载体,例如腺病毒载体。

[0120] 该核酸和组合物是新颖的并且可用作减少患者中的变态反应的药剂。例如,该核酸和组合物可用于减轻具有经证实的与日本柳杉花粉相关或由同源的花粉或变应原引起的变态反应的患者中的花粉症。作为另一非限制性例子,该核酸可用于减轻食物变态反应,例如针对花生或其他坚果的变态反应。递送核酸和组合物来治疗由日本柳杉花粉引起的花粉症,使得该核酸和组合物转染抗原递呈细胞,导致对Cry J1和/或Cry J2内所含的表位具有特异性的免疫球蛋白G(IgG)的血清水平增加。该应答可用于减轻变态反应症状。递送其他变态反应的变应原(包括豚草、其他树的花粉和食物)也导致IgG的血清水平增加。

[0121] 本发明还提供治疗有需要的受试者的方法。该方法是预防性治疗或治疗性治疗遭受针对一种或多种变应原的变态反应或有发展该变态反应的风险的受试者的方法。该方法包括给受试者以足以引起APC摄入和表达根据本发明的DNA疫苗的量施用根据该DNA疫苗。

该DNA疫苗的表达导致所编码的变应原性表位递呈在APC上,并发展IgG免疫应答。

[0122] 在本发明的特定例子中,将SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4和/或另一变应原编码序列施用给细胞。在优选的实施例中,该细胞是抗原递呈细胞,如树突细胞。优选地,树突细胞是人树突细胞。本发明可通过本领域已知为核酸疫苗的有效递送方法的方法施用,包括肌内注射、皮下注射、电穿孔、基因枪免疫接种或脂质体介导的转移。

[0123] 本发明提供可用于治疗与日本柳杉相关的花粉症的制剂。此前已经确定,将编码变应原的蛋白质编码序列的DNA质粒递送给动物可增加IFN- γ 产量和降低IL-4产量,其可用于治疗对特异性变应原会出现变态反应的动物。本发明提供用于治疗具有与日本柳杉花粉相关的变态反应的患者的改良的DNA疫苗组合物。本发明的融合蛋白具有与MHC II类囊泡相交的特异性细胞内运输模式,并导致变应原表位向免疫系统的增强递呈,从而尤其是导致增强的抗体应答。本发明所提供的核酸和组合物可用于进行变态反应免疫疗法。

[0124] 本发明提供一种制剂,其在施用给细胞时导致增加的特异性抗体应答。增加的对变应原的抗体应答可用于治疗IgE介导的变应性疾病。IgE具有与其细胞限制以及在结合同源变应原时所导致的细胞内信号传导相关的某些特性。当B细胞接受Th2细胞分泌的IL-4时产生对抗变应原的IgE。这有助于指导B细胞产生IgE类抗体。由B细胞分泌时,IgE结合至Fc ϵ RI(由肥大细胞和嗜酸性粒细胞表达的其高亲和力受体),从而导致这些细胞和该动物变得对后来的变应原暴露敏感。因此,在摄取、吸入或粘膜接触变应原时,可引发变态反应的症状。由于抗体的结合特性,已经提出,减轻变态反应症状的一种方式是通过用其他抗体类型进行竞争来螯合可供IgE结合的游离变应原。具体地讲,增加IgG的变态反应制剂已被提出为减轻变应性疾病的途径。本文描述的发明诱导增强的IgG产生,从而以临床上显著的方式引起IgE与IgG比例的降低。已进行的研究的结果表明,在第98天,由Cry J2-LAMP构建体诱导的IgG水平大于通过递送编码未经修饰的Cry J2的核苷酸所诱导的IgG水平。

[0125] 在本发明的另一个例子中,教导了一种方法,该方法用于选择雪松树花粉中存在的果胶酸裂解酶多肽来确定与Cry J1(一种果胶酸裂解酶)的氨基酸或核酸序列的序列同源程度,从而可产生与Cry J1相似的物质的新组合物,并且从而施用该物质的同源组合物给患者将产生可用于治疗与雪松花粉相关的变态反应的治疗结果。

[0126] 实例

[0127] 现在将参照本发明的示例性实施例描述本发明。以下实例旨在使读者能更好理解本发明构建体的构造和活性,而不应该理解为限制本发明的范围。

[0128] 实例1:通用的材料和方法

[0129] 免疫和血清收集

[0130] 从马里兰州弗雷德里克市的哈伦实验室(Harlan Laboratories, Frederick, Maryland)购买六到八周龄的雌性BALB/c小鼠并在我们在马里兰州洛克维尔市(Rockville, Maryland)的动物设施中饲养。用100 μ l体积无菌PBS中的50 μ g质粒DNA以肌内或真皮内的方式进行DNA免疫。通过眼眶采血获得血清并在-20 $^{\circ}$ C下保存供后面的分析。为了致敏,给小鼠注射5 μ g/ml重组CRYJ2(rCRYJ2)或重组CRYJ1(rCYRJ1)以及100 μ l明矾(2mg/ml),总体积为200 μ l。每周一次对小鼠进行采血并通过ELISA针对CRY J特异性抗体分析血清。

[0131] 豚鼠

[0132] 在马里兰州林冠线的春之谷实验室(Spring Valley Laboratories(Woodline, MD))购买雌性豚鼠并圈养。用200 μ l体积无菌盐水中的100 μ g质粒DNA以肌内的方式进行DNA免疫接种。通过心脏采血获得血清并在20 $^{\circ}$ C下保存供后面的分析。

[0133] CYRJ2特异性免疫球蛋白应答的检测

[0134] 在4 $^{\circ}$ C下用PBS中的rCRYJ2以5 μ g/ml的浓度包被Nunc Maxisorp免疫测定板。在用PBS中的1%BSA封闭后,将血清稀释在含有0.05%吐温20的PBS(PBS-T)中,加入该血清并温育1小时。使用过氧化物酶缀合的山羊抗小鼠IgG、IgG1或IgG2a抗体(杰克逊实验室(Jackson Laboratories))检测与固定在孔上的CRY J2结合的IgG、IgG1或IgG2a。添加TMB底物(KPL)并用TMB终止溶液终止酶活性。在450nm下读板。在某些情况下,使用Sure终止溶液(Sure Stop Solution)(KPL)并在650nm下读板。

[0135] 供细胞因子测量的脾细胞的制备

[0136] 无菌移出脾脏并挑取而制备单细胞悬浮物。为了研究初级应答,将脾细胞在24孔板(4 \times 10⁵个细胞/孔)中在存在或不存在10 μ g/ml、5 μ g/ml或2.5 μ g/ml rCRYJ2的情况下培养72小时。

[0137] 细胞因子测定法

[0138] 通过ELISA针对IFN- γ 和IL-4的存在对上清液进行测定。将匹配的抗体对用于IFN- γ 和IL-4并根据制造商的说明书来进行。用小鼠重组IFN- γ 和IL-4生成标准曲线。所有抗体和细胞因子均购自加利福尼亚州卡尔斯巴德市的英杰公司(Invitrogen, Carlsbad, CA)。IFN- γ 和IL-4测定法的检测极限分别为20和10pg/ml。

[0139] 实例2:从构建体表达变应原

[0140] 为了显示本发明的核酸构建体可用于在转化的细胞中表达一种或多种变应原,用CryJ2-LAMP质粒、CryJ1+J2-LAMP质粒(图4)、CryJ1-LAMP质粒、CryJ1质粒(缺少CryJ1信号序列;图7)和单独的基础质粒载体(阴性对照;SEQ ID NO:1)转染人293细胞。实验的结果在图9中示出。

[0141] 图9A示出了转染反应的结果,用抗CryJ2抗体进行检测。简而言之,将三十微克的细胞裂解物进行电泳,然后转移至膜进行免疫印迹分析。通过用CryJ2单克隆抗体产生免疫印迹,然后进行化学发光来检测蛋白质。从图中可以看到,检测到包含单独的CryJ2变应原以及CryJ1+CryJ2变应原的构建体(泳道2和3),而未检测到其他变应原。在该实验中,在实验之前移除了CryJ1和CryJ2变应原的天然存在的信号序列,泳道5中的构建体除外。这些结果显示,不仅本发明的构建体适于表达变应原,而且多种变应原可共同表达。

[0142] 图9B示出了转染反应的结果,用抗CryJ1抗体进行检测。简而言之,将三十微克的细胞裂解物进行电泳,然后转移至膜进行免疫印迹分析。通过用CryJ1单克隆抗体产生免疫印迹,然后进行化学发光来检测蛋白质。从图中可以看到,检测到包含CryJ1+CryJ2变应原(缺少天然信号序列)的构建体(泳道3),包含已移除天然存在的信号序列的CryJ1变应原的构建体(泳道5)也是如此。然而,其中Cry1变应原包括其天然信号序列的构建体未检测到。这些结果显示,本发明的构建体适于表达和检测多种变应原,并且移除天然存在的信号序列在表达和检测产物方面是重要的。

[0143] 实例3:支持构建体的MHC II加工途径的数据

[0144] 为了测定由本发明构建体产生的嵌合蛋白是否通过MHC II途径加工,进行了一组

实验来比较当作为质粒上的编码区或作为根据本发明的构建体上的变应原域施用时针对CryJ2蛋白的免疫应答。结果在图10的分图A和B中给出。

[0145] 更具体地讲,该图显示了四次DNA免疫接种和花粉粗提物致敏后的CryJ2特异性应答。在第0、7、14和21天用CRYJ2-LAMP质粒DNA或CRYJ2质粒(参见图8)DNA皮下免疫小鼠组($n=5$)。最后的DNA免疫接种后六周(第77天),将小鼠用明矾中的花粉粗提物致敏并三周(第91天)后给予加强剂量。数据显示了从每个时间点汇集的血清产生的值。接受CRYJ2-LAMP DNA的小鼠中的IgG1(分图A)和IgG2a(分图B)应答在整个112天保持升高并且远高于接受不包括LAMP的CRYJ2质粒DNA的那些小鼠。经由根据本发明的构建体递送变应原原因而提供了比递送没有本发明构建体背景的变应原更优的MHC II应答。

[0146] 实例4:剂量的理论基础-针对不同剂量的构建体以及针对单独的载体的免疫应答的比较

[0147] 图11示出了以不同剂量水平进行四次DNA免疫接种后对于IgG2a产量和IgG1产量而言的CryJ2特异性应答。在第0、7、14和21天给小鼠组($n=5$)肌内给予10 μ g、50 μ g或100 μ g的CRYJ2-LAMP质粒DNA或载体DNA。最后一次DNA免疫接种后三周,处死小鼠并移出脾脏供细胞因子诱导测定。

[0148] 数据显示了对于每个疫苗剂量从汇集的血清产生的值。CRYJ2-LAMP质粒DNA的全部三种浓度均引起IgG1和IgG2a应答,其中50 μ g剂量显示已引起最高的抗体应答。任何浓度的单独载体没有诱导任何抗体应答。这些数据显示,对于引发免疫应答而言存在剂量依赖的应答,并且该免疫应答至少部分是MHC II型应答。

[0149] 实例5:说明经由MHC II途径的免疫应答的另外的数据

[0150] 在该组实验中,将IL-4和IFN- γ 用作标记物测定了经刺激的脾细胞的上清液中的细胞因子分泌。具体而言,在第42天采集小鼠($n=3$)的脾细胞并在存在10 μ g/ml、5 μ g/ml、2.5 μ g/ml或无rCRYJ2的情况下培养。将来自未经处理过的小鼠(*naïve mice*)的脾细胞用作阴性对照。通过ELISA测量经rCRYJ2刺激的脾细胞的IL-4和IFN- γ 水平,单位为pg/ml。

[0151] 数据在图12的分图A和B中给出。数据显示接受50 μ g CRYJ2-LAMP质粒DNA的小鼠比接受较低剂量的质粒DNA的那些小鼠具有显著更高的IFN- γ (MHC II免疫应答途径激活的确定生物标记物)表达。在所述组任一者中见到极小的IL-4水平应答,IL-4是MHC I途径的确定生物标记物。对于IL-5,也存在极小的应答(如果有的话)(数据未显示)。这些结果表明,Cry J2-LAMP DNA免疫接种诱导了Th1记忆细胞而不是Th2细胞的募集,如通过在用重组Cry J2蛋白刺激后产生IFN- γ 而不是IL-4表明的。

[0152] 实例6:在先前的CryJ2致敏的小鼠中用CryJ2-LAMP DNA疫苗免疫的治疗效果研究

[0153] 为了研究DNA-LAMP-CryJ2疫苗的治疗效果,将小鼠组($n=5$)用三次5 μ g rCRYJ2重组蛋白注射剂致敏并在四周后,用四次CRYJ2-LAMP质粒DNA注射剂处理,其以每周一次(7天)的间隔给予。该DNA免疫诱导了IgG2a的促升效果和IgG1抗体的暂时增加,从而指示该DNA疫苗的Th1介导的调节效果。在第167天和174天的两次额外的DNA免疫接种促升了CRYJ2特异性的IgG2a应答并且IgG1应答几乎没有改变。对小鼠的视觉检查没有显示身体不适或皮肤反应。胃口也没有改变,它们看起来也不嗜睡。对IgG1和IgG2a滴度的影响分别在图13的分图A和B中示出。

[0154] 实例7:小鼠脾细胞培养物中IFN- γ 和IL-4的诱导

[0155] 还就细胞因子诱导对CryJ2-LAMP DNA疫苗的治疗效果进行了研究。在第183天收获小鼠(n=3)的脾细胞并用不同浓度的rCRYJ2进行刺激。将来自未经处理过的小鼠的脾细胞用作阴性对照。通过ELISA测量经rCRYJ2刺激的脾细胞的IL-4和IFN- γ 水平,单位为pg/ml。与载体组中的IFN- γ 表达相比,在CRYJ2-LAMP免疫接种的组中检测到显著升高的IFN- γ 表达。然而,IL-4表达没有显示出与载体组的不同。Cry 12-LAMP DNA免疫接种引起的IFN- γ 增加据推测涉及抗原特异性Th1细胞的募集和Th1细胞因子环境的产生。从该实验获得的数据在图14的分图A和B中给出。

[0156] 实例8:血清中的循环CryJ2蛋白的检测

[0157] 用Cry J2蛋白、pDNA-Cry J2(无LAMP)和Cry 12-LAMP-vax免疫小鼠。在第0、1、2、3、4和7天获取血清样品并在灵敏的夹心免疫测定法中评价游离Cry J2蛋白的存在。在所述蛋白质和非LAMP免疫接种中检测到游离的Cry J2。然而,在用Cry J2-LAMP-vax免疫的小鼠进行的任何实验中在任何时间点未检测到游离的变应原(最低可检测水平为2ng/ml)。支持该论断的数据在图12中给出。

[0158] 根据本发明的LAMP疫苗将是可治疗变态反应而不将游离变应原系统性地引入患者中的唯一制剂。这不像传统的免疫疗法,传统的免疫疗法有时候由于系统性引入变应原而可导致过敏反应。该实验显示接受Cry J2-LAMP DNA质粒的小鼠不具有游离的Cry J2蛋白并因而不释放进体循环中,而对于仅给予蛋白质或无LAMP的Cry J2DNA的小鼠则可见该释放。

[0159] 实例9:DNA疫苗在豚鼠中的效力

[0160] 为了扩大对本核酸构建体在其他动物中的功能的科学认识,在用CryJ2-LAMP DNA疫苗免疫、然后用重组CryJ2蛋白攻击的雌性豚鼠中进行了研究。研究的结果在图16的分图A和B中示出。

[0161] 具体地讲,在第0、7和14天让雌性豚鼠接受100 μ g的CRYJ2-LAMP DNA疫苗或单独的载体的肌肉注射。在第14天的最后一次DNA疫苗免疫接种后四周,在第42天和49天让豚鼠接受10 μ g/ml的rCRYJ2蛋白/明矾的皮下注射。在第0、21、35、63和77天从豚鼠获得血清样品。数据显示,对于IgG2,接受CRYJ2-LAMP DNA的豚鼠的平均吸光度值一直增加到第35天,IgG1应答极小或没有。IgG2a的增加与Th1偏向性应答中通常所见的相符。

[0162] 实例10:在其他哺乳动物中的另外的调查研究-说明安全性的毒理学数据

[0163] 让新西兰白兔接受4.128mg的CRYJ2-LAMP DNA的肌肉注射。年龄和性别匹配的对照兔子接受单独的盐水。在第1、14、28、42和56天免疫兔子。在第1、14、28、42、56、58和85天从兔子获得血清样品。在多次肌肉注射CryJ2-LAMP质粒或盐水后1:100的兔血清的平均吸光度值在图17中示出。从图中可以看到,数据显示接受盐水的兔子的平均吸光度值小于0.100。用CRYJ2-LAMP DNA处理的组中的兔子的吸光度值通常一直增加到第42天,并且在某些情况下一直增加到第85天。

[0164] 实例11:对食品变应原的适用性

[0165] 在过去的25年中,根据花生变态反应患者中的致敏,已经鉴定了8种重要的花生变应原。三种主要的花生变应原最常被花生变态反应个体的IgE识别:65-100%识别Ara h1,其为63.5kDa种子储藏豌豆球蛋白(vicilin)家族蛋白质;71-100%识别Ara h2,其为17kDa种子储藏羽扇豆球蛋白(conglutin)家族蛋白质;以及45-95%识别Ara h3,其为14kDa种子

储藏大豆球蛋白 (glycinin) 家族蛋白质。除了为引发花生依赖的变态反应和过敏反应的共同致病因素之外,这三种蛋白质也看起来促进较强的变态反应。靶向这些变应原来作为花生变态反应免疫疗法的基础有潜力在花生变态反应的各色人群中提供针对强的变态反应的最广泛保护。目前正进行I期临床试验,该临床试验使用三种主要变应原的低变应原性形式和热灭活细菌佐剂作为变态反应免疫疗法。该试验正在进行,但由于高度复杂的制造工艺,这种疗法的最终商业化将会是一个挑战。

[0166] 为了解决上升的食品变态反应(尤其是花生变态反应)发生率,产生了根据本发明的核酸构建体。该构建体在图6A中绘出,并且所编码的嵌合蛋白的示意图在图6B中绘出,如上面所论述的。该构建体可用于在施用该构建体的受试者中产生主要的MHC II应答。三种最常见的花生变应原在单个嵌合蛋白中的存在提供了广泛的免疫作用,该免疫作用将可治疗群体中的绝大多数花生变态反应。

[0167] 使该构建体表达,结果在图18中示出。图19显示,所有三种变应原均可表达并在蛋白质印迹上检测为单个多聚蛋白。

[0168] 对本领域技术人员将显而易见的是,可在本发明的实践以及在核酸构建体的构造中进行各种修改和变动而不脱离本发明的范围或精神。鉴于本发明的说明和实践,本发明的其他实施例对本领域技术人员将是显而易见的。意图是,所述说明和实例应视为仅仅是示例性的,其中本发明的真正范围和精神由权利要求书表明。

[0169] 序列表的另外的序列

[0170] 除了作为本申请的一部分提供的正式序列表中提供的序列之外,下面的序列构成本公开的一部分:

[0171] 1. Cry1-Cry2-LAMP嵌合构建体的编码区的核苷酸序列如下:

SEQ ID NO: 6 - Cry J1+J2-LAMP

ccgcctaag agcgggcttt ttttcttag ggtgcaaaag gagagcctgt aagcgggcac 60
tcttcctgg tctggggat aaattcgca gggatcatg gcggacgacc ggggttegag 120
ccccatcc ggccgtccgc cgtgatecat ggggttaccg ccccgctgc gaaccaggt 180
gtgcgacgtc agacaacggg ggagtgtcc ttttgcttc ctccccttc tccgcttc 240
tcgctcactg actcgtcgc ctcggctgtt cggctgcggc gagcggatc agctcactca 300
aaggcgtaa tacggtatc cacagaatca ggggataac caggaaagaa catgtgagca 360
aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaa aaggccgct tgetggcgt tttccatagg 420
ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgctca gtcagagggt gcgaaacccg 480
acaggactat aaagatacca ggcgttccc cctggaagct cctcgtgcg ctctcctgt 540
[0172] ccgacctgc cgttaccgg atacctgtcc gcctttctc ctccgggaag cgtggcgtt 600
tctcatagct cacgctgtag gtatctcagt tcggtgtagg tcgttcgctc caagctgggc 660
tgtgtgcacg aacccccgt tcagccgac cgtgcgcct tatccgtaa ctatcgtt 720
gagccaacc cggtaagaca cgactatcg cactggcag cagccactgg taacaggatt 780
agcagagcga ggtatgtagg cgggtctaca gattcttga agtggtggcc taactacggc 840
tactagaa gaacagtatt tggtatcgc gctctctga agccagttac ctccgaaaa 900
agagttgga gctctgac cgcaaaaa accaccgctg gtagecgtgg ttttttgg 960
tgcaagcagc agattacgc cagaaaaaaaa ggtctcaag aagatcctt gatctttt 1020
acggggtctg acgctcagt gaacgaaaac tcaggttaag ggatttgg catgagatta 1080
tcaaaaagga tctcaccta gatccttta aattaaat gaagttta atcaatctaa 1140
agtatatatg agtaaactg gctgacagt taccaatgct taatcagtga ggcacctatc 1200

tcagegatet gtctatttcg tteatccata gttgectgac tectgcaaac cacgttgtgg 1260
tagaattggg aaagagagtc gtgtaaaata tegagtccgc acatcttgtt gtctgattat 1320
tgatttttgg cgaaaccatt tgatcatatg acaagatgtg tatctacctt aacttaatga 1380
ttttgataaa aatcattagg taccceggct ctagatggca tgacattaac ctataaaaaat 1440
aggeglatca cgaggcectt tegtctegcg cgttccgggtg atgacgggtga aaacctctga 1500
cacatgcage teceggagac ggtcacaget tgtctgtaag cggatgccgg gagcagacaa 1560
gcccgtcagg gcgcgtcage ggggtttggc ggggtctcggg gctggcttaa ctatcegcca 1620
tcagagcaga ttgtactgag agtgcacat atgcgggtgtg aaataccgca cagatgcgta 1680
aggagaaaat accgcatcag attggctatt ggccattgca tacgttgtat ccatatcata 1740
atatgtacat ttatattgce teatgtecaa cattaaccgc atgttgacat tgattattga 1800
ctagttatta atagtaatca attacggggg cattagttca tagcccatat atggagtcc 1860
geggtacata acttacggta aatggcccgc ctggctgacc gcccacgac ccccgccat 1920
tgacgtcaat aatgacgtat gttccatag taacgccaat agggacttcc cattgacgtc 1980
aatgggtgga gtattacgg taaactgccc acttggcagt acatcaagtg tatecatatgc 2040
caagtacgcc cctattgac gtcaatgacg gtaaattggc cgcttggeat tatgcccaat 2100
acatgacctt atgggacttt cctacttggc agtacateta cgtattagtc ategtattta 2160
ccatgtgat gcgggtttgg cagtacatca atgggcgtgg atagcggttt gactcacggg 2220
gatttcaag tetccacccc attgacgtca atgggagttt gttttggcac caaaatcaac 2280
gggactttcc aaaatgtcgt aacaactccg ccccatgac gcaaatgggc ggtaggcgtg 2340
tacggtggga ggtctatata agcagagctc gtttagtgaa ccgtcagatc gcctggagac 2400
gccatccacg ctgttttgac ctccatagaa gacaccggga cegatccage ctcccggt 2460
egcatctctc ctacgcgc ccgccccct acctgaggcc gccatccacg ccggttgagt 2520
cgcgttctgc cgcctccgc ctgtgtgccc tectgaactg cgtccgccgt ctaggtaagt 2580
ttaaagctca ggtcgagacc gggcctttgt ccggcgctcc ctggagcct acctagactc 2640
agccggctct ccacgcttg cctgaccctg cttgctcaac tctagttctc tegttaactt 2700
aatgagacag atagaaactg gtctttaga aacagagtag tcgcctgctt ttctgccagg 2760
tctgacttc tetcccctgg gctttttct tttctcagg ttgaaaagaa gaagacgaag 2820
aagacgaaga agacaaaccg tegtgcacat ggcgccccgc agegccccgc gaccctgct 2880
gctgctactg ctgttctgc tgetcggcct catgcattgt gcgtcagcag caatgtttat 2940
ggtgaaaaat ggcaacggga ccgcgtgcat aatggccaac ttctctgctg cttctcagi 3000
gaactacgac accaagagtg gccetaagaa catgaccctt gacctgccat cagatgccac 3060
agtgtgctc aaccgcagct cctgtggaaa agagaacct tctgaccca gtctctgat 3120

[0173]

tgcctttgga agaggacata cactcactct caatttcaag agaaatgcaa cacgttacag 3180
cgteccagctc atgagttttg ttataactt gtcagacaca cacctttcc ccaatgcgag 3240
ctccaaagaa atcaagactg tggaaatctat aactgacatc agggcagata tagataaaaa 3300
atacagatgt gttagtggca eccaggteca catgaacaac gtgaccgtaa egctccatga 3360
tgccaccatc caggcgctacc ttccaacag cagcttcage eggggagaga cacgctgtga 3420
acaagacagg ccttcccaaa ccacagegce ccttgcgcca cccageccct cgcctcace 3480
cgtgcccag agcccctctg tggacaagta caacgtgagc ggcaccaacg ggacctgcct 3540
gctggccage atggggctgc agctgaacct cacctatgag aggaaggaca acacgacggt 3600
gacaaggcct ctcaacatca accccaacaa gacctcggcc agcgggagct gcggcgcca 3660
cctggtgact ctggagctgc acagcgaggg caccaccgct ctgctcttcc agttcgggat 3720
gaatgcaagt tctagccggt ttttctaca aggaatccag ttgaatacaa ttcttctga 3780
cgccagagac cctgccttta aagetgcaa cggctccctg cgagcgctgc agccacagt 3840
eggcaattcc tacaagtga acgcccagga gcactccgt gtcacgaagg cgtttcagt 3900
caatatattc aaagtgtggg tccaggcttt caaggtgaa ggtggccagt ttgctctgt 3960
ggaggagtgt ctgctggacg agaacagcct cgaggacaat cctattgatt cctgctggcg 4020
[0174] tggagattct aactgggcac agaaccggat gaaactggct gactgtgccg tgggctttg 4080
ctcttccact atgggagggga agggaggcga cctgtacact gttacaaaca gcgacgacga 4140
ccctgtcaat ccagcaaccg gaaccttgag atatggtgca acgcgagacc gaccactttg 4200
gatcatcttt ageggaaaca tgaacatcaa gttgaagatg cctatgtaca tagctgggta 4260
caaaccttc gacggcagag gagcccaggt gtacattggc aacggaggtc cctgcgtgtt 4320
catcaagcgt gttagtaatg tgatcattca cggctcgcac ctctatggct gttcaacaag 4380
cgtgctgggg aatgtgctga tcaatgagtc attcgggtgt gaaccctgc acccacagga 4440
cggatgatcg ttgacactga ggacagccac caatatctgg attgaccata acagtttctc 4500
taacagctca gatggcctgg tggatgtcac cttgagtage acaggggtca caatcagcaa 4560
caatctgttc ttcaaccatc ataaggtgat gctgctgggc cacgacgatg cgtattccga 4620
cgataagagc atgaaagtga cgggtggcctt taaccagttt ggtcctaact gtggacagcg 4680
gatgcctaga gccaggtacg gactggtgca cgtggccaac aacaactatg atcctggac 4740
tatctatgca attggcggtt cttccaacc gacgatactg agtgaaggga actcctttac 4800
cgctccaat gagagctaca agaagcaggt caccatccgc ataggctgca aaactagttc 4860
atctgtage aactgggtgt ggcagtccac tcaagatgtc ttetacaacg gagcttactt 4920
cgttagcagt gggaaatagc aaggtggcaa catatacaca aagaaagagg ctttcaatgt 4980
ggagaatggc aatgccactc cccagctcac caagaatgca ggggtgetca cctgctcct 5040

gagcaaacgg tgcggcgggtg gtggcctcga ggatcagtcg ggcagatca tgctggatag 5100
 cgtggtggag aagtacctga ggagtaacag gtcactgcgc aaggttgagc attccagaca 5160
 cgacgctatc aacatcttca acgtggagaa gtacgggtgt gtcggagacg ggaagcacga 5220
 ctcaccgaa gccctttcta cagcctggca agctgcctgc aagaatcct cagccatget 5280
 cctcgtgctt gggcttaaga agtttgcgt gaataacctt ttctcaatg gacctgcca 5340
 gccacacttt accttcaaag ttgatgggat catcgcagcc tatcagaacc cagctagctg 5400
 gaagaacaat cggatctggt tgcagttgc caaactgaca ggattcacc tgatggggaa 5460
 aggcgtgatc gacggacagg gcaaacagtg gtgggcaggg cagtgcaagt gggtaatgg 5520
 tagggagatt tgcaatgaca gggaccgtcc taccgctatc aagtttgatt tcagcacagg 5580
 actgattatt caggggttga agctgatgaa tagtccagag ttacacctg tgtttggcaa 5640
 ttgtgaaggt gtgaagatca taggcattag cattacagca cctcgcgatt ctccaatac 5700
 ggacggcatt gacatcttgc cctccaagaa cttcacctg caaaagaata ccattggcac 5760
 aggcgacgac tgcgtggcca ttggcactgg cagcagcaat atcgttatcg aagatttgat 5820
 atgtggtcct gggcatggca taagcattgg aagcctgggt agagaaaact caagagctga 5880
 agtcagctat gttcacgta acggagcgaa gttcattgat acccagaacg gaetgceaat 5940
 [0175] caaaacttgg caagggggaa gtggcatggc atctcacatc atctacgaga acgtcgagat 6000
 gatcaattcc gagaacccca tactgattaa ccaattctat tgfacttccg cctctgctg 6060
 ccagaatcag agatcagccg tgcagatcca ggacgtgaca tacaagaata tccgagggac 6120
 gagcgtacc gctgcccga tacagctcaa atgttccgat agcatgccct gcaaagatat 6180
 caagcttagt gatatctccc tcaaactgac tagcggaaaag atagcgtcct gtctcaatga 6240
 taacgcaaat ggctacttct cagggcatgt gatecctgca tgcaaaaaacc ttageccgag 6300
 tgcgaaacgc aaagaatcca aatcccataa gcatccgaag actgtgatgg tcgagaacat 6360
 gagagcctac gacaaaggga accggacgag gattctgctg ggctctcgac cgccaaactg 6420
 taccaacaaa tgcacgggt gttctccatg caaagctaaa ctggtgatag tgcategcat 6480
 catgccctca gagtactatc cccagcgttg gattttagt tgccatggca agatctatca 6540
 cccagaatc acgtgatcc ccatcgctgt ggggtgtgcc ctggcggggc tggctctcat 6600
 cgtctcacc gctacctg tcggcaggaa gaggagtcac gcaggctacc agactatcta 6660
 gtaaggatct tttccctct gccaaaatt atggggacat catgaagecc cttgagcatc 6720
 tgacttctgg ctaataaagg aaatttttt tcaatgcaat agtgtgttg aattttttgt 6780
 gtctctcact cggagggaca taaggcggc cgctagc 6817

[0176] 2. Ara H1/H2/h3多聚蛋白的编码区的核酸序列:

[0177] SEQ ID NO: 8

ccgcctaag agcgggcttt ttttcttag ggtgcaaaag gagagcctgt aagcgggcac 60
tcttccgtgg tctggtgat aaattcgcaa gggatcatg gggacgacc ggggttcgag 120
ccccgtacc ggccgtccgc cgtgacatc ggggtaccg ccccgctgic gaaccaggt 180
gtgcgacgic agacaacggg ggagtgtcc ttttgcttc ctccccctc tccgcttc 240
tcgctcactg actcgtcgc ctcggtcgtt cggctgcgc gagcggfate agctactca 300
aaggcggtaa tacggttate cacagaatca ggggataacg caggaaagaa catgtgagca 360
aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa aaggcccgct tcttgccgtt tttccatagg 420
ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgctcaa gtcagaggtg gcgaaaccg 480
acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct cctcgtgag ctctctgtt 540
ccgacctgc cgttaccgg atacctgccc gcctttctc ctccgggaag cgtggcgtt 600
tctcataget cacgctgtag gtatctcagt tcggtgtagg tcgttcgctc caagetgggc 660
tgtgtgcaag aacccccct teagccccac cgtgcgcct taccggtaa ctatctctt 720
gagccaacc cggaagaca cgacttatc ccaactggcag cagccactgg taacaggatt 780
agcagagcga ggtatgtagg cgggtctaca gagttctga agtggtggcc taactcggc 840
taactagaa gaacagtatt tggatctgc gctctgctga agccagttac ctccgaaaa 900
agagttgta gctcttgatc cggcaaaaa accaccgctg gtagcgggtg ttttttgtt 960

[0178]

tgcaagcagc agattaccg cagaaaaaaaa ggtctcaag aagatcctt gatctttct 1020
accgggtctg acgtcagtg gaacgaaaac tcacgttaag ggatttgggt catgagatta 1080
tcaaaaagga tctcaccta gatccttta aattaaat gaagtttaa atcaatctaa 1140
agtatatatg agtaaactg gtctgacagt taccaatgct taatcagtga ggcacctate 1200
tcagegatct gtctatttcg ttcatecata gttgcctgac tctgcaaac cacgttggg 1260
tagaattggf aaagagagtc gtgtaaaata tcgagttcgc acatctgtt gtctgattat 1320
tgatttttg cgaaccatt tgatcatatg acaagatgic tatctacct aacttaatga 1380
tttgataaa aatcattagg taccccggct ctatagggca tgacattaac ctataaaaat 1440
aggcgtatca cgaggccctt tcgtctcgcg cgttcgggtg atgacgggtg aaacctctga 1500
cacatgcagc tcccggagac ggtcacagct tctctgtaag cggatgccgg gagcagacaa 1560
gcccgtcagg gcgcgtcagc ggggtttggc ggggtcggg gctggcttaa ctatcgcca 1620
tcagagcaga ttgtaactgag agtgcacat atcgggtgtg aaataccgca cagatgcgta 1680
aggagaaaat accgcatcag attggctatt ggccattgca tacgttgtat ccatatcata 1740
atatgtacat ttatattggc tcagtccaa cattaccgcc atgttgacat tgattattga 1800
ctagtatta atagtaatca attacgggtt cattagtca tagccatat atggagtcc 1860
gcgttacata acttacggtt aatggcccgc ctggtgacc gccaacgac ccccgccat 1920

tgacgtcaat aatgacgtat gttccatag taacgccaat agggacttfc cattgacgtc 1980
 aatgggtgga gtatttacgg taaactgccc acttggcagt acatcaagtg tatcatatgc 2040
 caagtacgcc cctattgac gtcaatgacg gtaaattggc cgcctggcat tatgcccagt 2100
 acatgacctt atgggacttt cctacttggc agtacateta cgtattagtc atcgtatta 2160
 ceatggtgat gcggttttgg cagtacatca atgggcgtgg atagcggttt gactcacggg 2220
 gattccaag tctccacccc attgacgtca atgggagttt gttttggcac caaaatcaac 2280
 gggactttcc aaaatgtcgt aacaactccg ccccatgac gcaaattggc ggtaggcgtg 2340
 tacggtggga ggtctatata agcagagctc gtttagtgaa cgcagatc gcttgagac 2400
 gccatccacg ctgttttgac ctccatagaa gacaccggga cgateccage ctccgcgget 2460
 cgcctctctc ctccacgcgc cgcgccct acctgagcc gccatccacg ccggtttagt 2520
 cgggttctgc cgcctccgc ctgtggtgcc tctgaactg cgtccgcct ctaggtaagt 2580
 ttaaagetca ggtcagacc gggcctttgt ccggegctcc ctggagcct acctagactc 2640
 agecggctct caecgtttg ccgacctg ctgtctaac tctagttctc tegttaactt 2700
 aatgagacag atagaaactg gtctttaga aacagagtag tgcctgctt ttctgccagg 2760
 tctgacttc tctccctgg gttttttct tttctcagg ttgaaaagaa gaagacgaag 2820
 aagacgaaga agacaaaccg tctctgacat ggcgccccgc agcgccccgc gacctctgt 2880
 gctgctactg ctgttctgc tctctggcct catgcattgt gcgtcagcag caatgtttat 2940
 ggtgaaaaat ggcaacggga ccgctgcat aatggccaac ttctctctg cttctcagt 3000
 gaactacgac accaagagtg gccctaagaa catgacctt gacctgcat cagatgccac 3060
 agtggctc aaccgcagct cctgtgaaa agagaacct tctgaccca gtctctgat 3120
 tcttttga agaggacata cactcactct caatttcag agaaatgcaa cacgttacag 3180
 cgttcagctc atgagttttg ttataactt gtcagacaca cacttttcc ccaatgcgag 3240
 ctccaaagaa atcaagaactg tggaaatct aactgacatc agggcagata tagataaaaa 3300
 atacagatgt gttagtggca cccaggtcca catgaacaac gtgaccgtaa cgtccatga 3360
 tgccaccatc caggcgtacc ttccaacag cagctcagc aggggagaga cacgtgtga 3420
 acaagacagg cttccccaa ccacagcgc ccttggcca cccagcccc cgcctcacc 3480
 cgtgccccag ageccctctg tggacaagta caactgagc ggcaccaacg ggacctgct 3540
 gctggccagc atgggctgc agctgaacct cacctatgag aggaaggaca acacgacggt 3600
 gacaaggctt ctcaacatca accccaaca gacctggcc agcgggagct gcggcgcca 3660
 cctggtgact ctggagctgc acagcaggg caccaccgtc ctctcttcc agttcggat 3720
 gaatgcaagt tctagccggt tttcttaca aggaatccag ttgaatacaa ttctctga 3780
 cgccagagac cctgccttfa aagctgcaa cggctccctg cgagcctgc agccacagt 3840

[0179]

[0180]

cggcaattcc tacaagtgca acgcgaggga geactgccgt gtcacgaagg cgttttcagt 3900
 caatatattc aaagtgtggg tccaggcttt caaggtggaa ggtggccagt ttggtctgt 3960
 ggaggagtgt ctgctggacg agaacagcct cgagaagtcc agccccctacc agaagaaaac 4020
 cgagaacccc tgcgcccagc ggtgcctgca gtcctgtcag caggaacccg acgacctgaa 4080
 gcagaaggcc tgcgagagcc ggtgcaccaa gctggaalac gaccccagat gegtgtacga 4140
 cectagaggc cacaccgga ccaccaacca gagaagccct ccaggcgagc ggaccagagg 4200
 cagacagcct ggcgactacg acgacgacag acggcagccc agaagagaag agggcgggcag 4260
 atggggacct gccggcccta gagagagaga acgcgaggaa gattggagac ageccagaga 4320
 ggactggcgg aggccttctc accagcagcc ccggaagatc agacccgagg gcagagaagg 4380
 cgagcaggaa tggggcacac ctggcttca cgtgcgag gaaaccagcc ggaacaacce 4440
 cttctacttc cctcccggc ggtcagcac cagatacggc aaccagaacg gccggtacg 4500
 agtgcctcag agattcgacc agcggagccg gcagtccag aacctgcaga accaccgat 4560
 cgtgcagatc gaggccaagc ccaacacct ggtgctgcc aaacagccc acgcccacaa 4620
 catctctgt atccagcagg gccaggccac cgtgacagtg gccaacggca acaacagaaa 4680
 gagcttcaac ctggacgagg gccacgccct gagaatcccc agcggcttca tcatctacat 4740
 cctgaacaga cacgacaate agaacctgag ggtggccaag atcagcatgc ccgtgaacac 4800
 ccctggccag ttcgaggact tcttccccgc atctcccgg gaccagagca gctacctgca 4860
 gggcttcagc cggaataccc tggaaagccg cttcaacgcc gacttcaacg agatcagacg 4920
 ggtgctgctg gaagagaacg ctggcggaga gcaggaagaa cggggccaga gaagatggtc 4980
 caccagaagc agcgagaaca acgagggcgt gatcgtgaag gtgtccaaag aacacgtgga 5040
 agaactgacc aagcacgcca agagcgtgtc caagaagggc tccgaggaag agggggacat 5100
 caccaacccc atcaatctga gagagggcga gcccgacctg agcaacaact tcggcaagct 5160
 gttcgaagtg aagccccaca agaagaaccc ccagctgcag gacctggaca tgatctgac 5220
 ctgcgtggaa atcaaagagg gggccctgat gctgccacac ttcaactcca aagccatggt 5280
 catcgtggtc gtgaacaagg gcaccggcaa cctggaactg gtggccgtgc ggaaagagca 5340
 gcagcagaga gcccgcagag aggaagaaga ggacgaggac gaagaagaag agggatccaa 5400
 ccgggaagtg cggcgggtaca ccgcccagact gaaagaaggc gacgtgttca tcatgctgc 5460
 cgeccacccc gtggccatca atgctctag cgagctgcat ctgctgggtc tcggcattaa 5520
 cgccgagaac aatcaccgga tctttctgge cggcgacaaa gacaacgtga tcgaccagat 5580
 cgagaagcag gcccaaggacc tggccttcc cgctctgge gaacaagtgg aaaagetgat 5640
 caagaaccag aaagaaagcc acttctgttc cgccagaccc cagagccagt ctcagagccc 5700
 tagtcccc gagaaagagt ctctgagaa agaggaccag gaagaggaaa accagggcgg 5760

[0181]

caagggccct ctgctgagca tctgaagge ctcaatggc ggcggaggca ggcagcagtg 5820
ggaactgcag ggcgacagaa gatgccagtc ccagctggaa egggccaacc tgaggccttg 5880
cgagcagcac ctgatgcaga aatccagcg cgacgaggac agctacggcc gggatcctta 5940
cageccccage caggaccctt actcccctag ccaggatccc gacagaaggg acccctacag 6000
ccctagcccc tacgatagaa gaggcgccgg aagcagccag caccaggaaa gatgctgcaa 6060
cgagctgaac gagtttgaga acaaccagcg ctgcatgtgc gaggccctgc agcagatcat 6120
ggaaaatcag agcgaccggc tgcagggacg gcagcaggaa cagcagtca agagagagct 6180
gcggaacctg ccccagcagt gtggactgag agccccccag agatgcgacc tggaagtgga 6240
aagcggcggc agagatcggg acggcggagg gggcgtgacc ttcagacagg gcggagaaga 6300
gaatgagtgc cagtttcagc ggctgaacgc ccagagggcc gacaacagaa tcgagagcga 6360
ggggcgctac atcgagacat ggaaccccaa caaccaggaa tttcagtgcg ctggggtggc 6420
cctgagcagg accgtgctga gaagaaatgc cctgaggcgg ccttctaca gcaacgcccc 6480
cctggaate tacgtgcagc agggcagcgg ctacttcggc ctgatcttc ccgatgccc 6540
ctccacctat gaggaacccg ctcaggaagg cagacggtat cagagccaga agcctagcag 6600
acggttccaa gtgggccagg acgatcccag ccaacagcag caggactctc accagaaggt 6660
gcaccgcttc gacgagggcg acctgatcgc tgtgccaacc ggcgtggcct tctgatgta 6720
caacgacgag gataccgacg tegtgacctg gacctgagc gacaccagct ceatecaca 6780
ccagctggac cagtccccca ggcggfllta cctggccggc aatcaggaac aggaatttct 6840
gagataccag cagcagcagg gctccagacc ceactacaga cagatcagcc ctagagtgcg 6900
ggcgacgaa caggaaaatg agggcagcaa catctctcc ggctttgccc aggaatttct 6960
gcagcacgcc ttccaggtgg accggcagac cgtggaaaac ctgagaggcg agaacgagag 7020
agaggaacag ggcgccatcg tgactgtgaa gggcggcctg aggatcctga gccccgacga 7080
agaggatgag tctctagaa gccccccaa ccgccgggaa gatttcgatg aggaccgcag 7140
cagacctcag cagcggggga agtacgacga gaacaggcgg ggctacaaga accgcatcga 7200
ggaaacaate tgcagcgcca gctgaagaa gaatctgggc cggctcagca accccgacat 7260
ctacaatcca caggccggca gctgaggag cgtgaacgaa ctggatctgc ccatcctggg 7320
atggctgggc ctgtctgccc agcacggcac catctaccgg aacgccatgt tctgectca 7380
ctacacctg aatgcccaca ccatcgtggt ggctctgaac ggcgcgccc acgtccaagt 7440
ggtggacagc aacggcaate ggggtgacga tgaagaactg caggaaggac acgtcctggt 7500
ggtgccccag aattttgccg tggccgcaa ggcccagtc gagaactatg agtatctgac 7560
ctcaagacc gacagccggc cctctatcgc caatcaagcc ggcgagaaca gcatcctcga 7620
caacctgccc gaggaagtgg tgccaacag ctaccggctg cctagagagc agccccgca 7680

[0182] gctgaagaac aacaaccctt teaagttctt cgtgccccca ttegaccacc agagcatgag 7740
 agaggtggcc gaattcacgc tgatccceat cgetgtgggt ggtgccctgg cggggctggt 7800
 cctcatcgtc ctcategcct acctcgtcgg caggaagagg agtcacgcag gctaccagac 7860
 tatctagtaa ggatcttttt ccctctgcca aaaattatgg ggacatcatg aagecccttg 7920
 agcatctgac ttctggctaa taaaggaaat ttatttcat tgcaatagtg tgttgaatt 7980
 tttgtgtct ctcactcgga aggacataag ggcggccgct agc 8023

[0183] 2. Ara H1/H2/H3多聚蛋白嵌合构建体的编码区的氨基酸序列如下：

SEQ ID NO:9 - AraH-LAMP

<220>

<221>信号序列

<222> (1)..(27)

<220>

<221> N-LAMP

<222> (28)..(380)

<220>

<221> AraH1

<222> (383)..(983)

<220>

<221> AraH2

[0184] <222> (988)..(1138)

<220>

<221> AraH3

<222> (1143)..(1634)

<220>

<221> TM/CYTO

<222> (1637)..(1672)

<400> 7

Met Ala Pro Arg Ser Ala Arg Arg Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu

1 5 10 15

Leu Leu Leu Gly Leu Met His Cys Ala Ser Ala Ala Met Phe Met Val

20 25 30

Lys Asn Gly Asn Gly Thr Ala Cys He Met Ala Asn Phe Ser Ala Ala

35 40 45
 Phe Ser Val Asn Tyr Asp Thr Lys Ser Gly Pro Lys Asn Met Thr Leu
 50 55 60
 Asp Leu Pro Ser Asp Ala Thr Val Val Leu Asn Arg Ser Ser Cys Gly
 65 70 75 80
 Lys Glu Asn Thr Ser Asp Pro Ser Leu Val He Ala Phe Gly Arg Gly
 85 90 95
 His Thr Leu Thr Leu Asn Phe Thr Arg Asn Ala Thr Arg Tyr Ser Val
 100 105 110
 Gln Leu Met Ser Phe Val Tyr Asn Leu Ser Asp Thr His Leu Phe Pro
 115 120 125
 Asn Ala Ser Ser Lys Glu He Lys Thr Val Glu Ser He Thr Asp Ile
 130 135 140
 Arg Ala Asp He Asp Lys Lys Tyr Arg Cys Val Ser Gly Thr Gln Val
 145 150 155 160
 His Met Asn Asn Val Thr Val Thr Leu His Asp Ala Thr He Gln Ala
 [0185] 165 170 175
 Tyr Leu Ser Asn Ser Ser Phe Ser Arg Gly Glu Thr Arg Cys Glu Gln
 180 185 190
 Asp Arg Pro Ser Pro Thr Thr Ala Pro Pro Ala Pro Pro Ser Pro Ser
 195 200 205
 Pro Ser Pro Val Pro Lys Ser Pro Ser Val Asp Lys Tyr Asn Val Ser
 210 215 220
 Gly Thr Asn Gly Thr Cys Leu Leu Ala Ser Met Gly Leu Gln Leu Asn
 225 230 235 240
 Leu Thr Tyr Glu Arg Lys Asp Asn Thr Thr Val Thr Arg Leu Leu Asn
 245 250 255
 He Asn Pro Asn Lys Thr Ser Ala Ser Gly Ser Cys Gly Ala His Leu
 260 265 270
 Val Thr Leu Glu Leu His Ser Glu Gly Thr Thr Val Leu Leu Phe Gln
 275 280 285
 Phe Gly Met Asn Ala Ser Ser Ser Arg Phe Phe Leu Gln Gly He Gln

290 295 300
 Leu Asn Thr Ile Leu Pro Asp Ala Arg Asp Pro Ala Phe Lys Ala Ala
 305 310 315 320
 Asn Gly Ser Leu Arg Ala Leu Gln Ala Thr Val Gly Asn Ser Tyr Lys
 325 330 335
 Cys Asn Ala Glu Glu His Val Arg Val Thr Lys Ala Phe Ser Val Asn
 340 345 350
 He Phe Lys Val Trp Val Gln Ala Phe Lys Val Glu Gly Gly Gln Phe
 355 360 365
 Gly Ser Val Glu Glu Cys Leu Leu Asp Glu Asn Ser Leu Glu Lys Ser
 370 375 380
 Ser Pro Tyr Gln Lys Lys Thr Glu Asn Pro Cys Ala Gln Arg Cys Leu
 385 390 395 400
 Gln Ser Cys Gln Gln Glu Pro Asp Asp Leu Lys Gln Lys Ala Cys Glu
 405 410 415
 Ser Arg Cys Thr Lys Leu Glu Tyr Asp Pro Arg Cys Val Tyr Asp Pro
 [0186] 420 425 430
 Arg Gly His Thr Gly Thr Thr Asn Gln Arg Ser Pro Pro Gly Glu Arg
 435 440 445
 Thr Arg Gly Arg Gln Pro Gly Asp Tyr Asp Asp Asp Arg Arg Gln Pro
 450 455 460
 Arg Arg Glu Glu Gly Gly Arg Trp Gly Pro Ala Gly Pro Arg Glu Arg
 465 470 475 480
 Glu Arg Glu Glu Asp Trp Arg Gln Pro Arg Glu Asp Trp Arg Arg Pro
 485 490 495
 Ser His Gln Gln Pro Arg Lys Ile Arg Pro Glu Gly Arg Glu Gly Glu
 500 505 510
 Gln Glu Trp Gly Thr Pro Gly Ser His Val Arg Glu Glu Thr Ser Arg
 515 520 525
 Asn Asn Pro Phe Tyr Phe Pro Ser Arg Arg Phe Ser Thr Arg Tyr Gly
 530 535 540
 Asn Gln Asn Gly Arg Ile Arg Val Leu Gln Arg Phe Asp Gln Arg Ser

545 550 555 560
 Arg Gln Phe Gln Asn Leu Gln Asn His Arg He Val Gln He Glu Ala
 565 570 575
 Lys Pro Asn Thr Leu Val Leu Pro Lys His Ala Asp Ala Asp Asn Ile
 580 585 590
 Leu Val He Gln Gln Gly Gln Ala Thr Val Thr Val Ala Asn Gly Asn
 595 600 605
 Asn Arg Lys Ser Phe Asn Leu Asp Glu Gly His Ala Leu Arg Ile Pro
 610 615 620
 Ser Gly Phe He Ser Tyr Ile Leu Asn Arg His Asp Asn Gln Asn Leu
 625 630 635 640
 Arg Val Ala Lys He Ser Met Pro Val Asn Thr Pro Gly Gln Phe Glu
 645 650 655
 Asp Phe Phe Pro Ala Ser Ser Arg Asp Gln Ser Ser Tyr Leu Gln Gly
 660 665 670
 Phe Ser Arg Asn Thr Leu Glu Ala Ala Phe Asn Ala Glu Phe Asn Glu
 [0187] 675 680 685
 Ile Arg Arg Val Leu Leu Glu Glu Asn Ala Gly Gly Glu Gln Glu Glu
 690 695 700
 Arg Gly Gln Arg Arg Trp Ser Thr Arg Ser Ser Glu Asn Asn Glu Gly
 705 710 715 720
 Val He Val Lys Val Ser Lys Glu His Val Glu Glu Leu Thr Lys His
 725 730 735
 Ala Lys Ser Val Ser Lys Lys Gly Ser Glu Glu Glu Gly Asp He Thr
 740 745 750
 Asn Pro He Asn Leu Arg Glu Gly Glu Pro Asp Leu Ser Asn Asn Phe
 755 760 765
 Gly Lys Leu Phe Glu Val Lys Pro Asp Lys Lys Asn Pro Gln Leu Gln
 770 775 780
 Asp Leu Asp Met Met Leu Thr Cys Val Glu He Lys Glu Gly Ala Leu
 785 790 795 800
 Met Leu Pro His Phe Asn Ser Lys Ala Met Val He Val Val Val Asn

805 810 815
 Lys Gly Thr Gly Asn Leu Glu Leu Val Ala Val Arg Lys Glu Gln Gln
 820 825 830
 Gln Arg Gly Arg Arg Glu Glu Glu Glu Asp Glu Asp Glu Glu Glu
 835 840 845
 Gly Ser Asn Arg Glu Val Arg Arg Tyr Thr Ala Arg Leu Lys Glu Gly
 850 855 860
 Asp Val Phe He Met Pro Ala Ala His Pro Val Ala He Asn Ala Ser
 865 870 875 880
 Ser Glu Leu His Leu Leu Gly Phe Gly He Asn Ala Glu Asn Asn His
 885 890 895
 Arg He Phe Leu Ala Gly Asp Lys Asp Asn Val He Asp Gln He Glu
 900 905 910
 Lys Gln Ala Lys Asp Leu Ala Phe Pro Gly Ser Gly Glu Gln Val Glu
 915 920 925
 Lys Leu He Lys Asn Gln Lys Glu Ser His Phe Val Ser Ala Arg Pro
 [0188] 930 935 940
 Gln Ser Gln Ser Gln Ser Pro Ser Ser Pro Glu Lys Glu Ser Pro Glu
 945 950 955 960
 Lys Glu Asp Gln Glu Glu Glu Asn Gln Gly Gly Lys Gly Pro Leu Leu
 965 970 975
 Ser Ile Leu Lys Ala Phe Asn Gly Gly Gly Gly Arg Gln Gln Trp Glu
 980 985 990
 Leu Gln Gly Asp Arg Arg Cys Gln Ser Gln Leu Glu Arg Ala Asn Leu
 995 1000 1005
 Arg Pro Cys Glu Gln His Leu Met Gln Lys He Gln Arg Asp Glu
 1010 1015 1020
 Asp Ser Tyr Gly Arg Asp Pro Tyr Ser Pro Ser Gln Asp Pro Tyr
 1025 1030 1035
 Ser Pro Ser Gln Asp Pro Asp Arg Arg Asp Pro Tyr Ser Pro Ser
 1040 1045 1050
 Pro Tyr Asp Arg Arg Gly Ala Gly Ser Ser Gln His Gln Glu Arg

1055	1060	1065
Cys Cys Asn Glu Leu Asn Glu Phe Glu Asn Asn Gln Arg Cys Met		
1070	1075	1080
Cys Glu Ala Leu Gln Gln He Met Glu Asn Gln Ser Asp Arg Leu		
1085	1090	1095
Gln Gly Arg Gln Gln Glu Gln Gln Phe Lys Arg Glu Leu Arg Asn		
1100	1105	1110
Leu Pro Gln Gln Cys Gly Leu Arg Ala Pro Gln Arg Cys Asp Leu		
1115	1120	1125
GluVal Glu Ser Gly Gly Arg Asp Arg Tyr Gly Gly Gly Gly Val		
1130	1135	1140
Thr Phe Arg Gln Gly Gly Glu Glu Asn Glu Cys Gln Phe Gln Arg		
1145	1150	1155
Leu Asn Ala Gln Arg Pro Asp Asn Arg He Glu Ser Glu Gly Gly		
1160	1165	1170
Tyr He Glu Thr Trp Asn Pro Asn Asn Gln Glu Phe Gln Cys Ala		
[0189] 1175	1180	1185
Gly Val Ala Leu Ser Arg Thr Val Leu Arg Arg Asn Ala Leu Arg		
1190	1195	1200
Arg Pro Phe Tyr Ser Asn Ala Pro Leu Glu He Tyr Val Gln Gln		
1205	1210	1215
Gly Ser Gly Tyr Phe Gly Leu He Phe Pro Gly Cys Pro Ser Thr		
1220	1225	1230
Tyr Glu Glu Pro Ala Gln Glu Gly Arg Arg Tyr Gln Ser Gln Lys		
1235	1240	1245
Pro Ser Arg Arg Phe Gln Val Gly Gln Asp Asp Pro Ser Gln Gln		
1250	1255	1260
Gln Gln Asp Ser His Gln Lys Val His Arg Phe Asp Glu Gly Asp		
1265	1270	1275
Leu He Ala Val Pro Thr Gly Val Ala Phe Trp Met Tyr Asn Asp		
1280	1285	1290
Glu Asp Thr Asp Val Val Thr Val Thr Leu Ser Asp Thr Ser Ser		

	1295	1300	1305
	He His Asn Gln Leu Asp Gln Phe Pro Arg Arg Phe Tyr Leu Ala		
	1310	1315	1320
	Gly Asn Gln Glu Gln Glu Phe Leu Arg Tyr Gln Gln Gln Gln Gly		
	1325	1330	1335
	Ser Arg Pro His Tyr Arg Gln He Ser Pro Arg Val Arg Gly Asp		
	1340	1345	1350
	Glu Gln Glu Asn Glu Gly Ser Asn He Phe Ser Gly Phe Ala Gln		
	1355	1360	1365
	Glu Phe Leu Gln His Ala Phe Gln Val Asp Arg Gln Thr Val Glu		
	1370	1375	1380
	Asn Leu Arg Gly Glu Asn Glu Arg Glu Glu Gln Gly Ala He Val		
	1385	1390	1395
	Thr Val Lys Gly Gly Leu Arg Ile Leu Ser Pro Asp Glu Glu Asp		
	1400	1405	1410
[0190]	Glu Ser Ser Arg Ser Pro Pro Asn Arg Arg Glu Glu Phe Asp Glu		
	1415	1420	1425
	Asp Arg Ser Arg Pro Gln Gln Arg Gly Lys Tyr Asp Glu Asn Arg		
	1430	1435	1440
	Arg Gly Tyr Lys Asn Gly He Glu Glu Thr He Cys Ser Ala Ser		
	1445	1450	1455
	Val Lys Lys Asn Leu Gly Arg Ser Ser Asn Pro Asp Ile Tyr Asn		
	1460	1465	1470
	Pro Gln Ala Gly Ser Leu Arg Ser Val Asn Glu Leu Asp Leu Pro		
	1475	1480	1485
	Ile Leu Gly Trp Leu Gly Leu Ser Ala Gln His Gly Thr He Tyr		
	1490	1495	1500
	Arg Asn Ala Met Phe Val Pro His Tyr Thr Leu Asn Ala His Thr		
	1505	1510	1515
	He Val Val Ala Leu Asn Gly Arg Ala His Val Gln Val Val Asp		
	1520	1525	1530
	Ser Asn Gly Asn Arg Val Tyr Asp Glu Glu Leu Gln Glu Gly His		

1535 1540 1545
Val Leu Val Val Pro Gln Asn Phe Ala Val Ala Ala Lys Ala Gln
1550 1555 1560
Ser Glu Asn Tyr Glu Tyr Leu Ala Phe Lys Thr Asp Ser Arg Pro
1565 1570 1575
Ser He Ala Asn Gln Ala Gly Glu Asn Ser He He Asp Asn Leu
1580 1585 1590
Pro Glu Glu Val Val Ala Asn Ser Tyr Arg Leu Pro Arg Glu Gln
1595 1600 1605
[0191] Ala Arg Gln Leu Lys Asn Asn Asn Pro Phe Lys Phe Phe Val Pro
1610 1615 1620
Pro Phe Asp His Gln Ser Met Arg Glu Val Ala Glu Phe Thr Leu
1625 1630 1635
He Pro He Ala Val Gly Gly Ala Leu Ala Gly Leu Val Leu Ile
1640 1645 1650
Val Leu Ile Ala Tyr Leu Val Gly Arg Lys Arg Ser His Ala Gly
1655 1660 1665
Tyr Gln Thr Ile
1670

序列表

	<110> 免疫治疗有限公司 (IMMUNOMIC THERAPEUTICS, INC.)	
	<120> 用于治疗变态反应的核酸 (NUCLEIC ACIDS FOR TREATMENT OF ALLERGIES)	
	<130> SCT146195-00	
	<150> PCT/US2012/042552	
	<151> 2012-06-15	
	<150> 61/496,866	
	<151> 2011-06-14	
	<160> 30	
	<170> PatentIn version 3.5	
	<210> 1	
	<211> 2898	
	<212> DNA	
[0001]	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic pITI plasmid polynucleotide	
	<400> 1	
	ccgcctaatag agcgggcttt tttttcttag gccttcttcc gcttctctgc tcaactgaetc	60
	gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct cactcaaagg cggtaataacg	120
	gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg tgagcaaaag gccagcaaaa	180
	ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgtttttc cataggctcc gccccctga	240
	cgageatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga aaccgacag gactataaag	300
	ataccaggcg tttcccctg gaagctccct cgtgcgctct cctgttccga cctgcccgt	360
	taccggatac ctgtccgct tctcccttc gggaagegtg gcgctttctc atagctcagc	420
	ctgtaggtat ctcaattcgg tctaggtcgt tgcctccaag ctgggetgtg tgcacgaacc	480

	cccegttcag cccgaccgct gcgccttate cggtaactat cgtcttgagt ccaacccggt	540
	aagacaegac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac aggattagca gagcgaggta	600
	tgtaggcggg getacagagt tcttgaagtg gtggcctaac tacggetaca ctagaagaac	660
	agtatttggg atctgcgctc tgctgaagcc agttaccctc ggaaaaagag ttggtagetc	720
	ttgatecggc aaacaaacca ccgetggtag cggtggtttt tttgtttgca agcagcagat	780
	tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgate tttctacgg ggtcigacgc	840
	tcagiggaaac gaaaactcac gtttaaggat ttgggtcatg agattatcaa aaaggatctt	900
	cacctagatc cttttaaatt aaaaaatgaag ttttaaatca atctaaagta tatatgagta	960
	aacttggctc gacagttacc aatgcttaat cagtgaggca cctatctcag cgatctgtct	1020
	atctcgttca tccatagttg cctgactcct gcaaaccacg ttgigttaga attggtaaag	1080
	agagtcgtgt aaaatattcga gttcgcacat cttgtttgct gattattgat tttggcgaa	1140
[0002]	accatttgat catatgacaa gatgigtatc taccttaact taatgatttt gataaaaatc	1200
	attaggtacc ccgctctag atggcatgac attaacctat aaaaatagge gtatcacgag	1260
	gccctttcgt ctgcgcggtt tcggtgatga cggtgaaaac ctctgacaca tgcagctccc	1320
	ggagacggtc acagcttgtc tgtaagcgga fgccgggagc agacaagccc gtcagggegc	1380
	gtcagcgggt gttggcgggt gtcggggctg gcttaactat gcggcatcag agcagattgt	1440
	actgagagtg caccatagc ggtgtgaaat accgcacaga tgcgtaagga gaaaataccg	1500
	catcagattg gctattgccc attgcatacg ttgtatccat atcataatat gtacatttat	1560
	attggetcat gtccaacatt accgccaatg tgacattgat fattgactag ttatfaatag	1620
	taateaatca cggggteatt agttcatagc ccatatatgg agttcccgct tacataaectt	1680
	acggtaaatg gcccgcttgg ctgaccgccc aacgaccccc gcccattgac gtcaataatg	1740
	acgtatgtc ccatagtaac gccaataggg actttccatt gacgtcaatg ggtggagtat	1800

	ttacggtaaa ctgcccaactt ggcagtacat caagtgtate atatgccaag tacgcccctt	1860
	attgacgtca atgacggtaa atggcccgcc tggcattatg cccagtacat gaccttatgg	1920
	gactttccfa cttggcagta catctacgta ttagtcacg ctattaccat ggtgatgcgg	1980
	ttttggcagt acatcaatgg gcgtggatag cggtttgact caeggggatt tccaagtetc	2040
	caccccattg acgtcaatgg gagtttgttt tggcaccaaa atcaacggga etttccaaaa	2100
	tgtcgtaaca actccgeccc attgacgcaa atgggcggta ggcgtgtacg gtgggagtc	2160
	tatataagca gagecgttt agtgaacct cagatgcct ggagacgcca tccacgtgt	2220
	tttgacctcc atagaagaca cgggaccca tccagctcc geggetecea tctctcttc	2280
	acgcgcccgc cgcctacct gaggccgcca tccacgcgg ttgagtcgcg ttctgcgce	2340
	tccgcctgt ggtgcctct gaactgcgc cgcctctag gtaagtttaa agctcagtc	2400
	gagaccgggc ctttgctcgg cgtcccttg gaccctacct agactcagcc gctctccac	2460
[0003]	gcttggctg acctgcttg ctcaacteta gttctctctg taacttaatg agacagatag	2520
	aaactggtct ttagaaaaca gactagtcgc ctgctttct gccaggtgct gacttctct	2580
	ccctgggctt tttcttttt ctcaggtga aaagaaga acgaagaaga cgaagaagac	2640
	aaagccgcca ceatgatgc aatgaagaga ggcctctgct gtgtgctgct gctgtgtgga	2700
	gcagtcttcg ttctgccag cgttaccgga tccgtcgacg gggggagatc ttttccctc	2760
	tgccaaaaat tatggggaca tcatgaagcc ccttgagcat ctgacttctg gctaataaag	2820
	gaaatttatt ttcattgcaa tagtgtgtg gaatttttg tgtctctcac tcggaaggac	2880
	ataagggcgg ccgetagc	2898

<210> 2

<211> 4157

<212> DNA

<213> *Cryptomeria japonica*

	<400> 2	
	ccgcctaattg agcgggcttt tttttcttag ggtgcaaaag gagagcctgt aagcgggcac	60
	tcttcogtgg tctgggtgat aaattcgcaa ggtatcatg gcggacgacc ggggttogag	120
	cccgtatec ggccgtccgc cgtgatccat geggttaccg cccgcgtgtc gaaccaggt	180
	gtgcgacgtc agacaacggg ggagtgcctc ttttggette cttccccttc ttccgettec	240
	tcgctcaactg actcgetgcg ctccggtcgtt cggetgcggc gagcggatc agctcaactca	300
	aaggcggtaa tacggttate cacagaatca ggggataacg caggaaagaa catgtgagca	360
	aaagcccagc aaaagccag gaaccgtaaa aaggccgcgt tgcctggcgtt tttccatagg	420
	ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgtcaa gtcagagggtg gcgaaaccgc	480
	acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaaget cctcgtgcg ctctctgtt	540
	ccgacctgc cgtttaccgg atacctgtcc gctttctcc cttegggaag cgtggcgtt	600
[0004]	tctcataget cacgetgtag gtatctcagt teggtgtagg tcgttcgctc caagetgggc	660
	tgtgtgcacg aacccccgt tcagcccagc cgtgcgcct tatccggtaa ctatcgtctt	720
	gagtccaacc oggtaagaca cgacttatcg ccaactggcag cagccactgg taacaggatt	780
	agcagagcga ggtatgtagg cgggtctaca gattcttga agtggtggcc taactacggc	840
	tactactagaa gaacagtatt tggtatctgc gctctgctga agccagttac cttcgaaaa	900
	agagttggta gctcttgatc cggcaaaaa accaccgctg gtagcgggtg tttttttgtt	960
	tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaa ggatctcaag aagatccttt gatcttttct	1020
	acggggtctg acgctcagtg gaacgaaaac tcacgttaag ggattttggt catgagatta	1080
	tcaaaaagga tcttcacctc gatcctttta aattaaaaat gaagtittaa atcaatctaa	1140
	agtatatatg agtaaacttg gctgacagt taccaatgct taatecagtg ggcacctate	1200
	tcagcgatct gtctatttcg ttcatccata gttgcctgac tctgcaaac cacgttggg	1260
	tagaattggt aaagagagtc ggtgaaaata tcgagttcgc acatctigtg gctcgattat	1320

	tgatttttgg cgaaaccatt tgatcatatg acaagatgtg tatctacctt aacttaatga	1380
	ttttgataaa aatcattagg taccccggct ctagatgcea tgacattaac ctataaaaat	1440
	aggcgtatca cgaggecctt tegtctcgcg cgtttcgggtg atgacggatga aaacctctga	1500
	cacatgcage tcecgagac ggteacaget tgtctgtaag eggatgccgg gacagacaa	1560
	gccegtcagg ggcgctcage ggggtgttggc ggggtctcggg getggettaa ctatgeggca	1620
	tcagagcaga ttgtactgag agtgcacat atgcgggtgtg aaataccgca cagatgcga	1680
	aggagaaaaa accgcateag attggelatt ggccattgca tacgttgtat ccatatcata	1740
	atatgtacat ttatattggc teatgtccaa cattaccgcc atgttgacat tgattattga	1800
	ctagttatta atagtaatca attacgggtt cattagtcca tagcccatat atggagtcc	1860
	gcgttacata acttacgga aatggcccgc ctggctgacc gcccaacgac ccccgccat	1920
	tgacgtcaat aatgacgat gtteccatag taacgccaat agggacttcc cattgacgc	1980
[0005]	aatgggtgga gtatttacgg taaactgcc acttggeagt acatcaagtg tatcatatgc	2040
	caagtaogcc cctattgac gtcaatgacg gtaaattggc cgctggcat tatgccagc	2100
	acatgacctt atgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattagtc atcgctatta	2160
	ccatggtgat gcggttttgg cagtacatca atgggcgtgg atagcggttt gactcaggg	2220
	gattccaag tctccacccc attgacgtca atgggagttt gttttggcac caaatcaac	2280
	gggactttcc aaaatgtcgt aacaactccg cccattgac gcaaatgggc ggtaggcgtg	2340
	tacggtggga ggcttatata agcagagctc gtttagtgaa ccgtcagatc gcctggagac	2400
	gceatccaag ctgitttgac ctccatagaa gacaccggga ccgatccage ctccgcggct	2460
	cgcatctctc ctccaegcgc ccgcgcctt acctgagccc gccatccaag ccggttgagt	2520
	cggtttctgc cgctcccgc ctgtggtgcc tctgaaactg cgtccgcct ctaggtaagt	2580
	ttaaagctca ggtcgagacc gggcctttgt ccggcctcc cttggagcct acctagaactc	2640

	agccggctct ccacgcttgg cctgaccctg cttgctcaac tctagttctc tegttaactt	2700
	aatgagacag atagaaactg gtctttaga aacagagtag tcgectgctt ttctgccagg	2760
	tgetgacttc tctcccctgg gctttttct tttctcagg ttgaaaagaa gaagacgaag	2820
	aagacgaaga agacaaaccg tcgtcgacat ggcgccccgc agcgccccgc gaccctgct	2880
	gctgctactg ctggttgetg tgctcggect catgcattgt ggcgcagcag caatgtttat	2940
	ggtgaaaaat ggcaacggga ccgctgcat aatggccaac ttctctgctg ccttctcagt	3000
	gaactacgac accaagagtg gccctaagaa catgaccctt gacctgccat cagatgccac	3060
	agtgggtgctc aaccgcaget cctgtggaaa agagaacct tctgaccca gtctctgat	3120
	tgcttttggg agaggacata cactcactct caatttcacg agaaatgcaa cacgttacag	3180
	cgttcagctc atgagttttg ttataactt gtcagacaca caccttttcc ccaatgcgag	3240
	ctccaaagaa atcaagactg tggaatctat aactgacatc agggcagata tagataaaaa	3300
[0006]	atacagatgt gttagtggca ccaggtcca catgaacaac gtgaccgtaa cgctccatga	3360
	tgccaccatc caggcgtacc ttccaacag cagcttcagc aggggagaga cacgctgtga	3420
	acaagacagg cttccccaa ccacagcgcc cctgcgcca ccagcccct cgcctcacc	3480
	cgtgcccaag agcccctctg tggacaagta caacgtgagc ggcaccaacg ggacctgct	3540
	gctggccagc atggggctgc agctgaacct cacctatgag aggaaggaca acacgacgt	3600
	gacaagctt ctcaacatca accccaacaa gacctcgcc agcgggagct gcggcgccca	3660
	cctggtgact ctggagctgc acagcgagg caccaccgtc ctgctcttc agttcgggat	3720
	gaatgcaagt tctagccggt ttictctaca agaatccag ttgaatacaa ttcttctga	3780
	cgccagagac cctgcctta aagetgcaa cggctccctg cgagcgtgc agccacagt	3840
	cgcaattec tacaagtgc acgcggagga gcacgtcgt gtcacgaagg cgtttcagt	3900
	caatataatc aaagtgtggg tccaggcttt caaggtggaa ggtggccagt ttggctctgt	3960

ggaggagtgt ctgctggacg agaacagcct cgaggatcag tcagegcaga tcatgctgga. 4020
tagcgtggtg gagaagtacc tgaggagtaa caggtcactg cgcaaggttg agcattccag 4080
acacgacget atcaacatct tcaacgtgga gaagtacggt gctgtcggag acgggaagca 4140
cgactgcacc gaagcct 4157

<210> 3

<211> 911

<212> PRT

<213> *Cryptomeria japonica*

<400> 3

Met Ala Pro Arg Ser Ala Arg Arg Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu
i 5 10 15

[0007] Leu Leu Leu Gly Leu Met His Cys Ala Ser Ala Ala Met Phe Met Val
20 25 30

Lys Asn Gly Asn Gly Thr Ala Cys Ile Met Ala Asn Phe Ser Ala Ala
35 40 45

Phe Ser Val Asn Tyr Asp Thr Lys Ser Gly Pro Lys Asn Met Thr Leu
50 55 60

Asp Leu Pro Ser Asp Ala Thr Val Val Leu Asn Arg Ser Ser Cys Gly
65 70 75 80

Lys Glu Asn Thr Ser Asp Pro Ser Leu Val Ile Ala Phe Gly Arg Gly
85 90 95

His Thr Leu Thr Leu Asn Phe Thr Arg Asn Ala Thr Arg Tyr Ser Val
100 105 110

Gln Leu Met Ser Phe Val Tyr Asn Leu Ser Asp Thr His Leu Phe Pro
 115 120 125

Asn Ala Ser Ser Lys Glu Ile Lys Thr Val Glu Ser Ile Thr Asp Ile
 130 135 140

Arg Ala Asp Ile Asp Lys Lys Tyr Arg Cys Val Ser Gly Thr Gln Val
 145 150 155 160

His Met Asn Asn Val Thr Val Thr Leu His Asp Ala Thr Ile Gln Ala
 165 170 175

Tyr Leu Ser Asn Ser Ser Phe Ser Arg Gly Glu Thr Arg Cys Glu Gln
 180 185 190

[0008]

Asp Arg Pro Ser Pro Thr Thr Ala Pro Pro Ala Pro Pro Ser Pro Ser
 195 200 205

Pro Ser Pro Val Pro Lys Ser Pro Ser Val Asp Lys Tyr Asn Val Ser
 210 215 220

Gly Thr Asn Gly Thr Cys Leu Leu Ala Ser Met Gly Leu Gln Leu Asn
 225 230 235 240

Leu Thr Tyr Glu Arg Lys Asp Asn Thr Thr Val Thr Arg Leu Leu Asn
 245 250 255

Ile Asn Pro Asn Lys Thr Ser Ala Ser Gly Ser Cys Gly Ala His Leu
 260 265 270

Val Thr Leu Glu Leu His Ser Glu Gly Thr Thr Val Leu Leu Phe Gln
 275 280 285

Phe Gly Met Asn Ala Ser Ser Ser Arg Phe Phe Leu Gln Gly Ile Gln
 290 295 300

Leu Asn Thr Ile Leu Pro Asp Ala Arg Asp Pro Ala Phe Lys Ala Ala
 305 310 315 320

Asn Gly Ser Leu Arg Ala Leu Gln Ala Thr Val Gly Asn Ser Tyr Lys
 325 330 335

Cys Asn Ala Glu Glu His Val Arg Val Thr Lys Ala Phe Ser Val Asn
 340 345 350

Ile Phe Lys Val Trp Val Gln Ala Phe Lys Val Glu Gly Gly Gln Phe
 355 360 365

[0009]

Gly Ser Val Glu Glu Cys Leu Leu Asp Glu Asn Ser Leu Glu Asp Gln
 370 375 380

Ser Ala Gln Ile Met Leu Asp Ser Val Val Glu Lys Tyr Leu Arg Ser
 385 390 395 400

Asn Arg Ser Leu Arg Lys Val Glu His Ser Arg His Asp Ala Ile Asn
 405 410 415

Ile Phe Asn Val Glu Lys Tyr Gly Ala Val Gly Asp Gly Lys His Asp
 420 425 430

Cys Thr Glu Ala Phe Ser Thr Ala Trp Gln Ala Ala Cys Lys Asn Pro
 435 440 445

Ser Ala Met Leu Leu Val Pro Gly Ser Lys Lys Phe Val Val Asn Asn
 450 455 460

	Leu	Phe	Phe	Asn	Gly	Pro	Cys	Gln	Pro	His	Phe	Thr	Phe	Lys	Val	Asp
	465					470					475					480
	Gly	Ile	Ile	Ala	Ala	Tyr	Gln	Asn	Pro	Ala	Ser	Trp	Lys	Asn	Asn	Arg
				485					490						495	
	Ile	Trp	Leu	Gln	Phe	Ala	Lys	Leu	Thr	Gly	Phe	Thr	Leu	Met	Gly	Lys
			500					505						510		
	Gly	Val	Ile	Asp	Gly	Gln	Gly	Lys	Gln	Trp	Trp	Ala	Gly	Gln	Cys	Lys
			515					520					525			
	Trp	Val	Asn	Gly	Arg	Glu	Ile	Cys	Asn	Asp	Arg	Asp	Arg	Pro	Thr	Ala
	530						535				540					
[0010]	Ile	Lys	Phe	Asp	Phe	Ser	Thr	Gly	Leu	Ile	Ile	Gln	Gly	Leu	Lys	Leu
	545					550					555					560
	Met	Asn	Ser	Pro	Glu	Phe	His	Leu	Val	Phe	Gly	Asn	Cys	Glu	Gly	Val
					565					570					575	
	Lys	Ile	Ile	Gly	Ile	Ser	Ile	Thr	Ala	Pro	Arg	Asp	Ser	Pro	Asn	Thr
			580					585						590		
	Asp	Gly	Ile	Asp	Ile	Phe	Ala	Ser	Lys	Asn	Phe	His	Leu	Gln	Lys	Asn
		595					600						605			
	Thr	Ile	Gly	Thr	Gly	Asp	Asp	Cys	Val	Ala	Ile	Gly	Thr	Gly	Ser	Ser
	610						615					620				
	Asn	Ile	Val	Ile	Glu	Asp	Leu	Ile	Cys	Gly	Pro	Gly	His	Gly	Ile	Ser
	625				630						635					640

Ile Gly Ser Leu Gly Arg Glu Asn Ser Arg Ala Glu Val Ser Tyr Val
645 650 655

His Val Asn Gly Ala Lys Phe Ile Asp Thr Gln Asn Gly Leu Arg Ile
660 665 670

Lys Thr Trp Gln Gly Gly Ser Gly Met Ala Ser His Ile Ile Tyr Glu
675 680 685

Asn Val Glu Met Ile Asn Ser Glu Asn Pro Ile Leu Ile Asn Gln Phe
690 695 700

Tyr Cys Thr Ser Ala Ser Ala Cys Gln Asn Gln Arg Ser Ala Val Gln
705 710 715 720

[0011] Ile Gln Asp Val Thr Tyr Lys Asn Ile Arg Gly Thr Ser Ala Thr Ala
725 730 735

Ala Ala Ile Gln Leu Lys Cys Ser Asp Ser Met Pro Cys Lys Asp Ile
740 745 750

Lys Leu Ser Asp Ile Ser Leu Lys Leu Thr Ser Gly Lys Ile Ala Ser
755 760 765

Cys Leu Asn Asp Asn Ala Asn Gly Tyr Phe Ser Gly His Val Ile Pro
770 775 780

Ala Cys Lys Asn Leu Ser Pro Ser Ala Lys Arg Lys Glu Ser Lys Ser
785 790 795 800

His Lys His Pro Lys Thr Val Met Val Glu Asn Met Arg Ala Tyr Asp
805 810 815

Lys Gly Asn Arg Thr Arg Ile Leu Leu Gly Ser Arg Pro Pro Asn Cys
 820 825 830

Thr Asn Lys Cys His Gly Cys Ser Pro Cys Lys Ala Lys Leu Val Ile
 835 840 845

Val His Arg Ile Met Pro Gln Glu Tyr Tyr Pro Gln Arg Trp Ile Cys
 850 855 860

Ser Cys His Gly Lys Ile Tyr His Pro Glu Phe Thr Leu Ile Pro Ile
 865 870 875 880

Ala Val Gly Gly Ala Leu Ala Gly Leu Val Leu Ile Val Leu Ile Ala
 885 890 895

[0012] Tyr Leu Val Gly Arg Lys Arg Ser His Ala Gly Tyr Gln Thr Ile
 900 905 910

<210> 4

<211> 5326

<212> DNA

<213> *Cryptomeria japonica*

<400> 4

ccgcctaagt agcgggcttt tttttcttag ggtgcaaaag gagagcctgt aagcgggcac 60

tcttcctgg tctggtgat aaattcgcaa ggtatcatg gcggacgacc ggggttcgag 120

ccccgtatec ggccgtccgc cgtgatccat gcggttaccg cccgcgtgtc gaaccaggt 180

gtgcgacgtc agacaacggg ggagtgtcc ttttggett cttccccttc ttccgettcc 240

tcgctcaactg actcgetgcg ctcggtcgtt cggetgcgge gageggtate agetcactca 300

aaggcggtaa tacggttate cacagaatca ggggataacg caggaaagaa catgtgagca 360

aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt tgctggcggt ttccatagg 420

	ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgctcaa gtcagagggtg gcgaaacccg	480
	acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaaget cctcgtgcg ctctctgtt	540
	ccgaccctgc cgcttaccgg atacctgtcc gcccttctce cttegggaag cgtggcgctt	600
	tctcataget cacgctgtag gtatctcagt tcgggtgtagg tctgtctctc caagetgggc	660
	tgtgtgcaag aacccccctg tcageccgac cgctgcgect tatecggtaa ctatcgtctt	720
	gagtecaacc cgtaagaca cgacttatcg ccactggcag cageccactgg taacaggatt	780
	agcagagcga ggtatgtagg cgggtctaca gaggctctga agtggtggcc taactacgce	840
	tacaactagaa gaacagtatt tggatctgc gctctctga agccagttac ctteggaaaa	900
	agagttggta gctcttgatc cgcaaaaaa accaccgetg gtagcgggtg ttttttgtt	960
	tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaaa ggatctcaag aagatccttt gatctttct	1020
	acggggtctg acgctcagtg gaacgaaaac tcacgttaag ggattttggt catgagatta	1080
[0013]	tcaaaaagga tcttcacctg gatcctttta aattaaat gaagtttta atcaatctaa	1140
	agtatatatg agtaaacctg gtctgacagt taccaatgct taatcagtga ggcacctatc	1200
	tcagcgatct gtctattctg ttcattcata gttgcctgac tcttcaaac cacgtttgtg	1260
	tagaattggt aaagagagtc gtgtaaaata tcgagttcgc acatcttgtt gtctgattat	1320
	tgatttttgg cgaaaceatt tgatcatatg acaagatgtg tatctacctt aacttaatga	1380
	ttttgataaa aatcattagg taccceggct ctagatggca tgacattaac ctataaaaa	1440
	aggcgtatca cgaggccctt tcgtctcgcg cgtttcgggt atgacggtga aaacctctga	1500
	cacatgcagc tcccggagac ggtcacagct tgtctgtaag cggatgccgg gacagacaaa	1560
	gcccgtcagg gcgcgtcagc ggggtttggc ggggtctcgg gctggcttaa ctatcggca	1620
	tcagagcaga ttgtactgag agtgcaccat atgcgggtgt aaataccgca cagatgcgta	1680
	aggagaaaa accgcacag attggctatt ggccattgca tacgttgtat ccatacata	1740

	atatgtacat ttatattggc tcatgtccaa cattaccgce atgttgacat tgattattga	1800
	ctagttatta atagtaatec attacggggt cattagttca tageccatat atggagtcc	1860
	gcgttacafa acttacggta aatggcccgc ctggetgacc gcccaacgac ccccgccat	1920
	tgacgtcaat aatgacgtat gticcacatag taacgccaat agggacttcc cattgaegtc	1980
	aatgggtgga gtatttaegg taaactgccc acttggcagt acatcaagtg tatcatatgc	2040
	caagtaagcc cccatttgac gtcaatgacg gtaaattgcc cgcttgcat tatgccagc	2100
	acatgacctt atgggacctt cctacttggc agtacatctc cgtattagtc atcctatca	2160
	ccatggtgat gcggttttgg cagtacatca atgggcgtgg atagcggttt gactcacggg	2220
	gatttccaag tctccacccc attgacgtca atgggagttt gttttggcac caaaatcaac	2280
	gggactttcc aaaatgtcgt aacaactccg ccccatggac gcaaattggc ggtaggcgtg	2340
	tacggtggga ggtctatata agcagagctc gtttagtgaa ccgtcagatc gcctggagac	2400
[0014]	gccatccacg ctgttttgac ctccatagaa gacaccggga ccgatccagc ctcccggtct	2460
	cgcatctctc ctteacgcgc ccgcgcctt acctgaggcc gccatccacg ccggttgagt	2520
	cgcgttctgc cgctccgc ctgtggtgcc tcttgaactg cgtccgccgt ctaggtaagt	2580
	ttaaagctca ggtcgagacc gggcctttgt ccggcctccc ctggagcct acctagactc	2640
	agccggtctt ccacgctttg cctgacctg ctgctcaac tctagttctc tctttaactt	2700
	aatgagacag atagaaactg gtctttaga aacagagtag tgcctgctt ttctgccagg	2760
	tgctgacttc tctcccctgg gctttttct tttctcagg ttgaaaagaa gaagacgaag	2820
	aagacgaaga agacaaaccg tctcgacat ggcgcccgc agcgcccgc gacctgct	2880
	gctgctactg ctgttgetgc tgctcgccct catgcattgt gctcagcag caatgtttat	2940
	ggtgaaaaat ggcaacggga ccgctgcat aatggccaac ttctctgctg ccttctcagt	3000
	gaactacgac accaagagtg gccctaagaa catgacctt gacctgcat cagatgccac	3060

	agtgggtgctc aaccgcagct cctgtgaaa agagaacact tctgaccca gtctctgat	3120
	tgcttttggga agaggacata cactcactct caatttcacg agaaatgcaa cacgttacag	3180
	egttcagctc atgagttttg tttataactt gtcagacaca caccttticc ccaatgcgag	3240
	ctccaaagaa atcaagactg tggaatctat aactgacatc agggcagata tagataaaaa	3300
	atacagatgt gttagtggca cccaggtcca catgaacaac gtgaccgtaa egctccatga	3360
	tgccaccatc caggegtacc ttccaacag cagcttcagc aggggagaga cacgctgtga	3420
	acaagacagg cctccccaa ccacagcgc cctctgcga cccagcccc cgcctcacc	3480
	cgtagccaag agccccctcg tggacaagta caacgtgagc ggcaccaacg ggacctgect	3540
	gctggccagc atggggctgc agctgaacct cacctatgag aggaaggaca acacgacgt	3600
	gacaaggctt ctcaacatca accecaaca gacctcgcc agcgggagct gcggcgccca	3660
	cctgtgact ctggagctgc acagcgagg caccaccgtc ctgctctcc agttcgggat	3720
[0015]	gaatgcaagt tctagccggt ttttctaca aggaatccag ttgaatacaa ttcttctga	3780
	cgccagagac cctgcctta aagetgcaa cggctcctg cgagcctgc aggccacagt	3840
	eggcaattcc tacaagtgca acgcggagga gcacgtcct gtcacgaagg cgttttcagt	3900
	caatatattc aaagtgtggg tccagcttt caaggtgaa ggtggccagt ttgctctgt	3960
	ggaggagtgt ctgctggacg agaacagcct cgaggacaat cctattgatt cctgctggcg	4020
	tggagattct aactggcac agaaccggat gaaactgct gactgtccg tggccttgg	4080
	ctcttccact atgggagga agggaggcga cctgtacact gttacaaca gcgacgaca	4140
	ccctgtcaat ccagcacccg gaaccttgag atatggtgca acgcgagacc gaccacttg	4200
	gatcatcttt agcggaaaca tgaacatcaa gttgaagatg cctatgtaca tagctgggta	4260
	caaaaccttc gacggcagag gageccaagt gtacattggc aacggaggtc cctgcgtgtt	4320
	catcaagcgt gttagtaatg tgatcattca cggctcgcac ctctatggct gttcaacaag	4380

	egtgtctggg aatgtgctga tcaatgagtc attcgggtgt gaacecgtgc acccacagga	4440
	cggatgatgc ttgacctga ggacagccac caatatctgg attgaccata acagtttctc	4500
	taacagctca gatggcctgg tggatgtcac cttgagtgc acaggggtca caatcagcaa	4560
	caatctgttc ttcaaccatc ataaggtgat gctgctgggc cagcagatg cgtattccga	4620
	cgataagagc atgaaagtga cgggtgcctt taaccagttt ggtcctaact gtggacagcg	4680
	gatgcctaga gccaggtacg gactgggtgca cgtggccaac aacaactatg atccgtggac	4740
	tatctatgca attggcgggt cttccaacc gacgatactg agtgaagggg actcctttac	4800
	cgctcccaat gagagetaca agaagcaggt caccatccgc ataggtgca aaactagttc	4860
	atcctgtagc aactgggtgt ggcagtccac tcaagatgct tctacaacg gagcttactt	4920
	cgtttagcagt gggaaatacg aagggtggca catatacaca aagaaagagg ctttcaatgt	4980
	ggagaatggc aatgccacac ccagctcac caagaatgca gggglgctca cctgctccct	5040
[0016]	gagcaaacgg tgcgaattca cgtgatccc catcgtgtg ggtggtgccc tggcggggct	5100
	ggctctcacc gtctctatcg cctacctcgt cggcaggaag aggagtcaag caggctacca	5160
	gactatctag taaagatctt ttccctctg ccaaaaatta tggggacatc atgaagccce	5220
	ttgagcatct gacttctggc taataaagga aatttatitt cattgcaata gtgtgttggg	5280
	atTTTTgtg tctctcactc ggaaggacat aaggcggccc gctagc	5326

<210> 5

<211> 773

<212> PRT

<213> *Cryptomeria japonica*

<400> 5

Met Ala Pro Arg Ser Ala Arg Arg Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15

Leu Leu Leu Gly Leu Met His Cys Ala Ser Ala Ala Met Phe Met Val

	20		25		30
Lys Asn Gly Asn Gly Thr Ala Cys Ile Met Ala Asn Phe Ser Ala Ala					
	35		40		45
Phe Ser Val Asn Tyr Asp Thr Lys Ser Gly Pro Lys Asn Met Thr Leu					
	50		55		60
Asp Leu Pro Ser Asp Ala Thr Val Val Leu Asn Arg Ser Ser Cys Gly					
65		70		75	80
Lys Glu Asn Thr Ser Asp Pro Ser Leu Val Ile Ala Phe Gly Arg Gly					
		85		90	95
His Thr Leu Thr Leu Asn Phe Thr Arg Asn Ala Thr Arg Tyr Ser Val					
	100		105		110
[0017]					
Gln Leu Met Ser Phe Val Tyr Asn Leu Ser Asp Thr His Leu Phe Pro					
	115		120		125
Asn Ala Ser Ser Lys Glu Ile Lys Thr Val Glu Ser Ile Thr Asp Ile					
	130		135		140
Arg Ala Asp Ile Asp Lys Lys Tyr Arg Cys Val Ser Gly Thr Gln Val					
	145		150		155
His Met Asn Asn Val Thr Val Thr Leu His Asp Ala Thr Ile Gln Ala					
		165		170	175
Tyr Leu Ser Asn Ser Ser Phe Ser Arg Gly Glu Thr Arg Cys Glu Gln					
	180		185		190
Asp Arg Pro Ser Pro Thr Thr Ala Pro Pro Ala Pro Pro Ser Pro Ser					

	195		200		205														
Pro Ser Pro Val Pro Lys Ser		Pro Ser Val Asp Lys Tyr Asn Val Ser																	
210		215				220													
Gly Thr Asn Gly Thr Cys Leu Leu Ala Ser Met Gly Leu Gln Leu Asn																			
225		230				235													240
Leu Thr Tyr Glu Arg Lys Asp Asn Thr Thr Val Thr Arg Leu Leu Asn																			
		245				250													255
Ile Asn Pro Asn Lys Thr Ser Ala Ser Gly Ser Cys Gly Ala His Leu																			
		260				265													270
Val Thr Leu Glu Leu His Ser Glu Gly Thr Thr Val Leu Leu Phe Gln																			
		275				280													285
[0018]																			
Phe Gly Met Asn Ala Ser Ser Ser Arg Phe Phe Leu Gln Gly Ile Gln																			
290					295														300
Leu Asn Thr Ile Leu Pro Asp Ala Arg Asp Pro Ala Phe Lys Ala Ala																			
305				310						315									320
Asn Gly Ser Leu Arg Ala Leu Gln Ala Thr Val Gly Asn Ser Tyr Lys																			
			325							330									335
Cys Asn Ala Glu Glu His Val Arg Val Thr Lys Ala Phe Ser Val Asn																			
			340							345									350
Ile Phe Lys Val Trp Val Gln Ala Phe Lys Val Glu Gly Gly Gln Phe																			
			355							360									365
Gly Ser Val Glu Glu Cys Leu Leu Asp Glu Asn Ser Leu Glu Asp Asn																			

370	375	380	
Pro Ile Asp Ser Cys Trp Arg Gly Asp Ser Asn Trp Ala Gln Asn Arg			
385	390	395	400
Met Lys Leu Ala Asp Cys Ala Val Gly Phe Gly Ser Ser Thr Met Gly			
	405	410	415
Gly Lys Gly Gly Asp Leu Tyr Thr Val Thr Asn Ser Asp Asp Asp Pro			
	420	425	430
Val Asn Pro Ala Pro Gly Thr Leu Arg Tyr Gly Ala Thr Arg Asp Arg			
	435	440	445
Pro Leu Trp Ile Ile Phe Ser Gly Asn Met Asn Ile Lys Leu Lys Met			
	450	455	460
[0019]			
Pro Met Tyr Ile Ala Gly Tyr Lys Thr Phe Asp Gly Arg Gly Ala Gln			
465	470	475	480
Val Tyr Ile Gly Asn Gly Gly Pro Cys Val Phe Ile Lys Arg Val Ser			
	485	490	495
Asn Val Ile Ile His Gly Leu His Leu Tyr Gly Cys Ser Thr Ser Val			
	500	505	510
Leu Gly Asn Val Leu Ile Asn Glu Ser Phe Gly Val Glu Pro Val His			
	515	520	525
Pro Gln Asp Gly Asp Ala Leu Thr Leu Arg Thr Ala Thr Asn Ile Trp			
	530	535	540
Ile Asp His Asn Ser Phe Ser Asn Ser Ser Asp Gly Leu Val Asp Val			

545	550	555	560
Thr Leu Ser Ser Thr Gly Val Thr Ile Ser Asn Asn Leu Phe Phe Asn	565	570	575
His His Lys Val Met Leu Leu Gly His Asp Asp Ala Tyr Ser Asp Asp	580	585	590
Lys Ser Met Lys Val Thr Val Ala Phe Asn Gln Phe Gly Pro Asn Cys	595	600	605
Gly Gln Arg Met Pro Arg Ala Arg Tyr Gly Leu Val His Val Ala Asn	610	615	620
Asn Asn Tyr Asp Pro Trp Thr Ile Tyr Ala Ile Gly Gly Ser Ser Asn	625	630	635
[0020]			
Pro Thr Ile Leu Ser Glu Gly Asn Ser Phe Thr Ala Pro Asn Glu Ser	645	650	655
Tyr Lys Lys Gln Val Thr Ile Arg Ile Gly Cys Lys Thr Ser Ser Ser	660	665	670
Cys Ser Asn Trp Val Trp Gln Ser Thr Gln Asp Val Phe Tyr Asn Gly	675	680	685
Ala Tyr Phe Val Ser Ser Gly Lys Tyr Glu Gly Gly Asn Ile Tyr Thr	690	695	700
Lys Lys Glu Ala Phe Asn Val Glu Asn Gly Asn Ala Thr Pro Gln Leu	705	710	715
Thr Lys Asn Ala Gly Val Leu Thr Cys Ser Leu Ser Lys Arg Cys Glu			

725

730

735

Phe Thr Leu Ile Pro Ile Ala Val Gly Gly Ala Leu Ala Gly Leu Val
 740 745 750

Leu Ile Val Leu Ile Ala Tyr Leu Val Gly Arg Lys Arg Ser His Ala
 755 760 765

Gly Tyr Gln Thr Ile
 770

<210> 6

<211> 1270

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

[0021]

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 chimeric polypeptide of Cry J1 and CryJ2 allergens of
 c. japonica

<400> 6

Met Ala Pro Arg Ser Ala Arg Arg Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Gly Leu Met His Cys Ala Ser Ala Ala Met Phe Met Val
 20 25 30

Lys Asn Gly Asn Gly Thr Ala Cys Ile Met Ala Asn Phe Ser Ala Ala
 35 40 45

Phe Ser Val Asn Tyr Asp Thr Lys Ser Gly Pro Lys Asn Met Thr Leu
 50 55 60

Asp Leu Pro Ser Asp Ala Thr Val Val Leu Asn Arg Ser Ser Cys Gly
 65 70 75 80

	Lys	Glu	Asn	Thr	Ser	Asp	Pro	Ser	Leu	Val	Ile	Ala	Phe	Gly	Arg	Gly	
					85					90					95		
	His	Thr	Leu	Thr	Leu	Asn	Phe	Thr	Arg	Asn	Ala	Thr	Arg	Tyr	Ser	Val	
			100						105					110			
	Gln	Leu	Met	Ser	Phe	Val	Tyr	Asn	Leu	Ser	Asp	Thr	His	Leu	Phe	Pro	
			115					120					125				
	Asn	Ala	Ser	Ser	Lys	Glu	Ile	Lys	Thr	Val	Glu	Ser	Ile	Thr	Asp	Ile	
		130					135					140					
	Arg	Ala	Asp	Ile	Asp	Lys	Lys	Tyr	Arg	Cys	Val	Ser	Gly	Thr	Gln	Val	
	145					150					155					160	
[0022]	His	Met	Asn	Asn	Val	Thr	Val	Thr	Leu	His	Asp	Ala	Thr	Ile	Gln	Ala	
					165				170						175		
	Tyr	Leu	Ser	Asn	Ser	Ser	Phe	Ser	Arg	Gly	Glu	Thr	Arg	Cys	Glu	Gln	
			180						185					190			
	Asp	Arg	Pro	Ser	Pro	Thr	Thr	Ala	Pro	Pro	Ala	Pro	Pro	Ser	Pro	Ser	
			195					200						205			
	Pro	Ser	Pro	Val	Pro	Lys	Ser	Pro	Ser	Val	Asp	Lys	Tyr	Asn	Val	Ser	
		210					215					220					
	Gly	Thr	Asn	Gly	Thr	Cys	Leu	Leu	Ala	Ser	Met	Gly	Leu	Gln	Leu	Asn	
	225					230					235					240	
	Leu	Thr	Tyr	Glu	Arg	Lys	Asp	Asn	Thr	Thr	Val	Thr	Arg	Leu	Leu	Asn	
					245					250						255	

Ile Asn Pro Asn Lys Thr Ser Ala Ser Gly Ser Cys Gly Ala His Leu
260 265 270

Val Thr Leu Glu Leu His Ser Glu Gly Thr Thr Val Leu Leu Phe Gln
275 280 285

Phe Gly Met Asn Ala Ser Ser Ser Arg Phe Phe Leu Gln Gly Ile Gln
290 295 300

Leu Asn Thr Ile Leu Pro Asp Ala Arg Asp Pro Ala Phe Lys Ala Ala
305 310 315 320

Asn Gly Ser Leu Arg Ala Leu Gln Ala Thr Val Gly Asn Ser Tyr Lys
325 330 335

[0023] Cys Asn Ala Glu Glu His Val Arg Val Thr Lys Ala Phe Ser Val Asn
340 345 350

Ile Phe Lys Val Trp Val Gln Ala Phe Lys Val Glu Gly Gly Gln Phe
355 360 365

Gly Ser Val Glu Glu Cys Leu Leu Asp Glu Asn Ser Leu Glu Asp Asn
370 375 380

Pro Ile Asp Ser Cys Trp Arg Gly Asp Ser Asn Trp Ala Gln Asn Arg
385 390 395 400

Met Lys Leu Ala Asp Cys Ala Val Gly Phe Gly Ser Ser Thr Met Gly
405 410 415

Gly Lys Gly Gly Asp Leu Tyr Thr Val Thr Asn Ser Asp Asp Asp Pro
420 425 430

	Val Asn Pro Ala Pro Gly Thr Leu Arg Tyr Gly Ala Thr Arg Asp Arg		
	435	440	445
	Pro Leu Trp Ile Ile Phe Ser Gly Asn Met Asn Ile Lys Leu Lys Met		
	450	455	460
	Pro Met Tyr Ile Ala Gly Tyr Lys Thr Phe Asp Gly Arg Gly Ala Gln		
	465	470	475 480
	Val Tyr Ile Gly Asn Gly Gly Pro Cys Val Phe Ile Lys Arg Val Ser		
		485	490 495
	Asn Val Ile Ile His Gly Leu His Leu Tyr Gly Cys Ser Thr Ser Val		
		500	505 510
[0024]	Leu Gly Asn Val Leu Ile Asn Glu Ser Phe Gly Val Glu Pro Val His		
	515	520	525
	Pro Gln Asp Gly Asp Ala Leu Thr Leu Arg Thr Ala Thr Asn Ile Trp		
	530	535	540
	Ile Asp His Asn Ser Phe Ser Asn Ser Ser Asp Gly Leu Val Asp Val		
	545	550	555 560
	Thr Leu Ser Ser Thr Gly Val Thr Ile Ser Asn Asn Leu Phe Phe Asn		
		565	570 575
	His His Lys Val Met Leu Leu Gly His Asp Asp Ala Tyr Ser Asp Asp		
		580	585 590
	Lys Ser Met Lys Val Thr Val Ala Phe Asn Gln Phe Gly Pro Asn Cys		
	595	600	605

Gly Gln Arg Met Pro Arg Ala Arg Tyr Gly Leu Val His Val Ala Asn
 610 615 620

Asn Asn Tyr Asp Pro Trp Thr Ile Tyr Ala Ile Gly Gly Ser Ser Asn
 625 630 635 640

Pro Thr Ile Leu Ser Glu Gly Asn Ser Phe Thr Ala Pro Asn Glu Ser
 645 650 655

Tyr Lys Lys Gln Val Thr Ile Arg Ile Gly Cys Lys Thr Ser Ser Ser
 660 665 670

Cys Ser Asn Trp Val Trp Gln Ser Thr Gln Asp Val Phe Tyr Asn Gly
 675 680 685

[0025] Ala Tyr Phe Val Ser Ser Gly Lys Tyr Glu Gly Gly Asn Ile Tyr Thr
 690 695 700

Lys Lys Glu Ala Phe Asn Val Glu Asn Gly Asn Ala Thr Pro Gln Leu
 705 710 715 720

Thr Lys Asn Ala Gly Val Leu Thr Cys Ser Leu Ser Lys Arg Cys Gly
 725 730 735

Gly Gly Gly Leu Glu Asp Gln Ser Ala Gln Ile Met Leu Asp Ser Val
 740 745 750

Val Glu Lys Tyr Leu Arg Ser Asn Arg Ser Leu Arg Lys Val Glu His
 755 760 765

Ser Arg His Asp Ala Ile Asn Ile Phe Asn Val Glu Lys Tyr Gly Ala
 770 775 780

	Val Gly Asp Gly Lys His Asp Cys Thr Glu Ala Phe Ser Thr Ala Trp																		
	785				790					795									800
	Gln Ala Ala Cys Lys Asn Pro Ser Ala Met Leu Leu Val Pro Gly Ser																		
				805					810										815
	Lys Lys Phe Val Val Asn Asn Leu Phe Phe Asn Gly Pro Cys Gln Pro																		
			820						825										830
	His Phe Thr Phe Lys Val Asp Gly Ile Ile Ala Ala Tyr Gln Asn Pro																		
			835						840										845
	Ala Ser Trp Lys Asn Asn Arg Ile Trp Leu Gln Phe Ala Lys Leu Thr																		
			850						855										860
[0026]	Gly Phe Thr Leu Met Gly Lys Gly Val Ile Asp Gly Gln Gly Lys Gln																		
	865				870					875									880
	Trp Trp Ala Gly Gln Cys Lys Trp Val Asn Gly Arg Glu Ile Cys Asn																		
			885						890										895
	Asp Arg Asp Arg Pro Thr Ala Ile Lys Phe Asp Phe Ser Thr Gly Leu																		
			900						905										910
	Ile Ile Gln Gly Leu Lys Leu Met Asn Ser Pro Glu Phe His Leu Val																		
			915						920										925
	Phe Gly Asn Cys Glu Gly Val Lys Ile Ile Gly Ile Ser Ile Thr Ala																		
			930						935										940
	Pro Arg Asp Ser Pro Asn Thr Asp Gly Ile Asp Ile Phe Ala Ser Lys																		
	945				950					955									960

	Asn Phe His Leu Gln Lys Asn Thr Ile Gly Thr Gly Asp Asp Cys Val	
	965	970 975
	Ala Ile Gly Thr Gly Ser Ser Asn Ile Val Ile Glu Asp Leu Ile Cys	
	980	985 990
	Gly Pro Gly His Gly Ile Ser Ile Gly Ser Leu Gly Arg Glu Asn Ser	
	995	1000 1005
	Arg Ala Glu Val Ser Tyr Val His Val Asn Gly Ala Lys Phe Ile	
	1010	1015 1020
	Asp Thr Gln Asn Gly Leu Arg Ile Lys Thr Trp Gln Gly Gly Ser	
	1025	1030 1035
[0027]	Gly Met Ala Ser His Ile Ile Tyr Glu Asn Val Glu Met Ile Asn	
	1040	1045 1050
	Ser Glu Asn Pro Ile Leu Ile Asn Gln Phe Tyr Cys Thr Ser Ala	
	1055	1060 1065
	Ser Ala Cys Gln Asn Gln Arg Ser Ala Val Gln Ile Gln Asp Val	
	1070	1075 1080
	Thr Tyr Lys Asn Ile Arg Gly Thr Ser Ala Thr Ala Ala Ala Ile	
	1085	1090 1095
	Gln Leu Lys Cys Ser Asp Ser Met Pro Cys Lys Asp Ile Lys Leu	
	1100	1105 1110
	Ser Asp Ile Ser Leu Lys Leu Thr Ser Gly Lys Ile Ala Ser Cys	
	1115	1120 1125

Leu Asn Asp Asn Ala Asn Gly Tyr Phe Ser Gly His Val Ile Pro
 1130 1135 1140

Ala Cys Lys Asn Leu Ser Pro Ser Ala Lys Arg Lys Glu Ser Lys
 1145 1150 1155

Ser His Lys His Pro Lys Thr Val Met Val Glu Asn Met Arg Ala
 1160 1165 1170

Tyr Asp Lys Gly Asn Arg Thr Arg Ile Leu Leu Gly Ser Arg Pro
 1175 1180 1185

Pro Asn Cys Thr Asn Lys Cys His Gly Cys Ser Pro Cys Lys Ala
 1190 1195 1200

[0028]

Lys Leu Val Ile Val His Arg Ile Met Pro Gln Glu Tyr Tyr Pro
 1205 1210 1215

Gln Arg Trp Ile Cys Ser Cys His Gly Lys Ile Tyr His Pro Glu
 1220 1225 1230

Phe Thr Leu Ile Pro Ile Ala Val Gly Gly Ala Leu Ala Gly Leu
 1235 1240 1245

Val Leu Ile Val Leu Ile Ala Tyr Leu Val Gly Arg Lys Arg Ser
 1250 1255 1260

His Ala Gly Tyr Gln Thr Ile
 1265 1270

<210> 7

<211> 1672

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
chimeric polypeptide of AraH1, 2 and 3 allergens

<400> 7

Met Ala Pro Arg Ser Ala Arg Arg Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15

Leu Leu Leu Gly Leu Met His Cys Ala Ser Ala Ala Met Phe Met Val
20 25 30

Lys Asn Gly Asn Gly Thr Ala Cys Ile Met Ala Asn Phe Ser Ala Ala
35 40 45

[0029]

Phe Ser Val Asn Tyr Asp Thr Lys Ser Gly Pro Lys Asn Met Thr Leu
50 55 60

Asp Leu Pro Ser Asp Ala Thr Val Val Leu Asn Arg Ser Ser Cys Gly
65 70 75 80

Lys Glu Asn Thr Ser Asp Pro Ser Leu Val Ile Ala Phe Gly Arg Gly
85 90 95

His Thr Leu Thr Leu Asn Phe Thr Arg Asn Ala Thr Arg Tyr Ser Val
100 105 110

Gln Leu Met Ser Phe Val Tyr Asn Leu Ser Asp Thr His Leu Phe Pro
115 120 125

Asn Ala Ser Ser Lys Glu Ile Lys Thr Val Glu Ser Ile Thr Asp Ile
130 135 140

	Arg	Ala	Asp	Ile	Asp	Lys	Lys	Tyr	Arg	Cys	Val	Ser	Gly	Thr	Gln	Val
	145					150					155					160
	His	Met	Asn	Asn	Val	Thr	Val	Thr	Leu	His	Asp	Ala	Thr	Ile	Gln	Ala
					165					170						175
	Tyr	Leu	Ser	Asn	Ser	Ser	Phe	Ser	Arg	Gly	Glu	Thr	Arg	Cys	Glu	Gln
				180					185						190	
	Asp	Arg	Pro	Ser	Pro	Thr	Thr	Ala	Pro	Pro	Ala	Pro	Pro	Ser	Pro	Ser
			195					200						205		
	Pro	Ser	Pro	Val	Pro	Lys	Ser	Pro	Ser	Val	Asp	Lys	Tyr	Asn	Val	Ser
	210						215					220				
[0030]	Gly	Thr	Asn	Gly	Thr	Cys	Leu	Leu	Ala	Ser	Met	Gly	Leu	Gln	Leu	Asn
	225					230					235					240
	Leu	Thr	Tyr	Glu	Arg	Lys	Asp	Asn	Thr	Thr	Val	Thr	Arg	Leu	Leu	Asn
				245						250						255
	Ile	Asn	Pro	Asn	Lys	Thr	Ser	Ala	Ser	Gly	Ser	Cys	Gly	Ala	His	Leu
				260						265						270
	Val	Thr	Leu	Glu	Leu	His	Ser	Glu	Gly	Thr	Thr	Val	Leu	Leu	Phe	Gln
			275					280							285	
	Phe	Gly	Met	Asn	Ala	Ser	Ser	Ser	Arg	Phe	Phe	Leu	Gln	Gly	Ile	Gln
	290						295					300				
	Leu	Asn	Thr	Ile	Leu	Pro	Asp	Ala	Arg	Asp	Pro	Ala	Phe	Lys	Ala	Ala
	305					310					315					320

Asn Gly Ser Leu Arg Ala Leu Gln Ala Thr Val Gly Asn Ser Tyr Lys
 325 330 335

Cys Asn Ala Glu Glu His Val Arg Val Thr Lys Ala Phe Ser Val Asn
 340 345 350

Ile Phe Lys Val Trp Val Gln Ala Phe Lys Val Glu Gly Gly Gln Phe
 355 360 365

Gly Ser Val Glu Glu Cys Leu Leu Asp Glu Asn Ser Leu Glu Lys Ser
 370 375 380

Ser Pro Tyr Gln Lys Lys Thr Glu Asn Pro Cys Ala Gln Arg Cys Leu
 385 390 395 400

[0031]

Gln Ser Cys Gln Gln Glu Pro Asp Asp Leu Lys Gln Lys Ala Cys Glu
 405 410 415

Ser Arg Cys Thr Lys Leu Glu Tyr Asp Pro Arg Cys Val Tyr Asp Pro
 420 425 430

Arg Gly His Thr Gly Thr Thr Asn Gln Arg Ser Pro Pro Gly Glu Arg
 435 440 445

Thr Arg Gly Arg Gln Pro Gly Asp Tyr Asp Asp Arg Arg Gln Pro
 450 455 460

Arg Arg Glu Glu Gly Gly Arg Trp Gly Pro Ala Gly Pro Arg Glu Arg
 465 470 475 480

Glu Arg Glu Glu Asp Trp Arg Gln Pro Arg Glu Asp Trp Arg Arg Pro
 485 490 495

Ser His Gln Gln Pro Arg Lys Ile Arg Pro Glu Gly Arg Glu Gly Glu
 500 505 510

Gln Glu Trp Gly Thr Pro Gly Ser His Val Arg Glu Glu Thr Ser Arg
 515 520 525

Asn Asn Pro Phe Tyr Phe Pro Ser Arg Arg Phe Ser Thr Arg Tyr Gly
 530 535 540

Asn Gln Asn Gly Arg Ile Arg Val Leu Gln Arg Phe Asp Gln Arg Ser
 545 550 555 560

Arg Gln Phe Gln Asn Leu Gln Asn His Arg Ile Val Gln Ile Glu Ala
 565 570 575

[0032]

Lys Pro Asn Thr Leu Val Leu Pro Lys His Ala Asp Ala Asp Asn Ile
 580 585 590

Leu Val Ile Gln Gln Gly Gln Ala Thr Val Thr Val Ala Asn Gly Asn
 595 600 605

Asn Arg Lys Ser Phe Asn Leu Asp Glu Gly His Ala Leu Arg Ile Pro
 610 615 620

Ser Gly Phe Ile Ser Tyr Ile Leu Asn Arg His Asp Asn Gln Asn Leu
 625 630 635 640

Arg Val Ala Lys Ile Ser Met Pro Val Asn Thr Pro Gly Gln Phe Glu
 645 650 655

Asp Phe Phe Pro Ala Ser Ser Arg Asp Gln Ser Ser Tyr Leu Gln Gly
 660 665 670

Phe Ser Arg Asn Thr Leu Glu Ala Ala Phe Asn Ala Glu Phe Asn Glu
 675 680 685

Ile Arg Arg Val Leu Leu Glu Glu Asn Ala Gly Gly Glu Gln Glu Glu
 690 695 700

Arg Gly Gln Arg Arg Trp Ser Thr Arg Ser Ser Glu Asn Asn Glu Gly
 705 710 715 720

Val Ile Val Lys Val Ser Lys Glu His Val Glu Glu Leu Thr Lys His
 725 730 735

Ala Lys Ser Val Ser Lys Lys Gly Ser Glu Glu Glu Gly Asp Ile Thr
 740 745 750

[0033] Asn Pro Ile Asn Leu Arg Glu Gly Glu Pro Asp Leu Ser Asn Asn Phe
 755 760 765

Gly Lys Leu Phe Glu Val Lys Pro Asp Lys Lys Asn Pro Gln Leu Gln
 770 775 780

Asp Leu Asp Met Met Leu Thr Cys Val Glu Ile Lys Glu Gly Ala Leu
 785 790 795 800

Met Leu Pro His Phe Asn Ser Lys Ala Met Val Ile Val Val Val Asn
 805 810 815

Lys Gly Thr Gly Asn Leu Glu Leu Val Ala Val Arg Lys Glu Gln Gln
 820 825 830

Gln Arg Gly Arg Arg Glu Glu Glu Glu Asp Glu Asp Glu Glu Glu Glu
 835 840 845

	Gly Ser Asn Arg	Glu Val Arg Arg Tyr Thr Ala Arg Leu Lys Glu Gly	
	850	855	860
	Asp Val Phe Ile Met Pro Ala Ala His Pro Val Ala Ile Asn Ala Ser		
	865	870	875 880
	Ser Glu Leu His Leu Leu Gly Phe Gly Ile Asn Ala Glu Asn Asn His		
		885	890 895
	Arg Ile Phe Leu Ala Gly Asp Lys Asp Asn Val Ile Asp Gln Ile Glu		
		900	905 910
	Lys Gln Ala Lys Asp Leu Ala Phe Pro Gly Ser Gly Glu Gln Val Glu		
		915	920 925
[0034]	Lys Leu Ile Lys Asn Gln Lys Glu Ser His Phe Val Ser Ala Arg Pro		
	930	935	940
	Gln Ser Gln Ser Gln Ser Pro Ser Ser Pro Glu Lys Glu Ser Pro Glu		
	945	950	955 960
	Lys Glu Asp Gln Glu Glu Glu Asn Gln Gly Gly Lys Gly Pro Leu Leu		
		965	970 975
	Ser Ile Leu Lys Ala Phe Asn Gly Gly Gly Gly Arg Gln Gln Trp Glu		
		980	985 990
	Leu Gln Gly Asp Arg Arg Cys Gln Ser Gln Leu Glu Arg Ala Asn Leu		
		995	1000 1005
	Arg Pro Cys Glu Gln His Leu Met Gln Lys Ile Gln Arg Asp Glu		
	1010	1015	1020

	Asp Ser Tyr Gly Arg Asp Pro Tyr Ser Pro Ser Gln Asp Pro Tyr		
	1025	1030	1035
	Ser Pro Ser Gln Asp Pro Asp Arg Arg Asp Pro Tyr Ser Pro Ser		
	1040	1045	1050
	Pro Tyr Asp Arg Arg Gly Ala Gly Ser Ser Gln His Gln Glu Arg		
	1055	1060	1065
	Cys Cys Asn Glu Leu Asn Glu Phe Glu Asn Asn Gln Arg Cys Met		
	1070	1075	1080
	Cys Glu Ala Leu Gln Gln Ile Met Glu Asn Gln Ser Asp Arg Leu		
	1085	1090	1095
[0035]	Gln Gly Arg Gln Gln Glu Gln Gln Phe Lys Arg Glu Leu Arg Asn		
	1100	1105	1110
	Leu Pro Gln Gln Cys Gly Leu Arg Ala Pro Gln Arg Cys Asp Leu		
	1115	1120	1125
	Glu Val Glu Ser Gly Gly Arg Asp Arg Tyr Gly Gly Gly Gly Val		
	1130	1135	1140
	Thr Phe Arg Gln Gly Gly Glu Glu Asn Glu Cys Gln Phe Gln Arg		
	1145	1150	1155
	Leu Asn Ala Gln Arg Pro Asp Asn Arg Ile Glu Ser Glu Gly Gly		
	1160	1165	1170
	Tyr Ile Glu Thr Trp Asn Pro Asn Asn Gln Glu Phe Gln Cys Ala		
	1175	1180	1185

	Gly Val	Ala Leu Ser Arg Thr	Val Leu Arg Arg Asn	Ala Leu Arg
	1190	1195	1200	
	Arg Pro	Phe Tyr Ser Asn Ala	Pro Leu Glu Ile Tyr	Val Gln Gln
	1205	1210	1215	
	Gly Ser	Gly Tyr Phe Gly Leu	Ile Phe Pro Gly Cys	Pro Ser Thr
	1220	1225	1230	
	Tyr Glu	Glu Pro Ala Gln Glu	Gly Arg Arg Tyr Gln	Ser Gln Lys
	1235	1240	1245	
	Pro Ser	Arg Arg Phe Gln Val	Gly Gln Asp Asp Pro	Ser Gln Gln
	1250	1255	1260	
[0036]	Gln Gln	Asp Ser His Gln Lys	Val His Arg Phe Asp	Glu Gly Asp
	1265	1270	1275	
	Leu Ile	Ala Val Pro Thr Gly	Val Ala Phe Trp Met	Tyr Asn Asp
	1280	1285	1290	
	Glu Asp	Thr Asp Val Val Thr	Val Thr Leu Ser Asp	Thr Ser Ser
	1295	1300	1305	
	Ile His	Asn Gln Leu Asp Gln	Phe Pro Arg Arg Phe	Tyr Leu Ala
	1310	1315	1320	
	Gly Asn	Gln Glu Gln Glu Phe	Leu Arg Tyr Gln Gln	Gln Gln Gly
	1325	1330	1335	
	Ser Arg	Pro His Tyr Arg Gln	Ile Ser Pro Arg Val	Arg Gly Asp
	1340	1345	1350	

	Glu Gln	Glu Asn	Glu Gly	Ser	Asn Ile	Phe	Ser Gly	Phe Ala	Gln		
	1355			1360			1365				
	Glu Phe	Leu Gln	His Ala	Phe	Gln Val	Asp Arg	Gln	Thr Val	Glu		
	1370			1375			1380				
	Asn Leu	Arg Gly	Glu Asn	Glu	Arg Glu	Glu Gln	Gly	Ala Ile	Val		
	1385			1390			1395				
	Thr Val	Lys Gly	Gly Leu	Arg	Ile Leu	Ser Pro	Asp	Glu Glu	Asp		
	1400			1405			1410				
	Glu Ser	Ser Arg	Ser Pro	Pro	Asn Arg	Arg Glu	Glu	Phe Asp	Glu		
	1415			1420			1425				
[0037]	Asp Arg	Ser Arg	Pro Gln	Gln	Arg Gly	Lys Tyr	Asp	Glu Asn	Arg		
	1430			1435			1440				
	Arg Gly	Tyr Lys	Asn Gly	Ile	Glu Glu	Thr Ile	Cys	Ser Ala	Ser		
	1445			1450			1455				
	Val Lys	Lys Asn	Leu Gly	Arg	Ser Ser	Asn Pro	Asp	Ile Tyr	Asn		
	1460			1465			1470				
	Pro Gln	Ala Gly	Ser Leu	Arg	Ser Val	Asn Glu	Leu	Asp Leu	Pro		
	1475			1480			1485				
	Ile Leu	Gly Trp	Leu Gly	Leu	Ser Ala	Gln His	Gly	Thr Ile	Tyr		
	1490			1495			1500				
	Arg Asn	Ala Met	Phe Val	Pro	His Tyr	Thr Leu	Asn	Ala His	Thr		
	1505			1510			1515				

Ile Val Val Ala Leu Asn Gly Arg Ala His Val Gln Val Val Asp	1520	1525	1530
Ser Asn Gly Asn Arg Val Tyr Asp Glu Glu Leu Gln Glu Gly His	1535	1540	1545
Val Leu Val Val Pro Gln Asn Phe Ala Val Ala Ala Lys Ala Gln	1550	1555	1560
Ser Glu Asn Tyr Glu Tyr Leu Ala Phe Lys Thr Asp Ser Arg Pro	1565	1570	1575
Ser Ile Ala Asn Gln Ala Gly Glu Asn Ser Ile Ile Asp Asn Leu	1580	1585	1590
[0038] Pro Glu Glu Val Val Ala Asn Ser Tyr Arg Leu Pro Arg Glu Gln	1595	1600	1605
Ala Arg Gln Leu Lys Asn Asn Asn Pro Phe Lys Phe Phe Val Pro	1610	1615	1620
Pro Phe Asp His Gln Ser Met Arg Glu Val Ala Glu Phe Thr Leu	1625	1630	1635
Ile Pro Ile Ala Val Gly Gly Ala Leu Ala Gly Leu Val Leu Ile	1640	1645	1650
Val Leu Ile Ala Tyr Leu Val Gly Arg Lys Arg Ser His Ala Gly	1655	1660	1665
Tyr Gln Thr Ile	1670		

<210> 8
 <211> 225
 <212> PRT
 <213> *Cryptomeria japonica*

<400> 8
 Met Ala Lys Val Ser Asp Leu Ala Leu Leu Leu Val Ala Gly Met Ala
 1 5 10 15

Ile Ser Leu Tyr Ile Gln Glu Thr Gly Ala Val Lys Phe Asp Ile Lys
 20 25 30

Asn Gln Cys Gly Tyr Thr Val Trp Ala Ala Gly Leu Pro Gly Gly Gly
 35 40 45

Gln Gln Leu Thr Gln Gly Gln Thr Trp Thr Val Asn Leu Ala Ala Gly
 50 55 60

[0039] Thr Gln Ser Ala Arg Phe Trp Gly Arg Thr Gly Cys Ser Phe Asp Ala
 65 70 75 80

Ser Gly Lys Gly Thr Cys Gln Thr Gly Asp Cys Gly Gly Gln Leu Ser
 85 90 95

Cys Thr Val Ser Gly Ala Val Pro Ala Thr Leu Ala Glu Tyr Thr Gln
 100 105 110

Ser Asp Gln Asp Tyr Tyr Asp Val Ser Leu Val Asp Gly Phe Asn Ile
 115 120 125

Pro Leu Ser Ile Asn Pro Thr Asn Ala Gln Cys Thr Ala Pro Ala Cys
 130 135 140

Lys Ala Asp Val Asn Ala Val Cys Pro Ala Glu Leu Lys Val Asp Gly
 145 150 155 160

Gly Cys Lys Ser Ala Cys Ala Ala Phe Gln Thr Asp Gln Tyr Cys Cys
 165 170 175

Thr Gly Thr Tyr Ala Asn Ser Cys Pro Ala Thr Asn Tyr Ser Met Ile
 180 185 190

Phe Lys Asn Gln Cys Pro Gln Ala Tyr Ser Tyr Pro Lys Asp Asp Thr
 195 200 205

Ala Thr Phe Ala Cys Pro Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Ile Val Phe Cys
 210 215 220

Pro
 225

[0040]

<210> 9
 <211> 281
 <212> PRT
 <213> *Cryptomeria japonica*

<400> 9
 Met Gly Ile Met Ala Thr Gln Asn Ser Lys Ser Asn Ile Phe Trp Ser
 1 5 10 15

Ser Ser Ala Ser Val Val Leu Val Leu Leu Leu Val Asp Val Gly
 20 25 30

Val Cys Gln Asn Cys Gly Cys Asn Gly Leu Cys Cys Ser Gln Tyr Gly
 35 40 45

Tyr Cys Gly Ser Gly Glu Ala Tyr Cys Gly Ala Gly Cys Lys Glu Gly
 50 55 60

	Pro	Cys	Ser	Ser	Ser	Ser	Pro	Pro	Ser	Thr	Gly	Thr	Gly	Val	Gly	Ser	65	70	75	80
	Ile	Val	Ser	Ser	Asp	Val	Phe	Asn	Ser	Ile	Val	Gly	Gly	Ala	Ala	Ser	85	90	95	
	Gly	Cys	Ala	Gly	Asn	Gly	Phe	Tyr	Thr	Tyr	Asp	Ser	Phe	Ile	Ser	Ala	100	105	110	
	Ala	Asn	Ala	Phe	Asn	Gly	Phe	Gly	Thr	Ser	Gly	Ser	Ser	Asp	Val	Asn	115	120	125	
	Lys	Arg	Glu	Ile	Ala	Ala	Phe	Phe	Ala	Asn	Ala	Ala	His	Glu	Thr	Gly	130	135	140	
[0041]	Gly	Phe	Cys	Tyr	Ile	Glu	Glu	Gln	Asn	Pro	Thr	Ser	Ile	Tyr	Cys	Asp	145	150	155	160
	Ala	Ser	Asn	Thr	Gln	Tyr	Pro	Cys	Ala	Ser	Gly	Lys	Thr	Tyr	His	Gly	165	170	175	
	Arg	Gly	Pro	Leu	Gln	Leu	Ser	Trp	Asn	Tyr	Asn	Tyr	Gly	Ala	Ala	Gly	180	185	190	
	Ser	Tyr	Ile	Gln	Phe	Asp	Gly	Leu	Asn	Asn	Pro	Glu	Ile	Val	Gly	Thr	195	200	205	
	Asp	Ser	Thr	Ile	Ser	Phe	Lys	Thr	Ala	Val	Trp	Phe	Trp	Met	Val	Asn	210	215	220	
	Ser	Asn	Cys	His	Thr	Ala	Ile	Thr	Ser	Gly	Gln	Gly	Phe	Gly	Ala	Thr	225	230	235	240

Ile Arg Ala Ile Asn Ser Met Glu Cys Asp Gly Gly Asn Ala Ala Thr
 245 250 255

Val Ala Ser Arg Val Asn Tyr Tyr Gln Lys Phe Cys Gln Gln Leu Asn
 260 265 270

Val Asp Thr Gly Ser Ala Leu Gln Cys
 275 280

<210> 10

<211> 306

<212> PRT

<213> *Cryptomeria japonica*

<400> 10

Met Gly Gly Ser Arg Val Leu Ile Ile Gly Gly Thr Gly Tyr Ile Gly
 1 5 10 15

[0042]

Arg His Val Thr Asn Ala Ser Leu Ala Gln Gly His Pro Thr Phe Leu
 20 25 30

Leu Val Arg Glu Ile Thr Pro Ser Asn Pro Glu Lys Ala Gln Leu Leu
 35 40 45

Glu Ser Phe Thr Ser Lys Gly Ala Thr Leu Val Gln Gly Ser Ile Asp
 50 55 60

Asp His Ala Ser Leu Val Ala Ala Leu Lys Lys Val Asp Val Val Ile
 65 70 75 80

Ser Thr Leu Gly Ala Pro Gln Ile Ala Asp Gln Phe Asn Leu Ile Lys
 85 90 95

Ala Ile Lys Glu Val Gly Thr Ile Lys Arg Phe Phe Pro Ser Glu Phe
 100 105 110

	Gly	Asn	Asp	Val	Asp	Lys	His	His	Ala	Val	Glu	Pro	Met	Lys	Ser	Met
		115						120					125			
	Phe	Asp	Leu	Lys	Ile	Lys	Leu	Arg	Arg	Thr	Ile	Glu	Ala	Glu	Gly	Ile
		130					135					140				
	Pro	His	Thr	Tyr	Val	Val	Pro	His	Cys	Phe	Ala	Gly	Tyr	Phe	Leu	Thr
	145						150				155				160	
	Asn	Leu	Ala	Gln	Leu	Gly	Leu	Ala	Ala	Pro	Pro	Arg	Asp	Lys	Ile	Val
					165					170					175	
	Ile	Tyr	Gly	Asp	Gly	Thr	Thr	Lys	Ala	Val	Tyr	Met	Lys	Glu	Glu	Asp
			180						185					190		
[0043]	Ile	Gly	Thr	Phe	Thr	Ile	Lys	Ala	Val	Asp	Asp	Pro	Arg	Thr	Leu	Asn
		195						200						205		
	Lys	Thr	Leu	Tyr	Leu	Lys	Pro	Pro	Ala	Asn	Thr	Ile	Ser	Thr	Asn	Asp
	210						215					220				
	Leu	Val	Ala	Leu	Trp	Glu	Ala	Lys	Ile	Gly	Lys	Thr	Leu	Glu	Lys	Val
	225					230					235				240	
	Tyr	Leu	Ser	Glu	Glu	Gln	Val	Leu	Lys	Leu	Leu	Gln	Asp	Thr	Pro	Phe
				245						250					255	
	Pro	Gly	Thr	Phe	Met	Val	Ser	Ile	Phe	His	Thr	Ile	Tyr	Val	Lys	Gly
			260						265					270		
	Asp	Gln	Thr	Asn	Phe	Gln	Ile	Gly	Pro	Asp	Gly	Val	Glu	Ala	Ser	Ala
		275						280					285			

Leu Tyr Pro Asp Val Lys Tyr Thr Thr Val Glu Glu Tyr Ile Ser Ala
 290 295 300

Phe Val
 305

<210> 11

<211> 165

<212> PRT

<213> *Cryptomeria japonica*

<400> 11

Met Ala Met Arg Met Lys Ser Ser Ser Met Ser Ser Tyr Arg Phe Ser
 1 5 10 15

Tyr Cys Gln Met Met Leu Val Leu Met Val Met Thr Leu Val Gln Ile
 20 25 30

[0044]

Gly Ala Ala Gln Ser Asp Thr Asn Ser Cys Val Asn Ser Leu Val Pro
 35 40 45

Cys Ala Ser Tyr Leu Asn Ala Thr Thr Lys Pro Pro Asp Ser Cys Cys
 50 55 60

Val Pro Leu Leu Asn Val Ile Gln Thr Gln Gln Gln Cys Leu Cys Asn
 65 70 75 80

Leu Leu Asn Ser Ser Ile Val Lys Gln Ser Ser Ile Asn Ile Thr Gln
 85 90 95

Ala Leu Asn Ile Pro Arg Leu Cys Gly Asp Thr Asn Val Ser Thr Asp
 100 105 110

Ala Cys Ser Thr Asn Ala Thr Ala Asn Ala Pro Ser Ala Ser Thr Thr
 115 120 125

Pro Ser Val Pro Ala Asp Thr Gly Asp Ser Ser Gly Ile Gly Ala Thr
 130 135 140

Ser Leu Gln Ile Phe Leu Pro Leu Leu Ala Val Phe Phe Leu Gly Val
 145 150 155 160

Phe Lys Ser Phe Pro
 165

<210> 12

<211> 472

<212> PRT

<213> *Cryptomeria japonica*

[0045]

<400> 12

Met Ala Arg Arg Leu Cys Ser Phe Leu Leu Ser Phe Leu Ile Ile Val
 1 5 10 15

Ser Val Trp Ala Glu Asn Ser Lys Phe Ala Arg Leu Asn Leu Ala Ser
 20 25 30

Phe Thr Trp Lys Asp Ala Glu Asp Asn Lys Asn Cys Ser Ala Gly Glu
 35 40 45

Leu Glu Thr Ser Ser Leu Ser Val Met His Ile Gln Gly Lys Cys Ser
 50 55 60

Pro Phe Arg Leu Leu Asn Ser Ser Trp Trp Thr Ala Val Ser Glu Ser
 65 70 75 80

Ile Lys Gly Asp Thr Ala Arg Tyr Arg Ala Met Val Lys Gly Gly Trp
 85 90 95

	Ser Ala Gly Lys Thr Met Val Asn Pro Gln Glu Asp Ala Asp Ile Pro		
	100	105	110
	Leu Ala Ser Gly Gln Ala Glu Ser Ser Ser Asn Tyr Ile Ile Lys Leu		
	115	120	125
	Gly Phe Gly Thr Pro Pro Gln Ser Phe Tyr Thr Val Leu Asp Thr Gly		
	130	135	140
	Ser Asn Ile Ala Trp Ile Pro Cys Asn Pro Cys Ser Gly Cys Ser Ser		
	145	150	155
	Lys Gln Gln Pro Phe Glu Pro Ser Lys Ser Ser Thr Tyr Asn Tyr Leu		
	165	170	175
[0046]	Thr Cys Ala Ser Gln Gln Cys Gln Leu Leu Arg Val Cys Thr Lys Ser		
	180	185	190
	Asp Asn Ser Val Asn Cys Ser Leu Thr Gln Arg Tyr Gly Asp Gln Ser		
	195	200	205
	Glu Val Asp Glu Ile Leu Ser Ser Glu Thr Leu Ser Val Gly Ser Gln		
	210	215	220
	Gln Val Glu Asn Phe Val Phe Gly Cys Ser Asn Ala Ala Arg Gly Leu		
	225	230	235
	Ile Gln Arg Thr Pro Ser Leu Val Gly Phe Gly Arg Asn Pro Leu Ser		
	245	250	255
	Phe Val Ser Gln Thr Ala Thr Leu Tyr Asp Ser Thr Phe Ser Tyr Cys		
	260	265	270

	Leu Pro Ser Leu Phe Ser Ser Ala Phe Thr Gly Ser Leu Leu Gly		
	275	280	285
	Lys Glu Ala Leu Ser Ala Gln Gly Leu Lys Phe Thr Pro Leu Leu Ser		
	290	295	300
	Asn Ser Arg Tyr Pro Ser Phe Tyr Tyr Val Gly Leu Asn Gly Ile Ser		
	305	310	315 320
	Val Gly Glu Glu Leu Val Ser Ile Pro Ala Gly Thr Leu Ser Leu Asp		
		325	330 335
	Glu Ser Thr Gly Arg Gly Thr Ile Ile Asp Ser Gly Thr Val Ile Thr		
		340	345 350
[0047]	Arg Leu Val Glu Pro Ala Tyr Asn Ala Met Arg Asp Ser Phe Arg Ser		
	355	360	365
	Gln Leu Ser Asn Leu Thr Met Ala Ser Pro Thr Asp Leu Phe Asp Thr		
	370	375	380
	Cys Thr Asn Arg Pro Ser Gly Asp Val Glu Phe Pro Leu Ile Thr Leu		
	385	390	395 400
	His Phe Asp Asp Asn Leu Asp Leu Thr Leu Pro Leu Asp Asn Ile Leu		
		405	410 415
	Tyr Pro Gly Asn Asp Asp Gly Ser Val Leu Cys Leu Ala Phe Gly Leu		
		420	425 430
	Pro Pro Gly Gly Gly Asp Asp Val Leu Ser Thr Phe Gly Asn Tyr Gln		
	435	440	445

Gln Gln Lys Leu Arg Ile Val His Asp Val Ala Glu Ser Arg Leu Gly
 450 455 460

Ile Ala Ser Gly Asn Cys Asp Gly
 465 470

<210> 13

<211> 348

<212> PRT

<213> *Cryptomeria japonica*

<400> 13

Met Glu Leu Leu Lys Gln His Arg Tyr Met Phe Leu Leu Ile Ser Cys
 1 5 10 15

[0048]

Ile Val Ile Leu Leu Asn Ser Met His Ala Asp Cys Glu Gln Ile Gly
 20 25 30

Val Asn Tyr Gly Met Asp Gly Asn Asn Leu Pro Ser Ala Gly Asp Val
 35 40 45

Val Ser Leu Met Lys Lys Asn Asn Ile Gly Lys Met Arg Ile Phe Gly
 50 55 60

Pro Asn Ala Asp Val Leu Arg Ala Phe Ala Asn Ser Arg Ile Glu Val
 65 70 75 80

Ile Val Gly Val Glu Asn Lys Gly Leu Glu Ala Val Ala Ser Ser Gln
 85 90 95

Asp Ser Ala Asn Gly Trp Val Asn Asp Asn Ile Lys Pro Phe Tyr Pro
 100 105 110

	Ser Thr Asn Ile Lys Tyr Ile Ala Val Gly Asn Glu Val Leu Glu Met	
	115	120 125
	Pro Asp Asn Ala Gln Tyr Val Ser Phe Leu Val Pro Ala Ile Lys Asn	
	130	135 140
	Ile Gln Thr Ala Leu Glu Asn Ala Asn Leu Gln Asn Asn Ile Lys Val	
	145	150 155 160
	Ser Thr Ala His Ala Met Thr Val Ile Gly Thr Ser Ser Pro Pro Ser	
		165 170 175
	Lys Gly Thr Phe Lys Asp Ala Val Lys Asp Ser Met Ser Ser Ile Leu	
		180 185 190
[0049]	Gln Phe Leu Gln Asp His Gly Ser Pro Phe Met Ala Asn Val Tyr Pro	
	195	200 205
	Tyr Phe Ser Tyr Asp Gly Asp Arg Ser Ile Lys Leu Asp Tyr Ala Leu	
	210	215 220
	Phe Asn Pro Thr Pro Pro Val Val Asp Glu Gly Leu Ser Tyr Thr Asn	
	225	230 235 240
	Leu Phe Asp Ala Met Val Asp Ala Val Leu Ser Ala Met Glu Ser Leu	
		245 250 255
	Gly His Pro Asn Ile Pro Ile Val Ile Thr Glu Ser Gly Trp Pro Ser	
		260 265 270
	Ala Gly Lys Ser Val Ala Thr Ile Glu Asn Ala Gln Thr Tyr Asn Asn	
	275	280 285

Asn Leu Ile Lys His Val Leu Ser Asn Ala Gly Thr Pro Lys Arg Pro
 290 295 300

Gly Ser Ser Ile Glu Thr Tyr Ile Phe Ala Leu Phe Asn Glu Asn Leu
 305 310 315 320

Lys Gly Pro Ala Glu Val Glu Lys His Phe Gly Leu Phe Asn Pro Asp
 325 330 335

Glu Gln Pro Val Tyr Pro Val Lys Phe Ser Leu Asn
 340 345

<210> 14

<211> 375

<212> PRT

<213> Chamaccyparis obtusa

[0050]

<400> 14

Met Ala Ser Cys Thr Leu Leu Ala Val Leu Val Phe Leu Cys Ala Ile
 1 5 10 15

Val Ser Cys Phe Ser Asp Asn Pro Ile Asp Ser Cys Trp Arg Gly Asp
 20 25 30

Ala Asn Trp Asp Gln Asn Arg Met Lys Leu Ala Asp Cys Ala Val Gly
 35 40 45

Phe Gly Ser Ser Ala Met Gly Gly Lys Gly Gly Ala Phe Tyr Thr Val
 50 55 60

Thr Ser Ser Asp Asp Asp Pro Val Asn Pro Ala Pro Gly Thr Leu Arg
 65 70 75 80

Tyr Gly Ala Thr Arg Glu Arg Ser Leu Trp Ile Ile Phe Ser Lys Asn
 85 90 95

Leu Asn Ile Lys Leu Asn Met Pro Leu Tyr Ile Ala Gly Asn Lys Thr
 100 105 110

Ile Asp Gly Arg Gly Ala Glu Val His Ile Gly Asn Gly Gly Pro Cys
 115 120 125

Leu Phe Met Arg Thr Val Ser His Val Ile Leu His Gly Leu Asn Ile
 130 135 140

His Gly Cys Asn Thr Ser Val Ser Gly Asn Val Leu Ile Ser Glu Ala
 145 150 155 160

Ser Gly Val Val Pro Val His Ala Gln Asp Gly Asp Ala Ile Thr Met
 165 170 175

[0051]

Arg Asn Val Thr Asp Val Trp Ile Asp His Asn Ser Leu Ser Asp Ser
 180 185 190

Ser Asp Gly Leu Val Asp Val Thr Leu Ala Ser Thr Gly Val Thr Ile
 195 200 205

Ser Asn Asn His Phe Phe Asn His His Lys Val Met Leu Leu Gly His
 210 215 220

Ser Asp Ile Tyr Ser Asp Asp Lys Ser Met Lys Val Thr Val Ala Phe
 225 230 235 240

Asn Gln Phe Gly Pro Asn Ala Gly Gln Arg Met Pro Arg Ala Arg Tyr
 245 250 255

Gly Leu Ile His Val Ala Asn Asn Asn Tyr Asp Pro Trp Ser Ile Tyr
 260 265 270

Ala Ile Gly Gly Ser Ser Asn Pro Thr Ile Leu Ser Glu Gly Asn Ser
 275 280 285

Phe Thr Ala Pro Asn Asp Ser Asp Lys Lys Glu Val Thr Arg Arg Val
 290 295 300

Gly Cys Glu Ser Pro Ser Thr Cys Ala Asn Trp Val Trp Arg Ser Thr
 305 310 315 320

Gln Asp Ser Phe Asn Asn Gly Ala Tyr Phe Val Ser Ser Gly Lys Asn
 325 330 335

Glu Gly Thr Asn Ile Tyr Asn Asn Asn Glu Ala Phe Lys Val Glu Asn
 340 345 350

[0052]

Gly Ser Ala Ala Pro Gln Leu Thr Lys Asn Ala Gly Val Leu Thr Cys
 355 360 365

Ile Leu Ser Lys Pro Cys Ser
 370 375

<210> 15

<211> 367

<212> PRT

<213> Juniperus ashei

<400> 15

Met Ala Ser Pro Cys Leu Ile Ala Val Leu Val Phe Leu Cys Ala Ile
 1 5 10 15

Val Ser Cys Tyr Ser Asp Asn Pro Ile Asp Ser Cys Trp Arg Gly Asp
 20 25 30

Ser Asn Trp Asp Gln Asn Arg Met Lys Leu Ala Asp Cys Ala Val Gly
 35 40 45

Phe Gly Ser Ser Thr Met Gly Gly Lys Gly Gly Asp Phe Tyr Thr Val
 50 55 60

Thr Ser Thr Asp Asp Asn Pro Val Asn Pro Thr Pro Gly Thr Leu Arg
 65 70 75 80

Tyr Gly Ala Thr Arg Glu Lys Ala Leu Trp Ile Ile Phe Ser Gln Asn
 85 90 95

Met Asn Ile Lys Leu Lys Met Pro Leu Tyr Val Ala Gly His Lys Thr
 100 105 110

[0053] Ile Asp Gly Arg Gly Ala Asp Val His Leu Gly Asn Gly Gly Pro Cys
 115 120 125

Leu Phe Met Arg Lys Val Ser His Val Ile Leu His Ser Leu His Ile
 130 135 140

His Gly Cys Asn Thr Ser Val Leu Gly Asp Val Leu Val Ser Glu Ser
 145 150 155 160

Ile Gly Val Glu Pro Val His Ala Gln Asp Gly Asp Ala Ile Thr Met
 165 170 175

Arg Asn Val Thr Asn Ala Trp Ile Asp His Asn Ser Leu Ser Asp Cys
 180 185 190

Ser Asp Gly Leu Ile Asp Val Thr Leu Gly Ser Thr Gly Ile Thr Ile
 195 200 205

Ser Asn Asn His Phe Phe Asn His His Lys Val Met Leu Leu Gly His
 210 215 220

Asp Asp Thr Tyr Asp Asp Asp Lys Ser Met Lys Val Thr Val Ala Phe
 225 230 235 240

Asn Gln Phe Gly Pro Asn Ala Gly Gln Arg Met Pro Arg Ala Arg Tyr
 245 250 255

Gly Leu Val His Val Ala Asn Asn Asn Tyr Asp Pro Trp Asn Ile Tyr
 260 265 270

Ala Ile Gly Gly Ser Ser Asn Pro Thr Ile Leu Ser Glu Gly Asn Ser
 275 280 285

Phe Thr Ala Pro Ser Glu Ser Tyr Lys Lys Glu Val Thr Lys Arg Ile
 290 295 300

[0054]

Gly Cys Glu Ser Pro Ser Ala Cys Ala Asn Trp Val Trp Arg Ser Thr
 305 310 315 320

Arg Asp Ala Phe Ile Asn Gly Ala Tyr Phe Val Ser Ser Gly Lys Thr
 325 330 335

Glu Glu Thr Asn Ile Tyr Asn Ser Asn Glu Ala Phe Lys Val Glu Asn
 340 345 350

Gly Asn Ala Ala Pro Gln Leu Thr Lys Asn Ala Gly Val Val Thr
 355 360 365

<210> 16

<211> 367

<212> PRT

<213> Juniperus virginiana

<400> 16

Met Ala Ser Pro Cys Leu Ile Ala Phe Leu Val Phe Leu Cys Ala Ile
1 5 10 15

Val Ser Cys Cys Ser Asp Asn Pro Ile Asp Ser Cys Trp Arg Gly Asp
20 25 30

Ser Asn Trp Gly Gln Asn Arg Met Lys Leu Ala Asp Cys Ala Val Gly
35 40 45

Phe Gly Ser Ser Thr Met Gly Gly Lys Gly Gly Asp Phe Tyr Thr Val
50 55 60

Thr Ser Ala Asp Asp Asn Pro Val Asn Pro Thr Pro Gly Thr Leu Arg
65 70 75 80

[0055] Tyr Gly Ala Thr Arg Glu Lys Thr Leu Trp Ile Ile Phe Ser Gln Asn
85 90 95

Met Asn Ile Lys Leu Lys Met Pro Leu Tyr Val Ala Gly His Lys Thr
100 105 110

Ile Asp Gly Arg Gly Ala Asp Val His Leu Gly Asn Gly Gly Pro Cys
115 120 125

Leu Phe Met Arg Lys Val Ser His Val Ile Leu His Gly Leu His Ile
130 135 140

His Gly Cys Asn Thr Ser Val Leu Gly Asp Val Leu Val Ser Glu Ser
145 150 155 160

Ile Gly Val Val Pro Val His Ala Gln Asp Gly Asp Ala Ile Thr Met
165 170 175

Arg Asn Val Thr Asn Ala Trp Ile Asp His Asn Ser Leu Ser Asp Cys
 180 185 190

Ser Asp Gly Leu Ile Asp Val Thr Leu Gly Ser Thr Gly Ile Thr Ile
 195 200 205

Phe Asn Asn His Phe Phe Asn His His Lys Val Met Leu Leu Gly His
 210 215 220

Asp Asp Thr Tyr Asp Asp Asp Lys Ser Met Lys Val Thr Val Ala Phe
 225 230 235 240

Asn Gln Phe Gly Pro Asn Ala Gly Gln Arg Met Pro Arg Ala Arg Tyr
 245 250 255

[0056]

Gly Leu Val His Val Ala Asn Asn Asn Tyr Asp Pro Trp Asn Ile Tyr
 260 265 270

Ala Ile Gly Gly Ser Ser Asn Pro Thr Ile Leu Ser Glu Gly Asn Ser
 275 280 285

Phe Thr Ala Pro Asn Glu Asn Tyr Lys Tyr Glu Val Thr Lys Arg Ile
 290 295 300

Gly Cys Glu Ser Thr Ser Ala Cys Ala Asn Trp Val Trp Arg Ser Thr
 305 310 315 320

Arg Asp Ala Phe Ser Asn Gly Ala Tyr Phe Val Ser Ser Gly Lys Ile
 325 330 335

Glu Glu Thr Asn Ile Tyr Asn Ser Asn Glu Ala Phe Lys Val Glu Asn
 340 345 350

Gly Asn Ala Ala Pro Gln Leu Thr Lys Asn Ala Gly Val Val Ala
 355 360 365

<210> 17

<211> 367

<212> PRT

<213> Hexalectris arizonica

<400> 17

Met Ala Ser Pro Cys Leu Val Ala Val Leu Val Phe Leu Cys Ala Ile
 1 5 10 15

Val Ser Cys Tyr Ser Asp Asn Pro Ile Asp Ser Cys Trp Arg Gly Asp
 20 25 30

Ser Asn Trp Asp Gln Asn Arg Met Lys Leu Ala Asp Cys Val Val Gly
 35 40 45

[0057]

Phe Gly Ser Leu Thr Met Gly Gly Lys Gly Gly Glu Ile Tyr Thr Val
 50 55 60

Thr Ser Ser Asp Asp Asn Pro Val Asn Pro Thr Pro Gly Thr Leu Arg
 65 70 75 80

Tyr Gly Ala Thr Arg Glu Lys Ala Leu Trp Ile Ile Phe Ser Gln Asn
 85 90 95

Met Asn Ile Lys Leu Gln Met Pro Leu Tyr Val Ala Gly Tyr Lys Thr
 100 105 110

Ile Asp Gly Arg Gly Ala Asp Val His Leu Gly Asn Gly Gly Pro Cys
 115 120 125

	Leu Phe Met Arg Thr Ala Ser His Val Ile Leu His Gly Leu His Ile			
	130	135	140	
	His Gly Cys Asn Thr Ser Val Leu Gly Asp Val Leu Val Ser Glu Ser			
	145	150	155	160
	Ile Gly Val Glu Pro Val His Ala Gln Asp Gly Asp Ala Ile Thr Met			
		165	170	175
	Arg Asn Val Thr Asn Ala Trp Ile Asp His Asn Ser Leu Ser Asp Cys			
		180	185	190
	Ser Asp Gly Leu Ile Asp Val Thr Leu Gly Ser Thr Gly Ile Thr Ile			
	195	200	205	
[0058]	Ser Asn Asn His Phe Phe Asn His His Lys Val Met Leu Leu Gly His			
	210	215	220	
	Asp Asp Thr Tyr Asp Asp Asp Ile Ser Met Lys Val Thr Val Ala Phe			
	225	230	235	240
	Asn Gln Phe Gly Pro Asn Ala Gly Gln Arg Met Pro Arg Ala Arg Tyr			
		245	250	255
	Gly Leu Val His Val Ala Asn Asn Asn Tyr Asp Gln Trp Asn Ile Tyr			
		260	265	270
	Ala Ile Gly Gly Ser Ser Asn Pro Thr Ile Leu Ser Glu Gly Asn Ser			
	275	280	285	
	Pro Thr Ala Pro Ser Glu Ser Tyr Lys Lys Glu Val Thr Lys Arg Ile			
	290	295	300	

Gly Cys Glu Ser Thr Ser Ala Cys Ala Asn Trp Val Trp Arg Phe Thr
 305 310 315 320

Arg Asp Ala Phe Thr Asn Gly Ala Tyr Phe Val Ser Ser Gly Lys Ala
 325 330 335

Glu Glu Thr Asn Ile Tyr Asn Ser Asn Glu Ala Phe Lys Val Glu Asn
 340 345 350

Gly Asn Ala Ala Pro Gln Leu Thr Gln Asn Ala Gly Val Val Thr
 355 360 365

<210> 18

<211> 366

<212> PRT

<213> Juniperus oxycedrus

[0059]

<400> 18

Met Ala Ser Pro Cys Leu Arg Ala Val Leu Val Phe Leu Cys Ala Ile
 1 5 10 15

Val Ser Cys Tyr Ser Asp Asn Pro Ile Asp Ser Cys Trp Arg Gly Asp
 20 25 30

Ser Asn Trp Gly Gln Asn Arg Met Lys Leu Ala Asp Cys Val Val Gly
 35 40 45

Phe Gly Ser Ser Thr Met Gly Gly Lys Gly Gly Glu Phe Tyr Thr Val
 50 55 60

Thr Ser Ala Glu Asp Asn Pro Val Asn Pro Thr Pro Gly Thr Leu Arg
 65 70 75 80

Tyr Gly Ala Thr Arg Glu Lys Ala Leu Trp Ile Ile Phe Ser Gln Asn
 85 90 95

Met Asn Ile Lys Leu Lys Met Pro Leu Tyr Val Ala Gly His Lys Thr
 100 105 110

Ile Asp Gly Arg Gly Ala Asp Val His Leu Gly Asn Gly Gly Pro Cys
 115 120 125

Leu Phe Met Arg Lys Val Ser His Val Ile Leu His Gly Leu His Ile
 130 135 140

Gly Cys Asn Thr Ser Val Leu Gly Asp Val Leu Val Ser Glu Ser Ile
 145 150 155 160

Gly Val Glu Pro Val His Ala Gln Asp Gly Asp Ala Ile Thr Met Arg
 165 170 175

[0060]

Asn Val Thr Asn Ala Trp Ile Asp His Asn Ser Leu Ser Asp Cys Ser
 180 185 190

Asp Gly Leu Ile Asp Val Thr Leu Gly Ser Thr Gly Ile Thr Ile Ser
 195 200 205

Asn Asn His Phe Phe Asn His His Lys Val Met Leu Leu Gly His Asp
 210 215 220

Asp Thr Tyr Asp Asn Asp Lys Ser Met Lys Val Thr Val Ala Phe Asn
 225 230 235 240

Gln Phe Gly Pro Asn Ala Gly Gln Arg Met Pro Arg Ala Arg Tyr Gly
 245 250 255

Leu Val His Val Ala Asn Asn Asn Tyr Asp Pro Trp Asn Ile Tyr Ala
 260 265 270

Ile Gly Gly Ser Ser Asn Pro Thr Ile Leu Ser Glu Gly Asn Ser Phe
 275 280 285

Thr Ala Pro Ser Glu Ser Tyr Lys Lys Glu Val Thr Lys Arg Ile Gly
 290 295 300

Cys Glu Ser Thr Ser Ala Cys Ala Asn Trp Val Trp Arg Ser Thr Arg
 305 310 315 320

Asp Ala Phe Thr Asn Gly Ala Tyr Phe Val Ser Ser Gly Lys Ile Glu
 325 330 335

Glu Thr Asn Ile Tyr Asn Ser Asn Glu Ala Phe Lys Val Glu Asn Gly
 340 345 350

[0061]

Asn Ala Ala Pro Gln Leu Thr Lys Asn Ala Gly Val Val Thr
 355 360 365

<210> 19

<211> 367

<212> PRT

<213> Cupressus sempervirens

<400> 19

Met Asp Ser Pro Cys Leu Ile Ala Val Leu Val Phe Leu Cys Ala Ile
 1 5 10 15

Val Ser Cys Tyr Ser Asp Asn Pro Ile Asp Ser Cys Trp Arg Gly Asp
 20 25 30

Ser Asn Trp Asp Gln Asn Arg Met Lys Leu Ala Asp Cys Ala Val Gly
 35 40 45

	Phe	Gly	Ser	Ser	Thr	Met	Gly	Gly	Lys	Gly	Gly	Asp	Ile	Tyr	Thr	Val		
	50						55						60					
	Thr	Ser	Ala	Glu	Asp	Asn	Pro	Val	Asn	Pro	Thr	Pro	Gly	Thr	Leu	Arg		
	65						70					75				80		
	Tyr	Gly	Ala	Thr	Arg	Glu	Lys	Ala	Leu	Trp	Ile	Ile	Phe	Ser	Gln	Asn		
							85				90					95		
	Met	Asn	Ile	Lys	Leu	Lys	Met	Pro	Leu	Tyr	Val	Ala	Gly	His	Lys	Thr		
							100				105					110		
	Ile	Asp	Gly	Arg	Gly	Ala	Asp	Val	His	Leu	Gly	Asn	Gly	Gly	Pro	Cys		
							115				120				125			
[0062]	Leu	Phe	Met	Arg	Lys	Val	Ser	His	Val	Ile	Leu	His	Gly	Leu	His	Ile		
	130						135							140				
	His	Gly	Cys	Asn	Thr	Ser	Val	Leu	Gly	Asn	Val	Leu	Val	Ser	Glu	Ser		
	145						150							155			160	
	Ile	Gly	Val	Glu	Pro	Val	His	Ala	Gln	Asp	Gly	Asp	Ala	Ile	Thr	Met		
							165							170			175	
	Arg	Asn	Val	Thr	Asn	Ala	Trp	Ile	Asp	His	Asn	Ser	Leu	Ser	Asp	Cys		
							180							185			190	
	Ser	Asp	Gly	Leu	Ile	Asp	Val	Thr	Leu	Ser	Ser	Thr	Gly	Ile	Thr	Ile		
							195				200				205			
	Ser	Asn	Asn	His	Phe	Phe	Asn	His	His	Lys	Val	Met	Leu	Leu	Gly	His		
	210						215							220				

Asp Asp Thr Tyr Asp Asp Asp Lys Ser Met Lys Val Thr Val Ala Phe
 225 230 235 240

Asn Gln Phe Gly Pro Asn Ala Gly Gln Arg Met Pro Arg Ala Arg Tyr
 245 250 255

Gly Leu Val His Val Ala Asn Asn Asn Tyr Asp Gln Trp Asn Ile Tyr
 260 265 270

Ala Ile Gly Gly Ser Ser Asn Pro Thr Ile Leu Ser Glu Gly Asn Ser
 275 280 285

Phe Ala Ala Pro Asn Glu Asn Tyr Lys Lys Glu Val Thr Lys Arg Ile
 290 295 300

[0063]

Gly Cys Val Ser Thr Ser Ala Cys Ala Asn Trp Val Trp Arg Ser Thr
 305 310 315 320

Arg Asp Ala Phe Ser Asn Gly Ala Tyr Phe Val Ser Ser Gly Lys Thr
 325 330 335

Glu Glu Thr Asn Ile Tyr Thr Ser Asn Glu Ala Phe Lys Val Glu Asn
 340 345 350

Gly Asn Leu Ala Pro Gln Leu Thr Lys Asn Ala Gly Val Val Ala
 355 360 365

<210> 20

<211> 514

<212> PRT

<213> Chamaecyparis obtusa

<400> 20

Met Gly Met Lys Phe Met Ala Ala Val Ala Phe Leu Ala Leu Gln Leu
 1 5 10 15

Ile Val Met Ala Ala Ala Glu Asp Gln Ser Ala Gln Ile Met Leu Asp
 20 25 30

Ser Asp Ile Glu Glu Tyr Leu Arg Ser Asn Arg Ser Leu Lys Lys Leu
 35 40 45

Val His Ser Arg His Asp Ala Ala Thr Val Phe Asn Val Glu Gln Tyr
 50 55 60

Gly Ala Val Gly Asp Gly Lys His Asp Ser Thr Glu Ala Phe Ala Thr
 65 70 75 80

Thr Trp Asn Ala Ala Cys Lys Lys Ala Ser Ala Val Leu Leu Val Pro
 85 90 95

[0064] Ala Asn Lys Lys Phe Phe Val Asn Asn Leu Val Phe Arg Gly Pro Cys
 100 105 110

Gln Pro His Leu Ser Phe Lys Val Asp Gly Thr Ile Val Ala Gln Pro
 115 120 125

Asp Pro Ala Arg Trp Lys Asn Ser Lys Ile Trp Leu Gln Phe Ala Gln
 130 135 140

Leu Thr Asp Phe Asn Leu Met Gly Thr Phe Val Ile Asp Gly Gln Gly
 145 150 155 160

Gln Gln Trp Trp Ala Gly Gln Cys Lys Val Val Asn Gly Arg Thr Val
 165 170 175

Cys Asn Asp Arg Asn Arg Pro Thr Ala Ile Lys Ile Asp Tyr Ser Lys
 180 185 190

	Ser Val Thr Val Lys Glu Leu Thr Leu Met Asn Ser Pro Glu Phe His		
	195	200	205
	Leu Val Phe Gly Glu Cys Glu Gly Val Lys Ile Gln Gly Leu Lys Ile		
	210	215	220
	Lys Ala Pro Arg Asp Ser Pro Asn Thr Asp Gly Ile Asp Ile Phe Ala		
	225	230	235 240
	Ser Lys Arg Phe His Ile Glu Lys Cys Val Ile Gly Thr Gly Asp Asp		
		245	250 255
	Cys Ile Ala Ile Gly Thr Gly Ser Ser Asn Ile Thr Ile Lys Asp Leu		
		260	265 270
[0065]	Ile Cys Gly Pro Gly His Gly Ile Ser Ile Gly Ser Leu Gly Arg Asp		
	275	280	285
	Asn Ser Arg Ala Glu Val Ser His Val His Val Asn Arg Ala Lys Phe		
	290	295	300
	Ile Asp Thr Gln Asn Gly Leu Arg Ile Lys Thr Trp Gln Gly Gly Ser		
	305	310	315 320
	Gly Leu Ala Ser Tyr Ile Thr Tyr Glu Asn Val Glu Met Ile Asn Ser		
		325	330 335
	Glu Asn Pro Ile Leu Ile Asn Gln Phe Tyr Cys Thr Ser Ala Ser Ala		
		340	345 350
	Cys Gln Asn Gln Arg Ser Ala Val Gln Ile Gln Gly Val Thr Tyr Lys		
	355	360	365

Asn Ile His Gly Thr Ser Ala Thr Ala Ala Ala Ile Gln Leu Met Cys
 370 375 380

Ser Asp Ser Val Pro Cys Thr Gly Ile Gln Leu Ser Asn Val Ser Leu
 385 390 395 400

Lys Leu Thr Ser Gly Lys Pro Ala Ser Cys Val Asp Lys Asn Ala Arg
 405 410 415

Gly Phe Tyr Ser Gly Arg Leu Ile Pro Thr Cys Lys Asn Leu Arg Pro
 420 425 430

Gly Pro Ser Pro Lys Glu Phe Glu Leu Gln Gln Gln Pro Thr Thr Val
 435 440 445

[0066]

Met Asp Glu Asn Lys Gly Ala Cys Ala Lys Gly Asp Ser Thr Cys Ile
 450 455 460

Ser Leu Ser Ser Ser Pro Pro Asn Cys Lys Asn Lys Cys Lys Gly Cys
 465 470 475 480

Gln Pro Cys Lys Pro Lys Leu Ile Ile Val His Pro Asn Lys Pro Gln
 485 490 495

Asp Tyr Tyr Pro Gln Lys Trp Val Cys Ser Cys His Asn Lys Ile Tyr
 500 505 510

Asn Pro

<210> 21

<211> 507

<212> PRT
 <213> Juniperus ashei

 <400> 21
 Met Ser Met Lys Phe Met Ala Ala Leu Ala Phe Leu Ala Leu Gln Leu
 1 5 10 15

 Ile Val Met Ala Ala Gly Glu Asp Gln Ser Ala Gln Ile Met Leu Asp
 20 25 30

 Ser Asp Thr Lys Gln Tyr His Arg Ser Ser Arg Asn Leu Arg Lys Ala
 35 40 45

 Val His His Ala Arg His Asp Val Ala Ile Val Phe Asn Val Glu His
 50 55 60

 [0067] Tyr Gly Ala Val Gly Asp Gly Lys His Asp Ser Thr Asp Ala Phe Glu
 65 70 75 80

 Lys Thr Trp Asn Ala Ala Cys Asn Lys Leu Ser Ala Val Phe Leu Val
 85 90 95

 Pro Ala Asn Lys Lys Phe Val Val Asn Asn Leu Val Phe Tyr Gly Pro
 100 105 110

 Cys Gln Pro His Phe Ser Phe Lys Val Asp Gly Thr Ile Ala Ala Tyr
 115 120 125

 Pro Asp Pro Ala Lys Trp Leu Asn Ser Lys Ile Trp Met His Phe Ala
 130 135 140

 Arg Leu Thr Asp Phe Asn Leu Met Gly Thr Gly Val Ile Asp Gly Gln
 145 150 155 160

Gly Asn Arg Trp Trp Ser Asp Gln Cys Lys Thr Ile Asn Gly Arg Thr
 165 170 175

Val Cys Asn Asp Lys Gly Arg Pro Thr Ala Ile Lys Ile Asp Phe Ser
 180 185 190

Lys Ser Val Thr Val Lys Glu Leu Thr Leu Thr Asn Ser Pro Glu Phe
 195 200 205

His Leu Val Phe Gly Glu Cys Asp Gly Val Lys Ile Gln Gly Ile Lys
 210 215 220

Ile Lys Ala Pro Arg Asp Ser Pro Asn Thr Asp Gly Ile Asp Ile Phe
 225 230 235 240

[0068]

Ala Ser Lys Arg Phe Glu Ile Glu Lys Cys Thr Ile Gly Thr Gly Asp
 245 250 255

Asp Cys Val Ala Val Gly Thr Gly Ser Ser Asn Ile Thr Ile Lys Asp
 260 265 270

Leu Thr Cys Gly Pro Gly His Gly Met Ser Ile Gly Ser Leu Gly Lys
 275 280 285

Gly Asn Ser Arg Ser Glu Val Ser Phe Val His Leu Asp Gly Ala Lys
 290 295 300

Phe Ile Asp Thr Gln Asn Gly Leu Arg Ile Lys Thr Trp Gln Gly Gly
 305 310 315 320

Ser Gly Leu Ala Ser His Ile Thr Tyr Glu Asn Val Glu Met Ile Asn
 325 330 335

Ala Glu Asn Pro Ile Leu Ile Asn Gln Phe Tyr Cys Thr Ser Ala Ala
 340 345 350

Ala Cys Lys Asn Gln Arg Ser Ala Val Lys Ile Gln Asp Val Thr Phe
 355 360 365

Lys Asn Ile His Gly Thr Ser Ala Thr Thr Ala Ala Ile Gln Leu Met
 370 375 380

Cys Ser Asp Ser Val Pro Cys Ser Asn Ile Lys Leu Ser Asn Val Phe
 385 390 395 400

Leu Lys Leu Thr Ser Gly Lys Val Ala Thr Cys Val Asn Lys Asn Ala
 405 410 415

[0069]

Asn Gly Tyr Tyr Thr Asn Pro Leu Asn Pro Ser Cys Lys Ser Leu His
 420 425 430

Pro Gly Arg Thr Pro Lys Glu Leu Glu Leu His Gln Lys Pro Thr Thr
 435 440 445

Leu Leu Met Asp Glu Lys Met Gly Ala Ser Leu Asn Ser Ser Pro Pro
 450 455 460

Asn Cys Lys Asn Lys Cys Lys Gly Cys Gln Pro Cys Lys Pro Lys Leu
 465 470 475 480

Ile Ile Val His Pro Asn Gln Pro Glu Asp Tyr Tyr Pro Gln Arg Trp
 485 490 495

Val Cys Ser Cys His Asn Lys Ile Tyr Asn Pro
 500 505

<210> 22
 <211> 384
 <212> PRT
 <213> Hexalectris arizonica.

<400> 22
 His Asp Val Ala Ile Val Phe Asn Val Glu His His Gly Ala Val Gly
 1 5 10 15

Asp Gly Asn His Asp Ser Thr Asp Ala Phe Glu Lys Thr Trp Asn Glu
 20 25 30

Ala Cys Lys Thr Leu Ser Ala Val Phe Leu Val Pro Ala Asn Lys Lys
 35 40 45

Phe Val Val Val Asn Asn Leu Val Phe Tyr Gly Pro Cys Gln Pro His
 50 55 60

[0070]
 Phe Ser Pro Lys Val Asp Gly Ile Ile Ala Ala Tyr Pro Asp Pro Val
 65 70 75 80

Lys Trp Lys Asn Ser Lys Ile Trp Met His Phe Ala Arg Leu Thr Asp
 85 90 95

Phe Asn Leu Met Gly Thr Gly Val Ile Asp Gly Gln Gly Ser Lys Trp
 100 105 110

Trp Ser Asp Gln Cys Lys Thr Val Asn Gly Arg Thr Val Cys Asn Asp
 115 120 125

Lys Gly Arg Pro Thr Ala Ile Lys Ile Asp Phe Ser Lys Ser Val Thr
 130 135 140

Val Lys Glu Leu Thr Leu Met Asn Ser Pro Glu Phe His Leu Val Phe
 145 150 155 160

Gly Glu Cys Asp Gly Val Lys Ile Gln Gly Ile Lys Ile Lys Ala Pro
 165 170 175

Lys Glu Ser Pro Asn Thr Asp Gly Ile Asp Ile Phe Gly Ser Lys Arg
 180 185 190

Phe Glu Ile Glu Lys Cys Ile Ile Gly Thr Gly Asp Asp Cys Val Ala
 195 200 205

Ile Gly Thr Gly Ser Ser Asn Ile Thr Ile Thr Asp Leu Thr Cys Gly
 210 215 220

Pro Gly His Gly Met Ser Ile Gly Ser Leu Gly Lys Gly Asn Ser Arg
 225 230 235 240

[0071] Ser Glu Val Ser Phe Val His Leu Asp Gly Ala Lys Phe Ile Asp Thr
 245 250 255

Gln Asn Gly Leu Arg Ile Lys Thr Trp Gln Gly Gly Ser Gly Leu Ala
 260 265 270

Ser His Ile Thr Tyr Glu Asn Val Glu Met Val Asn Ala Glu Asn Pro
 275 280 285

Ile Leu Ile Asn Gln Phe Tyr Cys Thr Ser Ala Ala Cys Glu Asn Gln
 290 295 300

Arg Ser Ala Val Lys Ile Glu Asp Val Trp Phe Lys Asn Ile His Gly
 305 310 315 320

Thr Ser Ala Thr Ala Ala Ala Ile Gln Leu Met Cys Ser Asp Ser Val
 325 330 335

Pro Cys Ser Asn Ile Lys Leu Ser Asn Val Val Leu Lys Leu Ser Ser
 340 345 350

Gly Lys Val Ala Ala Cys Val Asn Lys Asn Ala Asn Gly Tyr Tyr Thr
 355 360 365

Asn Pro Leu Asn Pro Pro Cys Lys Ser Leu His Pro Gly Pro Thr Pro
 370 375 380

<210> 23

<211> 225

<212> PRT

<213> Juniperus ashei

<400> 23

Met Ala Arg Val Ser Glu Leu Ala Phe Leu Leu Ala Ala Thr Leu Ala
 I 5 10 15

[0072]

Ile Ser Leu His Met Gln Glu Ala Gly Val Val Lys Phe Asp Ile Lys
 20 25 30

Asn Gln Cys Gly Tyr Thr Val Trp Ala Ala Gly Leu Pro Gly Gly Gly
 35 40 45

Lys Arg Leu Asp Gln Gly Gln Thr Trp Thr Val Asn Leu Ala Ala Gly
 50 55 60

Thr Ala Ser Ala Arg Phe Trp Gly Arg Thr Gly Cys Thr Phe Asp Ala
 65 70 75 80

Ser Gly Lys Gly Ser Cys Gln Thr Gly Asp Cys Gly Gly Gln Leu Ser
 85 90 95

Cys Thr Val Ser Gly Ala Val Pro Ala Thr Leu Ala Glu Tyr Thr Gln
 100 105 110

Ser Asp Gln Asp Tyr Tyr Asp Val Ser Leu Val Asp Gly Phe Asn Ile
 115 120 125

Pro Leu Ala Ile Asn Pro Thr Asn Ala Gln Cys Thr Ala Pro Ala Cys
 130 135 140

Lys Ala Asp Ile Asn Ala Val Cys Pro Ser Glu Leu Lys Val Asp Gly
 145 150 155 160

Gly Cys Asn Ser Ala Cys Asn Val Phe Lys Thr Asp Gln Tyr Cys Cys
 165 170 175

Arg Asn Ala Tyr Val Asp Asn Cys Pro Ala Thr Asn Tyr Ser Lys Ile
 180 185 190

[0073]

Phe Lys Asn Gln Cys Pro Gln Ala Tyr Ser Tyr Ala Lys Asp Asp Thr
 195 200 205

Ala Thr Phe Ala Cys Ala Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Ile Val Phe Cys
 210 215 220

Pro
 225

<210> 24

<211> 225

<212> PRT

<213> *Juniperus rigida*

<400> 24

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

Ile Ser Leu His Met Gln Glu Ala Gly Ala Val Lys Phe Asp Ile Lys
20 25 30

Asn Gln Cys Gly Tyr Thr Val Trp Ala Ala Gly Leu Pro Gly Gly Gly
35 40 45

Lys Arg Leu Asp Gln Gly Gln Thr Trp Thr Leu Asn Leu Ala Ala Gly
50 55 60

Thr Ala Ser Ala Arg Phe Trp Gly Arg Thr Gly Cys Thr Phe Asp Ala
65 70 75 80

Ser Gly Lys Gly Ser Cys Lys Thr Gly Asp Cys Gly Gly Gln Leu Ser
85 90 95

[0074] Cys Thr Val Ser Gly Ala Val Pro Ala Thr Leu Ala Glu Tyr Thr Gln
100 105 110

Ser Asp Gln Asp Tyr Tyr Asp Val Ser Leu Val Asp Gly Phe Asn Ile
115 120 125

Pro Leu Ala Ile Asn Pro Thr Asn Ala Gln Cys Thr Ala Pro Ala Cys
130 135 140

Lys Ala Asp Ile Asn Ala Val Cys Pro Ser Glu Leu Lys Val Glu Gly
145 150 155 160

Gly Cys Asn Ser Ala Cys Asn Val Phe Gln Thr Asp Gln Tyr Cys Cys
165 170 175

Arg Asn Ala Tyr Val Asp Asn Cys Pro Ala Thr Asn Tyr Ser Lys Ile
180 185 190

Phe Lys Asn Gln Cys Pro Gln Ala Tyr Ser Tyr Ala Lys Asp Asp Thr
 195 200 205

Ala Thr Phe Ala Cys Ala Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Ile Val Phe Cys
 210 215 220

Pro
 225

<210> 25

<211> 224

<212> PRT

<213> Cupressus sempervirens

<400> 25

[0075] Met Ala Arg Val Ser Glu Leu Ala Leu Leu Leu Val Ala Thr Leu Ala
 1 5 10 15

Ile Ser Leu His Met Gln Glu Ala Gly Ala Val Lys Phe Asp Ile Lys
 20 25 30

Asn Gln Cys Gly Tyr Thr Val Trp Ala Ala Gly Leu Pro Gly Gly Gly
 35 40 45

Lys Arg Leu Asp Gln Gly Gln Thr Trp Thr Val Asn Leu Ala Ala Gly
 50 55 60

Thr Ala Ser Ala Arg Phe Trp Gly Arg Thr Gly Cys Thr Phe Asp Ala
 65 70 75 80

Ser Gly Lys Gly Ser Cys Arg Ser Gly Asp Cys Gly Gly Gln Leu Ser
 85 90 95

Cys Thr Val Ser Gly Ala Val Pro Ala Thr Leu Ala Glu Tyr Thr Gln
 100 105 110

Ser Asp Lys Asp Tyr Tyr Asp Val Ser Leu Val Asp Gly Phe Asn Ile
 115 120 125

Pro Leu Ala Ile Asn Pro Thr Asn Thr Lys Cys Thr Ala Pro Ala Cys
 130 135 140

Lys Ala Asp Ile Asn Ala Val Cys Pro Ser Glu Leu Lys Val Asp Gly
 145 150 155 160

Gly Cys Asn Ser Ala Cys Asn Val Leu Gln Thr Asp Gln Tyr Cys Cys
 165 170 175

Arg Asn Ala Tyr Val Asp Asn Cys Pro Ala Thr Asn Tyr Ser Lys Ile
 180 185 190

[0076]

Phe Lys Asn Gln Cys Pro Gln Ala Tyr Ser Tyr Ala Lys Asp Asp Thr
 195 200 205

Ala Thr Phe Ala Cys Ala Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Ile Val Phe Cys
 210 215 220

<210> 26

<211> 199

<212> PRT

<213> *Hexalectris arizonica*

<400> 26

Val Lys Phe Asp Ile Lys Asn Gln Cys Gly Tyr Thr Val Trp Ala Ala
 1 5 10 15

Gly Leu Pro Gly Gly Gly Lys Glu Phe Asp Gln Gly Gln Thr Trp Thr
 20 25 30

Val Asn Leu Ala Ala Gly Thr Ala Ser Ala Arg Phe Trp Gly Arg Thr
 35 40 45

Gly Cys Thr Phe Asp Ala Ser Gly Lys Gly Ser Cys Arg Ser Gly Asp
 50 55 60

Cys Gly Gly Gln Leu Ser Cys Thr Val Ser Gly Ala Val Pro Ala Thr
 65 70 75 80

Leu Ala Glu Tyr Thr Gln Ser Asp Gln Asp Tyr Tyr Asp Val Ser Leu
 85 90 95

Val Asp Gly Phe Asn Ile Pro Leu Ala Ile Asn Pro Thr Asn Thr Lys
 100 105 110

[0077]

Cys Thr Ala Pro Ala Cys Lys Ala Asp Ile Asn Ala Val Cys Pro Ser
 115 120 125

Glu Leu Lys Val Asp Gly Gly Cys Asn Ser Ala Cys Asn Val Leu Gln
 130 135 140

Thr Asp Gln Tyr Cys Cys Arg Asn Ala Tyr Val Asn Asn Cys Pro Ala
 145 150 155 160

Thr Asn Tyr Ser Lys Ile Phe Lys Asn Gln Cys Pro Gln Ala Tyr Ser
 165 170 175

Tyr Ala Lys Asp Asp Thr Ala Thr Phe Ala Cys Ala Ser Gly Thr Asp
 180 185 190

Tyr Ser Ile Val Phe Cys Pro
 195

<210> 27

<211> 274

<212> PRT

<213> Pinus monticola

<400> 27

Met Gly Asn Ser Ser Gly Asn Ser Leu Met Val Leu Leu Leu Val Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Val Gly Val Thr Val Asn Ala Gln Asn Cys Gly Cys Ala Ser
 20 25 30

Gly Leu Cys Cys Ser Gln Tyr Gly Tyr Cys Gly Ser Ser Ser Ala Tyr
 35 40 45

Cys Gly Ala Gly Cys Lys Ser Gly Pro Cys Ser Gly Gly Gly Ser Pro
 50 55 60

[0078]

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Val Gly Thr Ile Ile Ser Gln Ser Phe Phe
 65 70 75 80

Asn Gly Leu Ala Gly Gly Ala Ala Ser Ser Cys Glu Gly Lys Gly Phe
 85 90 95

Tyr Thr Tyr Asn Ala Phe Ile Ala Ala Ala Asn Ala Tyr Ser Gly Phe
 100 105 110

Gly Thr Thr Gly Ser Ala Asp Val Thr Lys Arg Glu Leu Ala Ala Phe
 115 120 125

Leu Ala Asn Val Met His Gly Thr Gly Gly Met Cys Tyr Ile Asn Glu
 130 135 140

Arg Thr Pro Pro Met Ile Tyr Cys Met Ser Ser Ala Thr Trp Pro Cys
 145 150 155 160

Ala Ser Gly Lys Ser Tyr His Gly Arg Gly Pro Leu Gln Leu Ser Trp
 165 170 175

Asn Tyr Asn Tyr Gly Ala Ala Gly Gln Ser Ile Gly Phe Asp Gly Val
 180 185 190

Asn Asn Pro Glu Lys Val Gly Gln Asp Ser Thr Ile Ser Phe Lys Thr
 195 200 205

Ala Val Trp Phe Trp Met Lys Asn Ser Asn Cys His Ser Ala Ile Thr
 210 215 220

[0079]

Ser Gly Gln Gly Phe Gly Gly Thr Ile Lys Ala Ile Asn Ser Gln Glu
 225 230 235 240

Cys Asn Gly Gly Asn Ser Gly Glu Val Asn Ser Arg Val Asn Tyr Tyr
 245 250 255

Lys Asn Ile Cys Ser Gln Leu Gly Val Asp Pro Gly Ala Asn Leu Ser
 260 265 270

Cys His

<210> 28

<211> 277

<212> PRT

<213> Pseudotsuga menziesii

<400> 28

Met Gly Lys Thr Gly Gly Glu Lys Trp Val Met Ala Leu Val Leu Val
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Gly Val Ser Val Asn Ala Gln Asn Cys Gly Cys Ala
 20 25 30

Ser Gly Leu Cys Cys Ser Lys Tyr Gly Tyr Cys Gly Thr Thr Ser Ala
 35 40 45

Tyr Cys Gly Thr Gly Cys Arg Ser Gly Pro Cys Ser Ser Asn Ser Gly
 50 55 60

Gly Gly Ser Pro Ser Gly Gly Gly Gly Ser Val Gly Thr Ile Ile Ser
 65 70 75 80

Gln Ser Ile Phe Asn Gly Leu Ala Gly Gly Ala Ala Ser Ser Cys Glu
 85 90 95

[0080]

Gly Lys Gly Phe Tyr Thr Tyr Thr Ala Phe Ile Lys Ala Ala Ser Ala
 100 105 110

Tyr Ser Gly Phe Gly Thr Thr Gly Ser Asn Asp Val Lys Lys Arg Glu
 115 120 125

Leu Ala Ala Phe Phe Ala Asn Val Met His Glu Thr Gly Gly Leu Cys
 130 135 140

Tyr Ile Asn Glu Arg Asn Pro Pro Met Ile Tyr Cys Asn Ser Ser Ser
 145 150 155 160

Thr Trp Pro Cys Ala Ser Gly Lys Ser Tyr His Gly Arg Gly Pro Leu
 165 170 175

Gln Leu Ser Trp Asn Tyr Asn Tyr Gly Ala Ala Gly Lys Ser Ile Gly
 180 185 190

Phe Asp Gly Leu Asn Asn Pro Glu Lys Val Gly Gln Asp Ala Thr Ile
 195 200 205

Ser Phe Lys Thr Ala Val Trp Phe Trp Met Asn Asn Ser Asn Cys His
 210 215 220

Ser Ala Ile Thr Gly Gly Gln Gly Phe Gly Ala Thr Ile Lys Ala Ile
 225 230 235 240

Asn Ser Gly Glu Cys Asn Gly Gly Asn Ser Gly Glu Val Ser Ser Arg
 245 250 255

Val Asn Tyr Tyr Arg Lys Ile Cys Ser Gln Leu Gly Val Asp Pro Gly
 260 265 270

[0081]

Ala Asn Val Ser Cys
 275

<210> 29

<211> 308

<212> PRT

<213> Pinus taeda

<400> 29

Met Gly Ser Arg Ser Arg Ile Leu Leu Ile Gly Ala Thr Gly Tyr Ile
 1 5 10 15

Gly Arg His Val Ala Lys Ala Ser Leu Asp Leu Gly His Pro Thr Phe
 20 25 30

Leu Leu Val Arg Glu Ser Thr Ala Ser Ser Asn Ser Glu Lys Ala Gln
 35 40 45

Leu Leu Glu Ser Phe Lys Ala Ser Gly Ala Asn Ile Val His Gly Ser
50 55 60

Ile Asp Asp His Ala Ser Leu Val Glu Ala Val Lys Asn Val Asp Val
65 70 75 80

Val Ile Ser Thr Val Gly Ser Leu Gln Ile Glu Ser Gln Val Asn Ile
85 90 95

Ile Lys Ala Ile Lys Glu Val Gly Thr Val Lys Arg Phe Phe Pro Ser
100 105 110

Glu Phe Gly Asn Asp Val Asp Asn Val His Ala Val Glu Pro Ala Lys
115 120 125

[0082]

Ser Val Phe Glu Val Lys Ala Lys Val Arg Arg Ala Ile Glu Ala Glu
130 135 140

Gly Ile Pro Tyr Thr Tyr Val Ser Ser Asn Cys Phe Ala Gly Tyr Phe
145 150 155 160

Leu Arg Ser Leu Ala Gln Ala Gly Leu Thr Ala Pro Pro Arg Asp Lys
165 170 175

Val Val Ile Leu Gly Asp Gly Asn Ala Arg Val Val Phe Val Lys Glu
180 185 190

Glu Asp Ile Gly Thr Phe Thr Ile Lys Ala Val Asp Asp Pro Arg Thr
195 200 205

Leu Asn Lys Thr Leu Tyr Leu Arg Leu Pro Ala Asn Thr Leu Ser Leu
210 215 220

Asn Glu Leu Val Ala Leu Trp Glu Lys Lys Ile Asp Lys Thr Leu Glu
 225 230 235 240

Lys Ala Tyr Val Pro Glu Glu Glu Val Leu Lys Leu Ile Ala Asp Thr
 245 250 255

Pro Phe Pro Ala Asn Ile Ser Ile Ala Ile Ser His Ser Ile Phe Val
 260 265 270

Lys Gly Asp Gln Thr Asn Phe Glu Ile Gly Pro Ala Gly Val Glu Ala
 275 280 285

Ser Gln Leu Tyr Pro Asp Val Lys Tyr Thr Thr Val Asp Glu Tyr Leu
 290 295 300

Ser Asn Phe Val
 305

[0083]

<210> 30

<211> 173

<212> PRT

<213> Picea abies

<400> 30

Met Asp Ser Arg Arg Leu Lys Arg Ser Gly Ile Val Cys Met Val Leu
 1 5 10 15

Met Ser Met Leu Met Leu Val Val Cys Glu Asp Ser Asp Asn Thr Ala
 20 25 30

Cys Leu Ser Ser Leu Ser Ser Cys Ala Pro Tyr Leu Asn Ala Thr Thr
 35 40 45

Lys Pro Asp Ser Ser Cys Cys Ser Ala Leu Ile Ser Val Ile Asp Lys
 50 55 60

Asp Ser Gln Cys Leu Cys Asn Leu Leu Asn Ser Asp Thr Val Lys Gln
65 70 75 80

Leu Gly Val Asn Val Thr Gln Ala Met Lys Met Pro Ala Glu Cys Gly
85 90 95

Lys Asn Val Ser Ala Thr Gln Cys Asn Lys Thr Ala Thr Ser Gly Gly
100 105 110

[0084] Ser Ser Val Gly Lys Thr Pro Thr Ser Thr Pro Pro Pro Ser Ser Ala
115 120 125

Thr Pro Ser Thr Thr Thr Ile Thr Lys Ser Asn Ser Asn Ala Ala Ala
130 135 140

Ser Val Ser Val Lys Met Phe Pro Val Ala Ala Leu Val Phe Val Ala
145 150 155 160

Val Ala Ser Val Leu Gly Leu Lys Gly Pro Cys Leu Arg
165 170

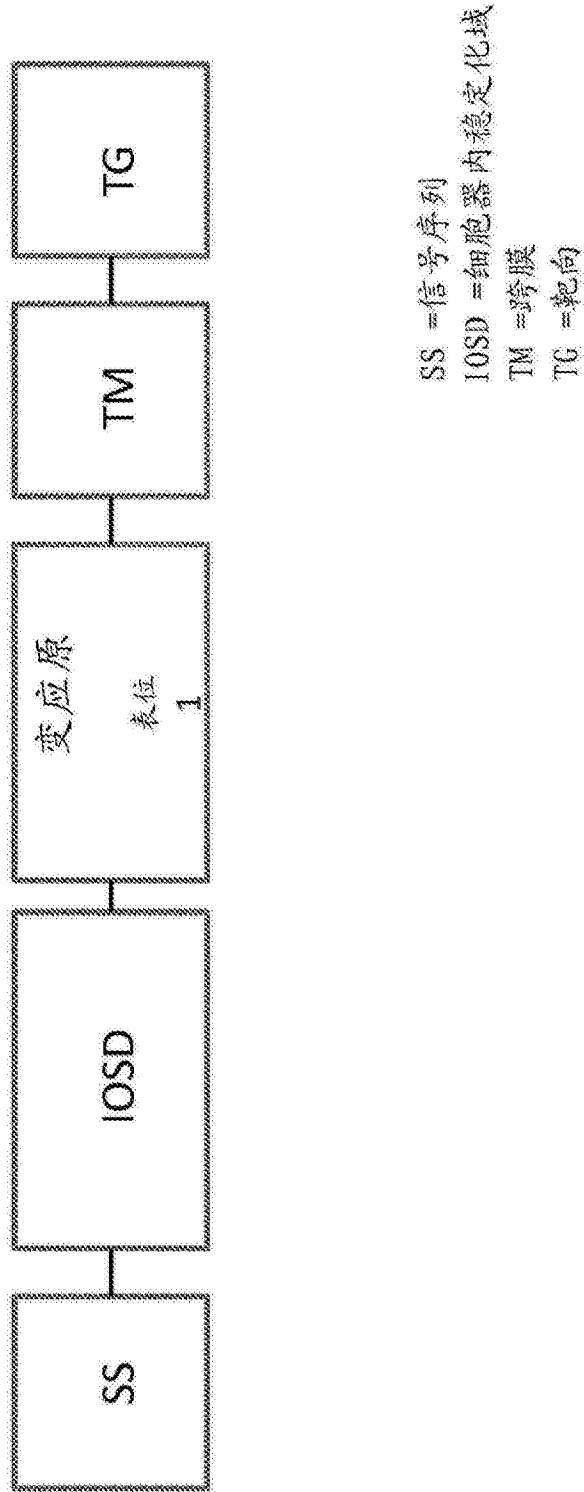


图1

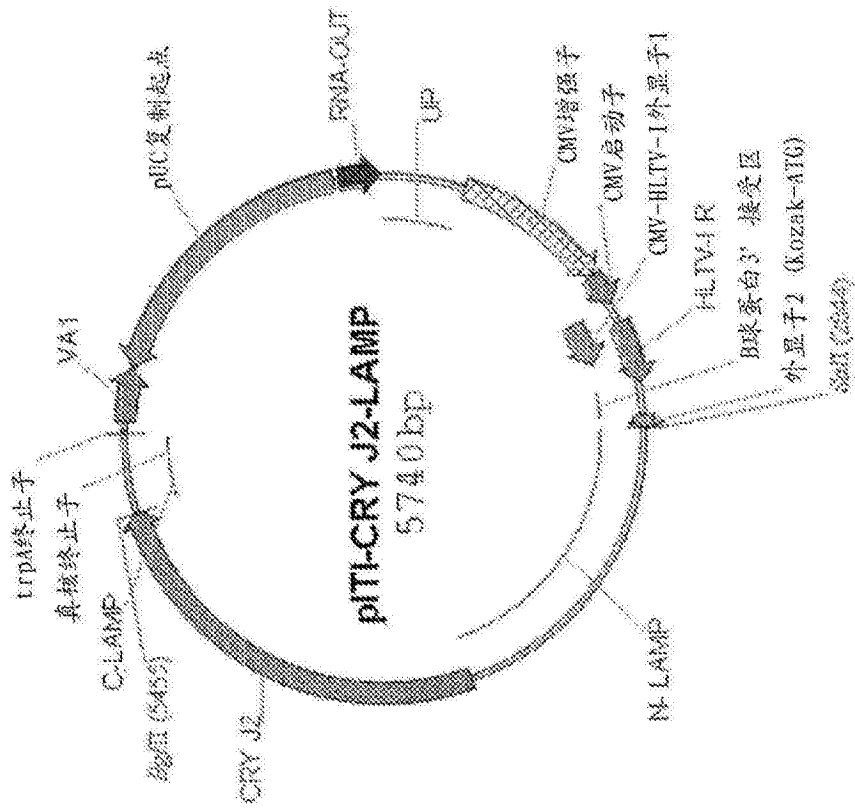


图2

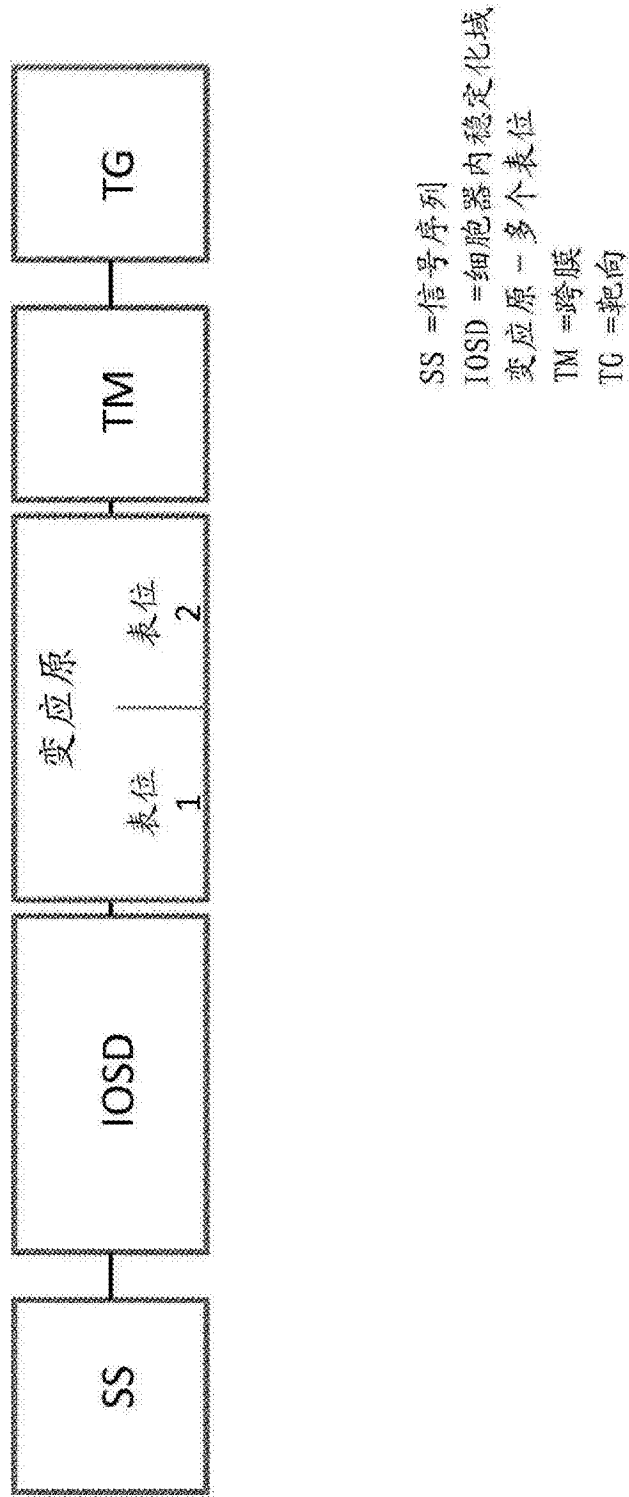


图3

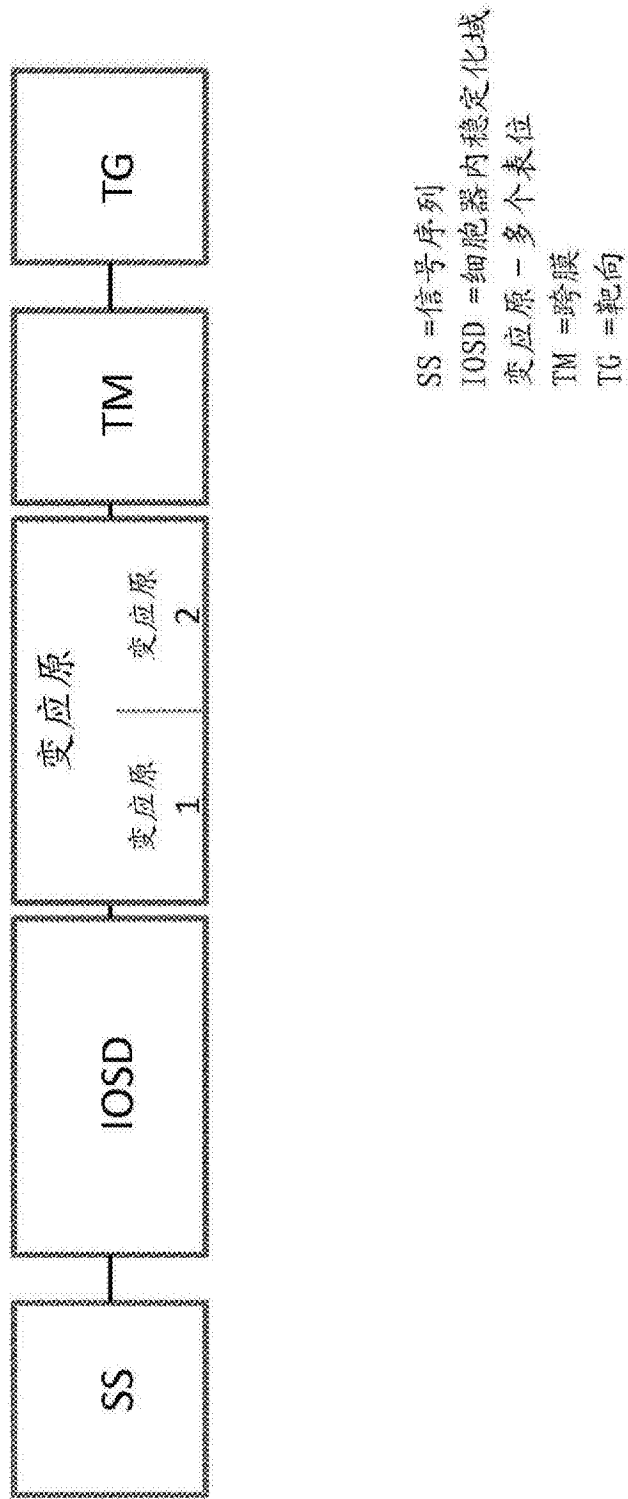


图4

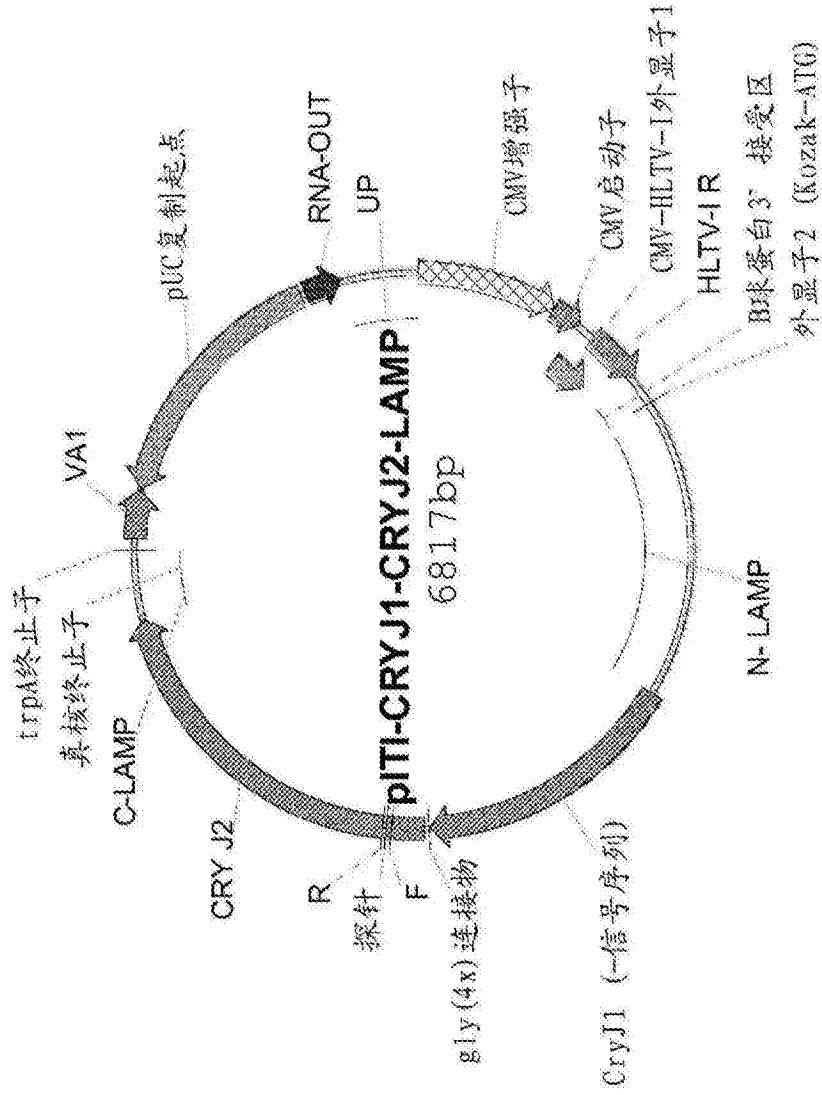


图5

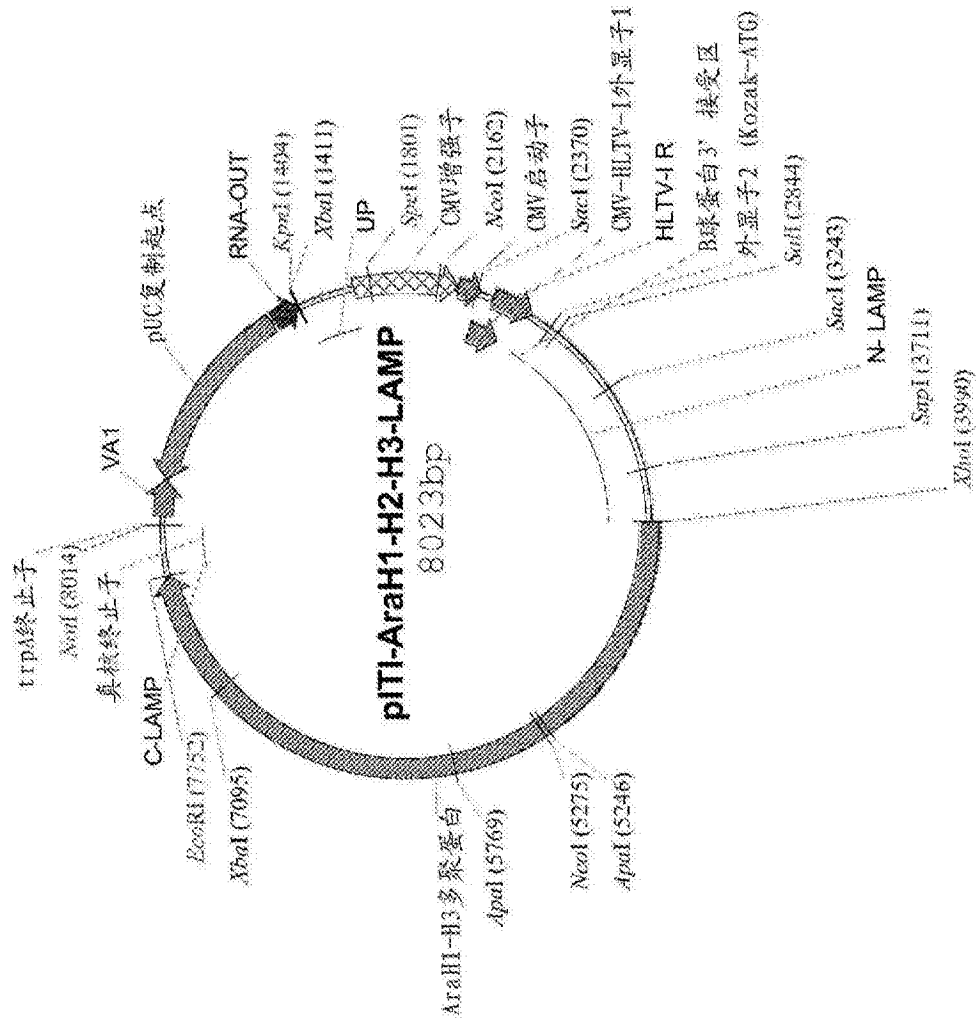


图6A

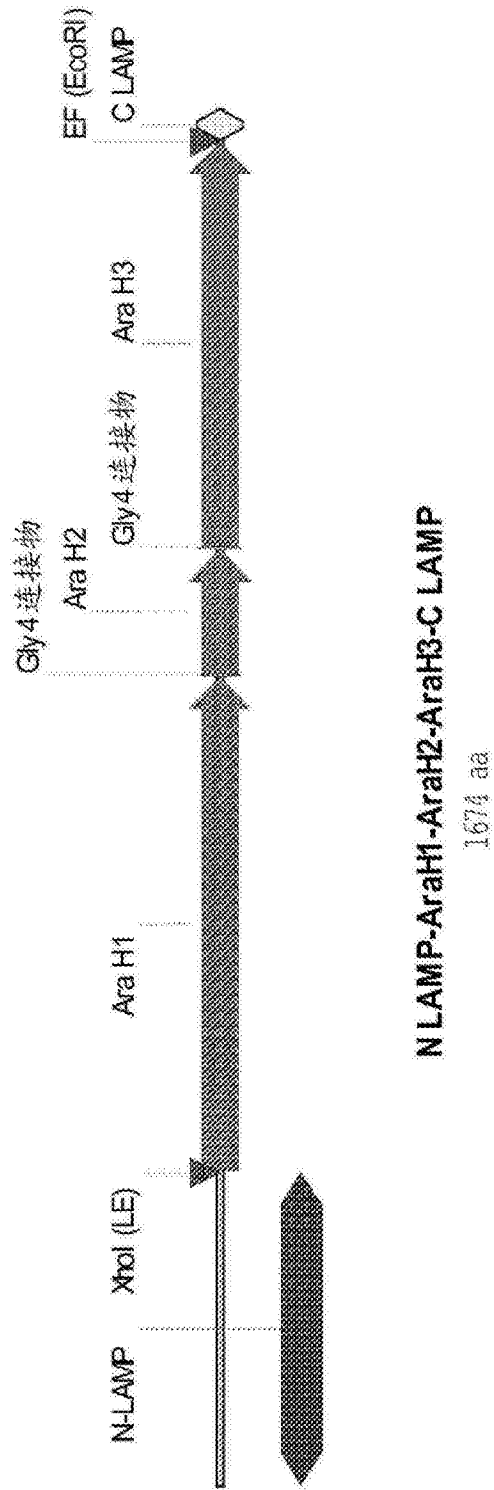


图6B

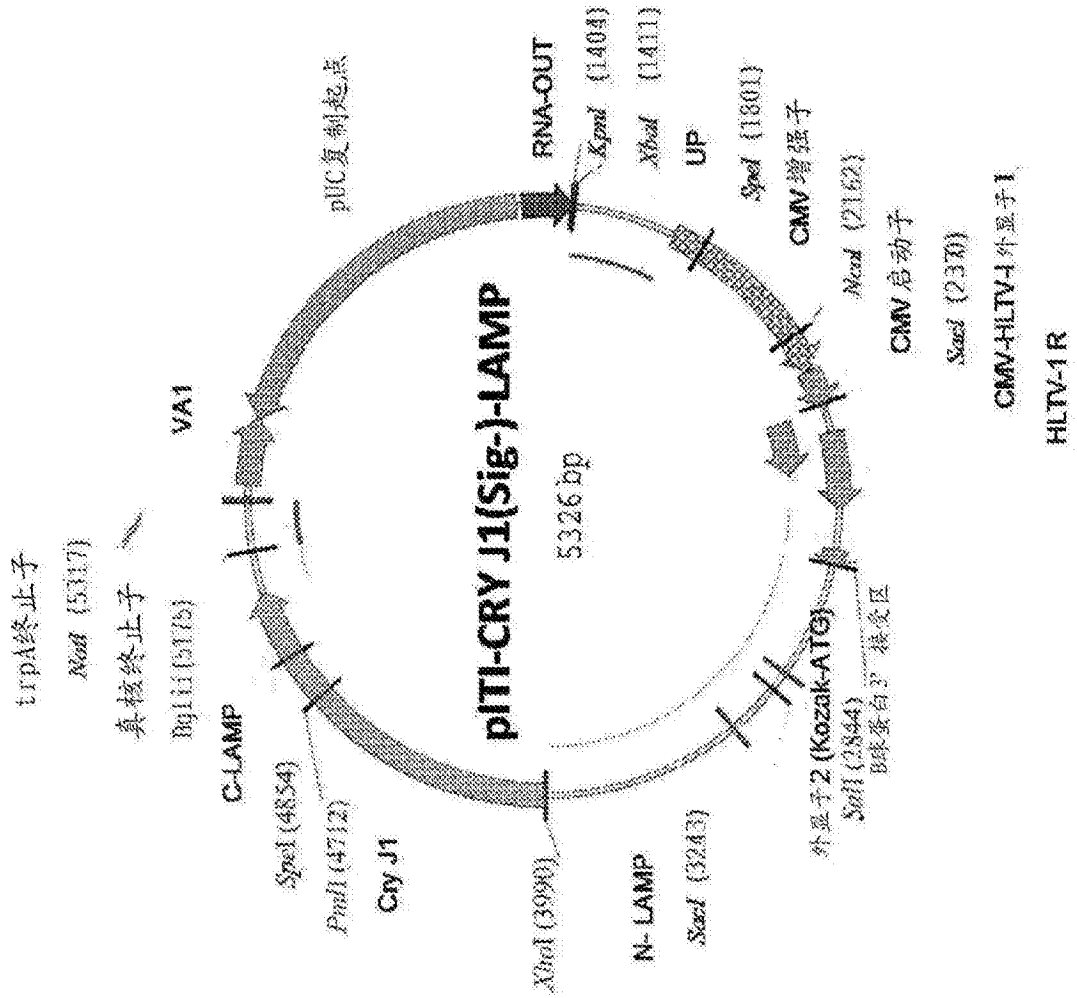


图7

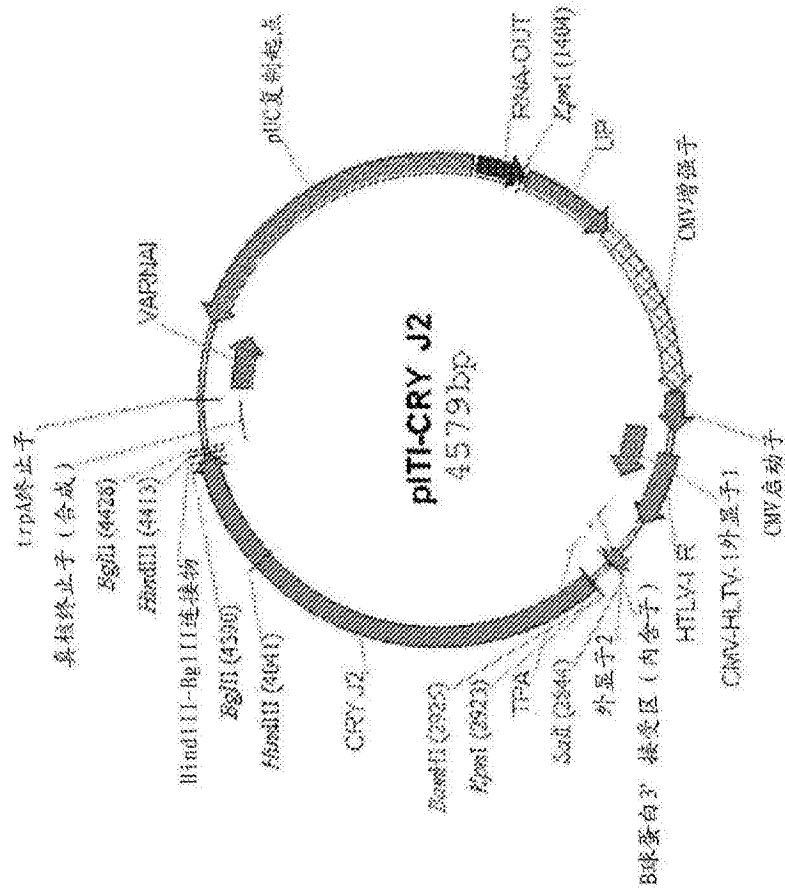


图8

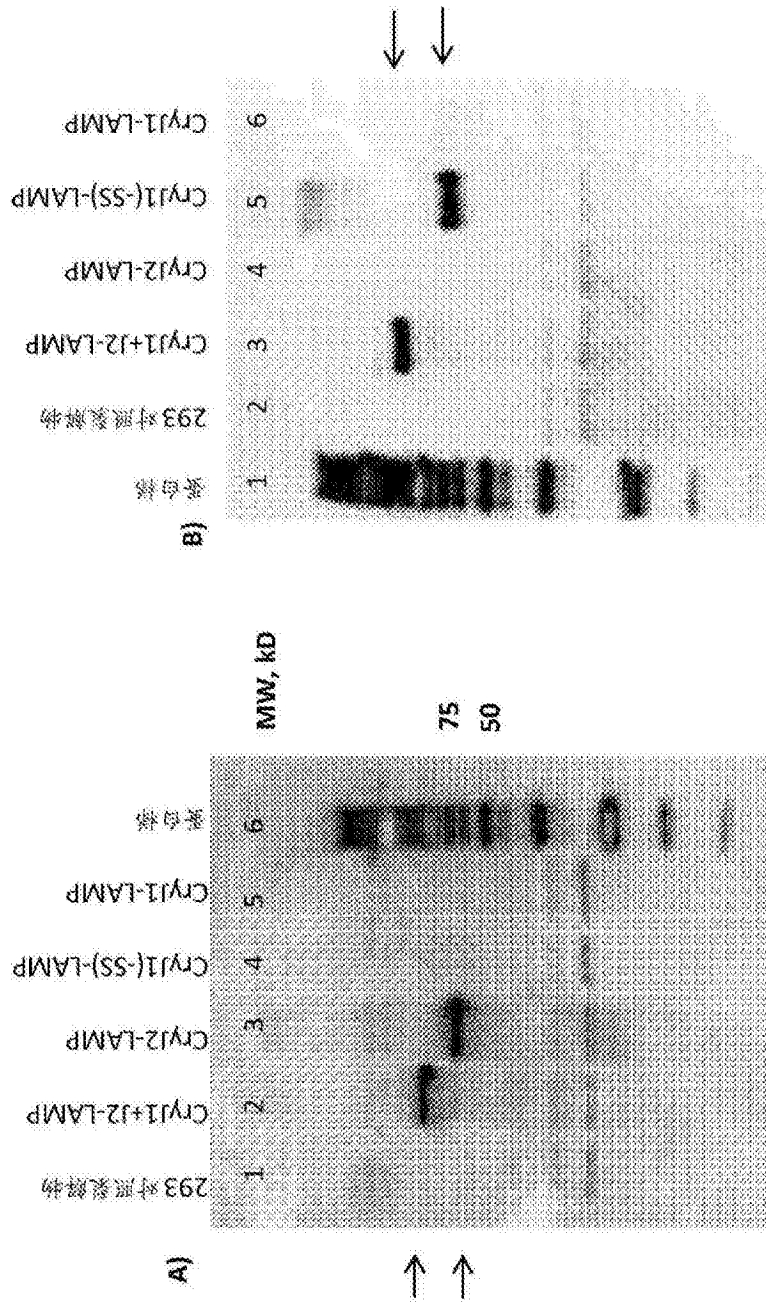


图9

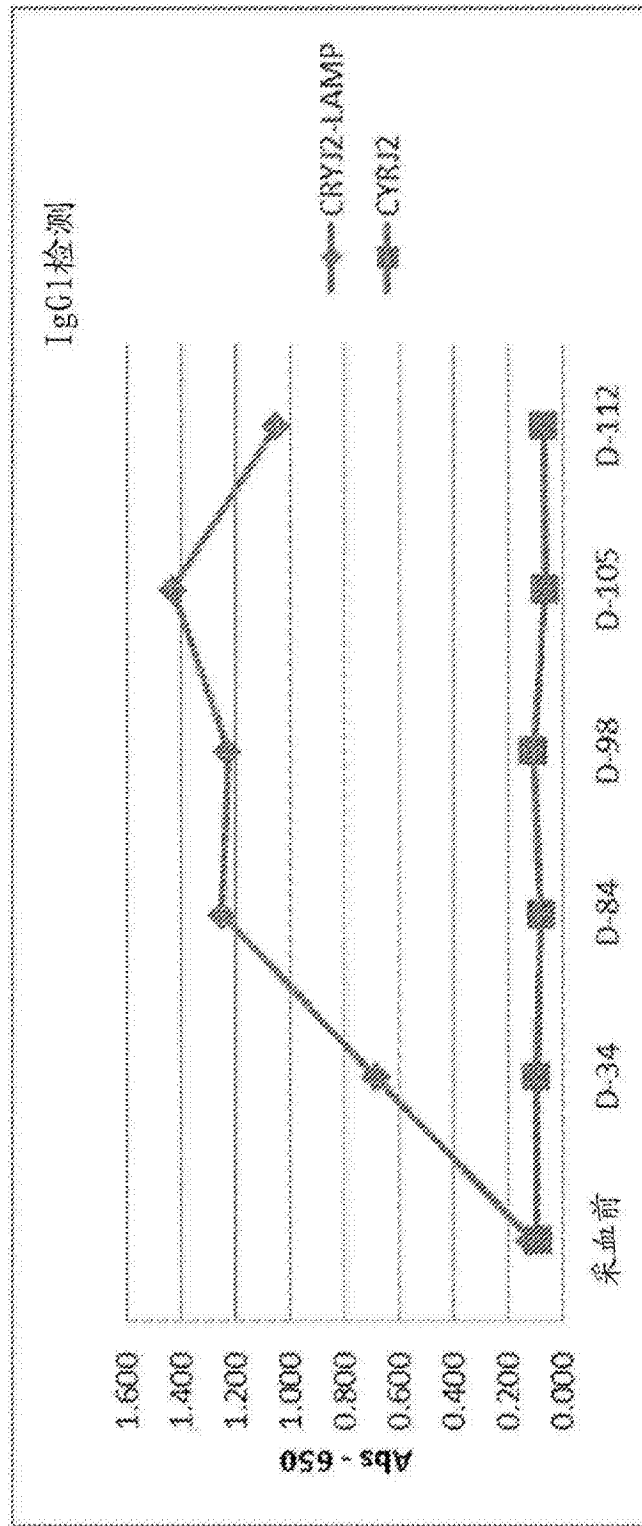


图10A

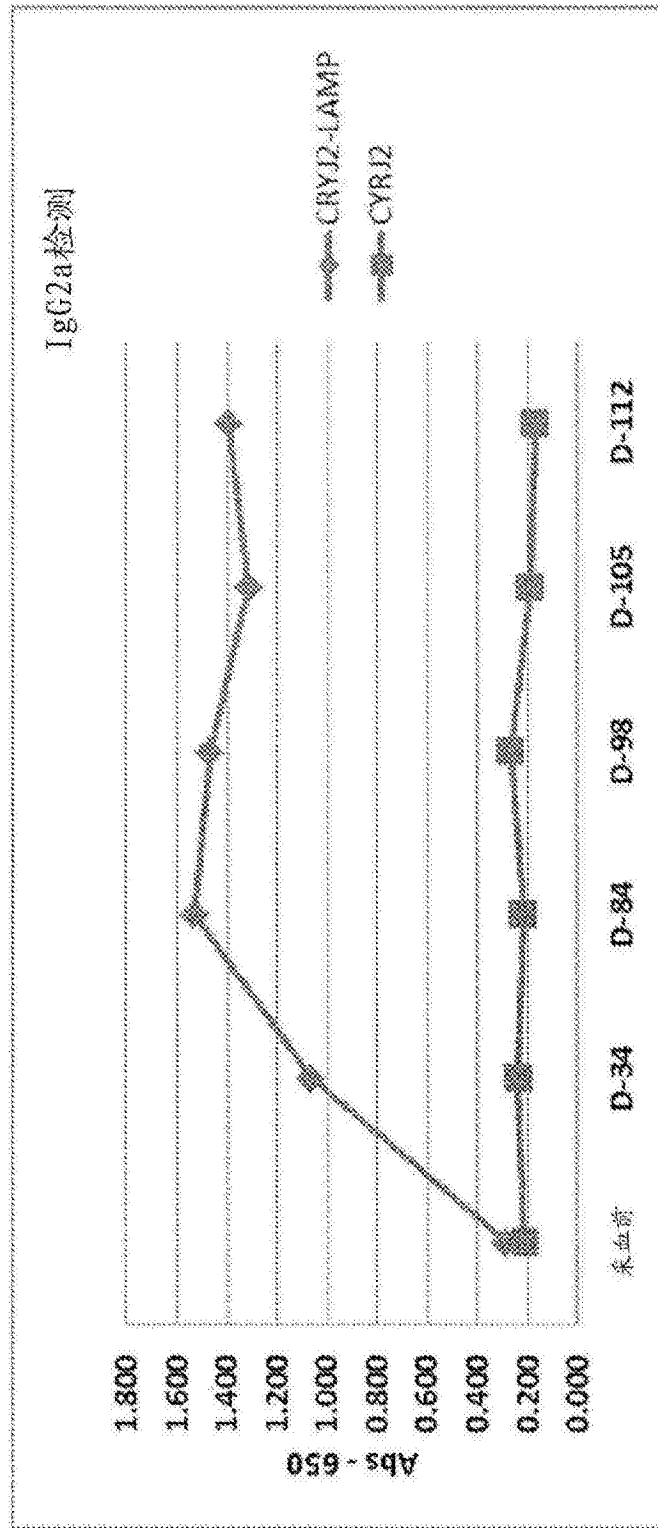


图10B

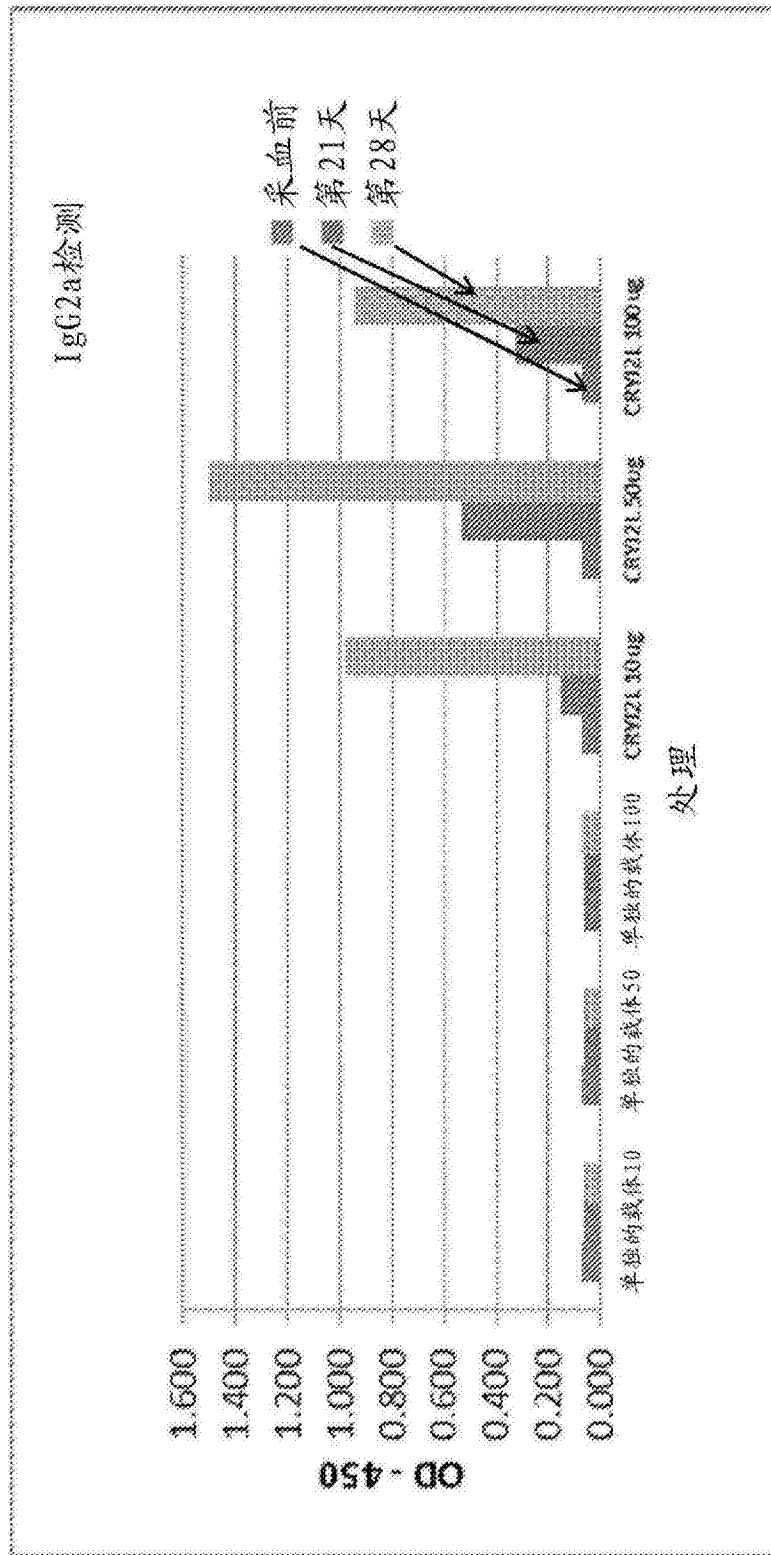


图11A

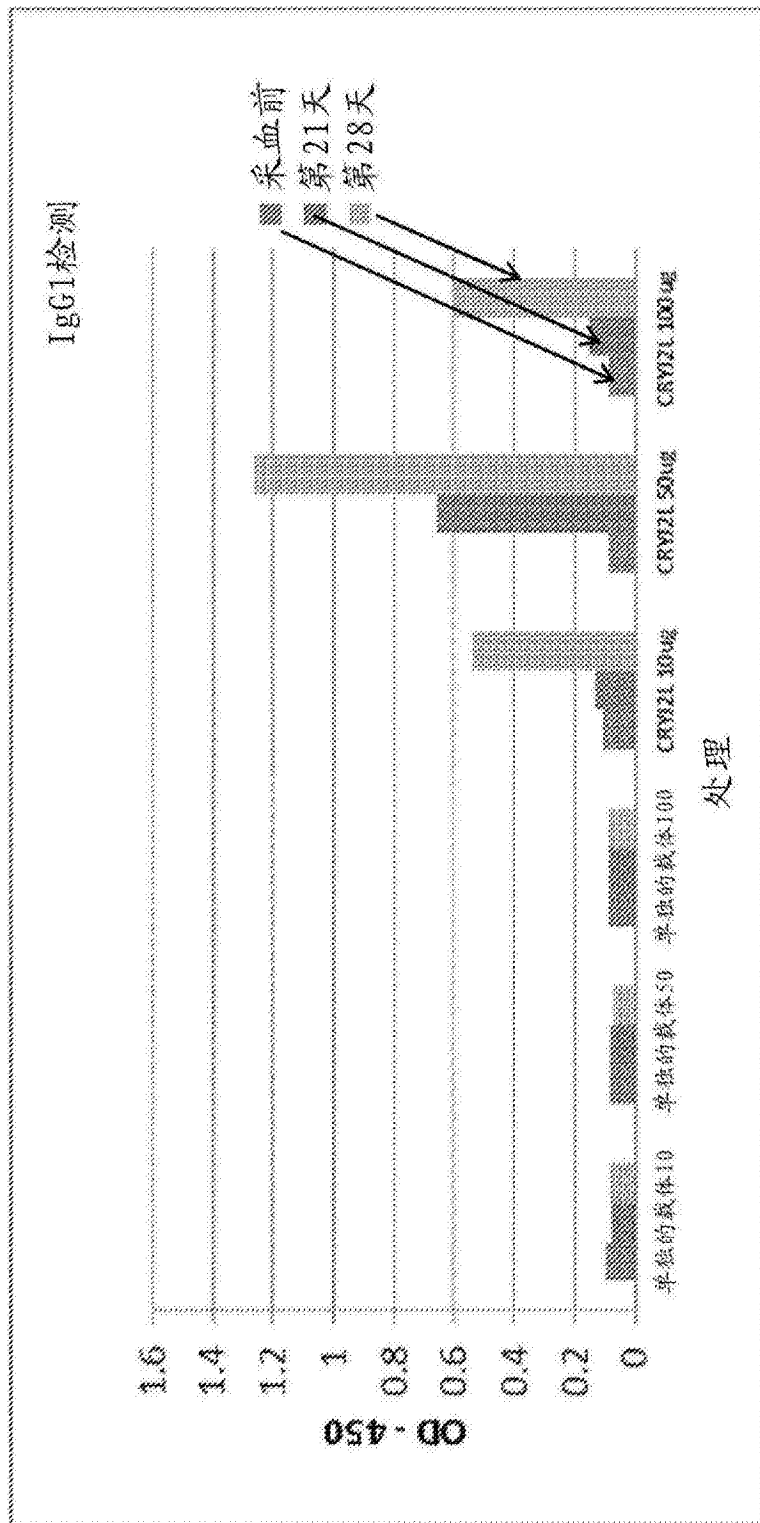


图11B

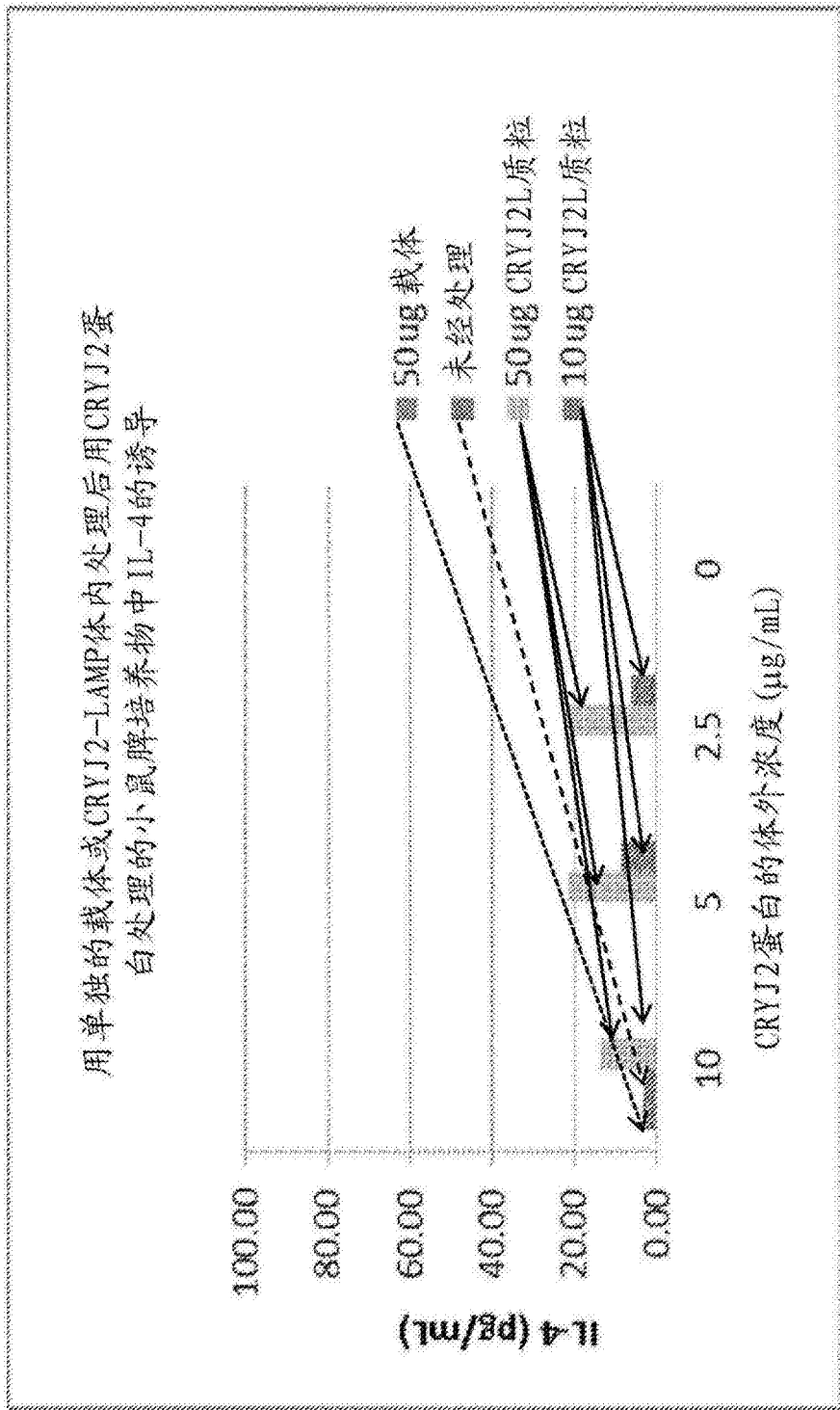


图12A

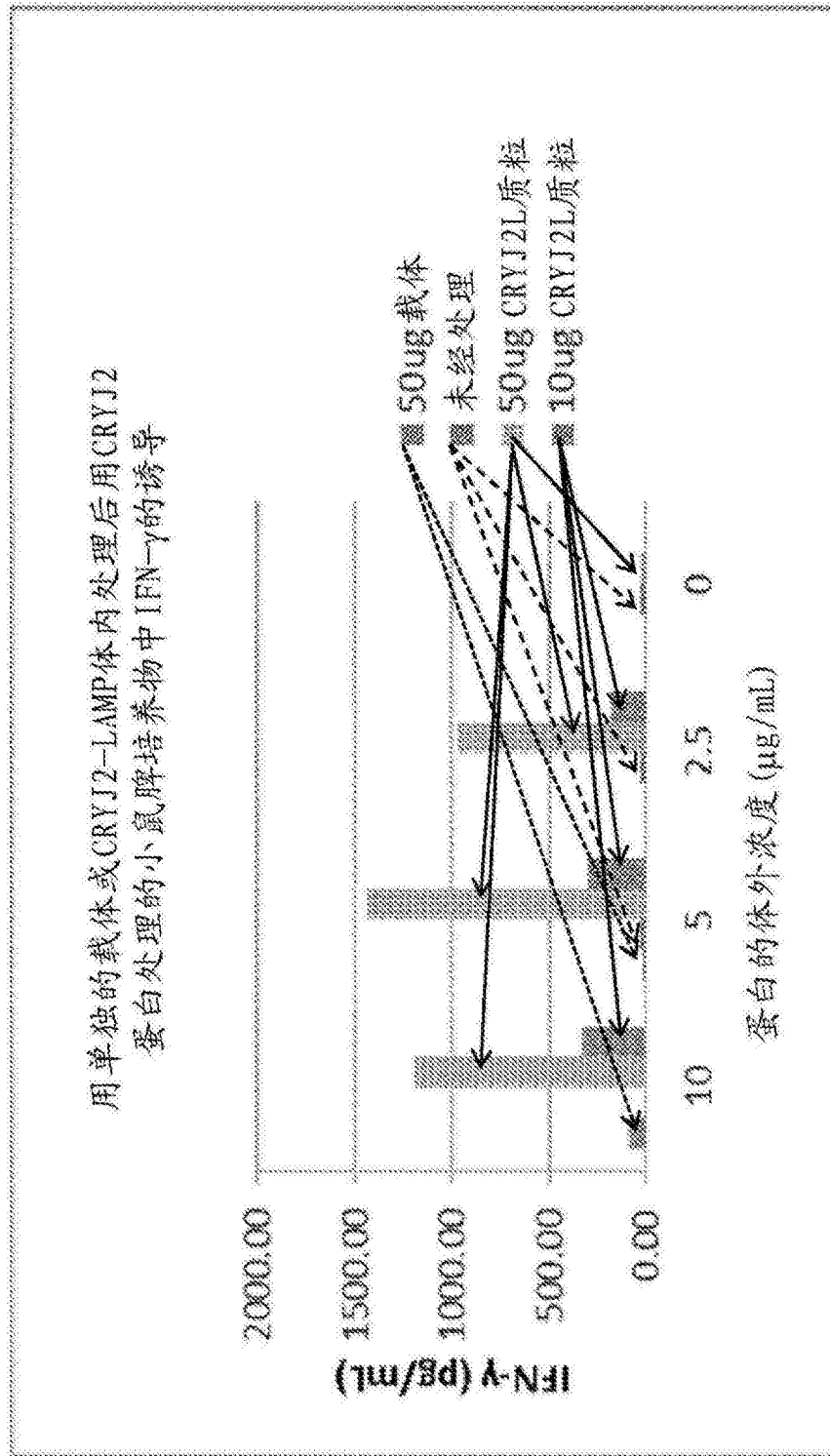


图12B

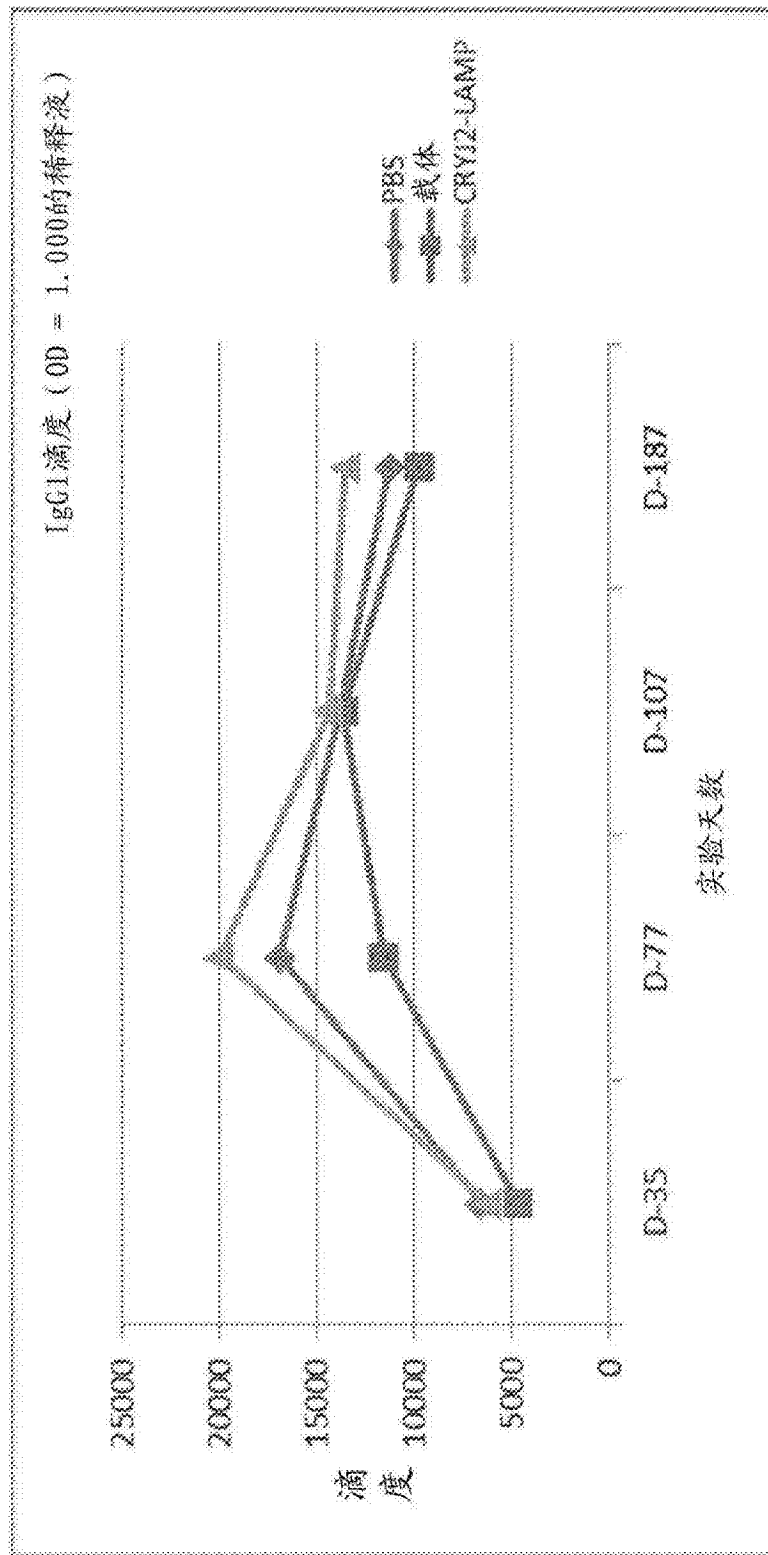


图13A

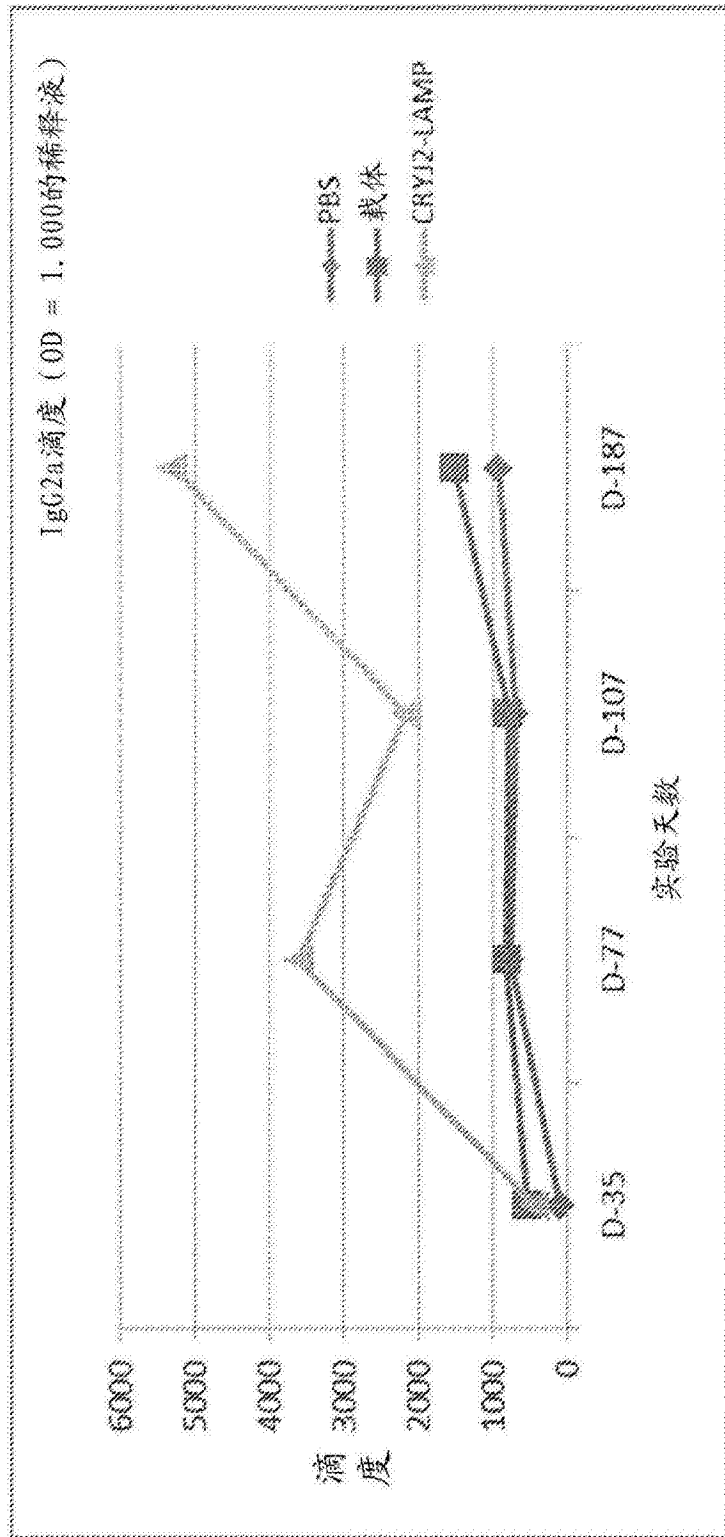


图13B

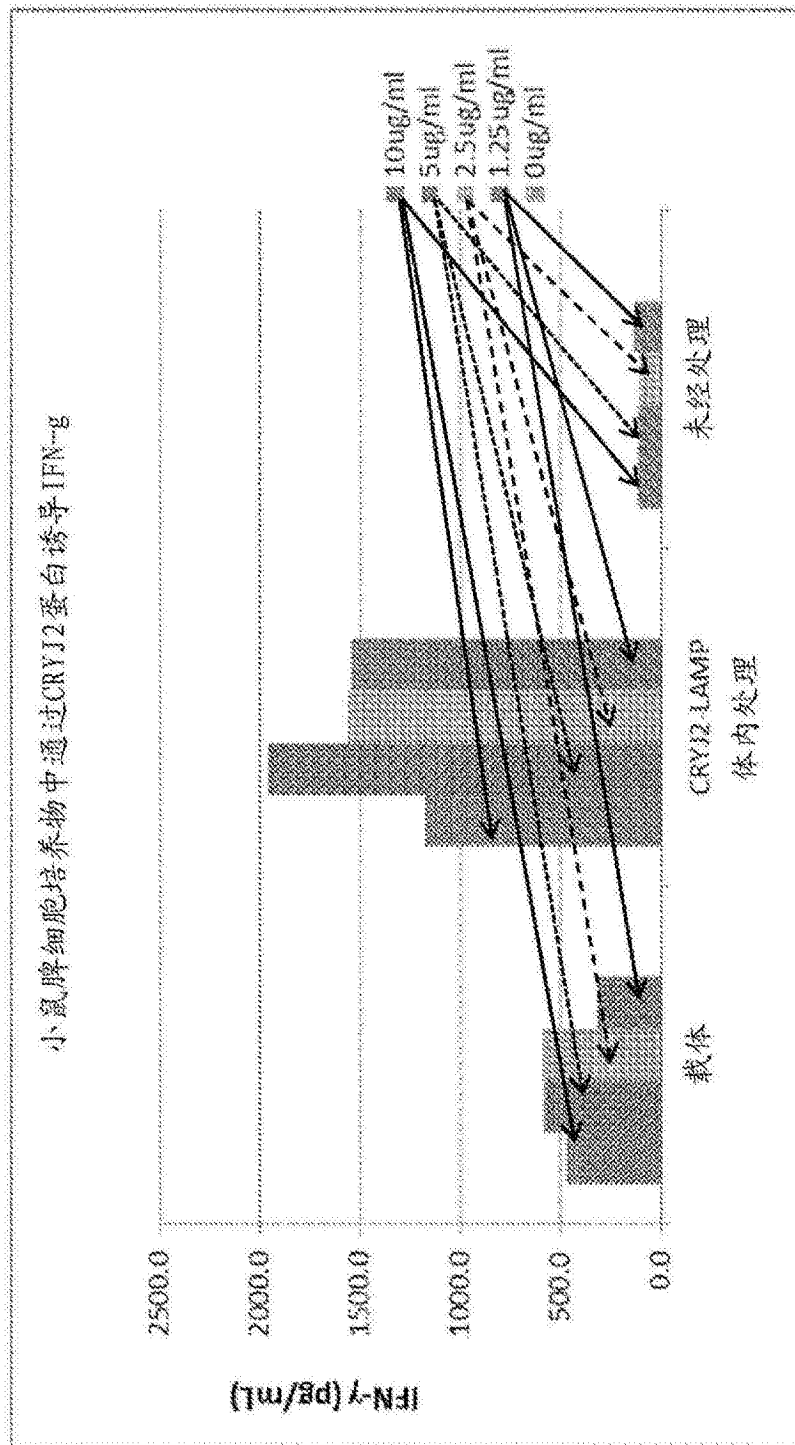


图14A

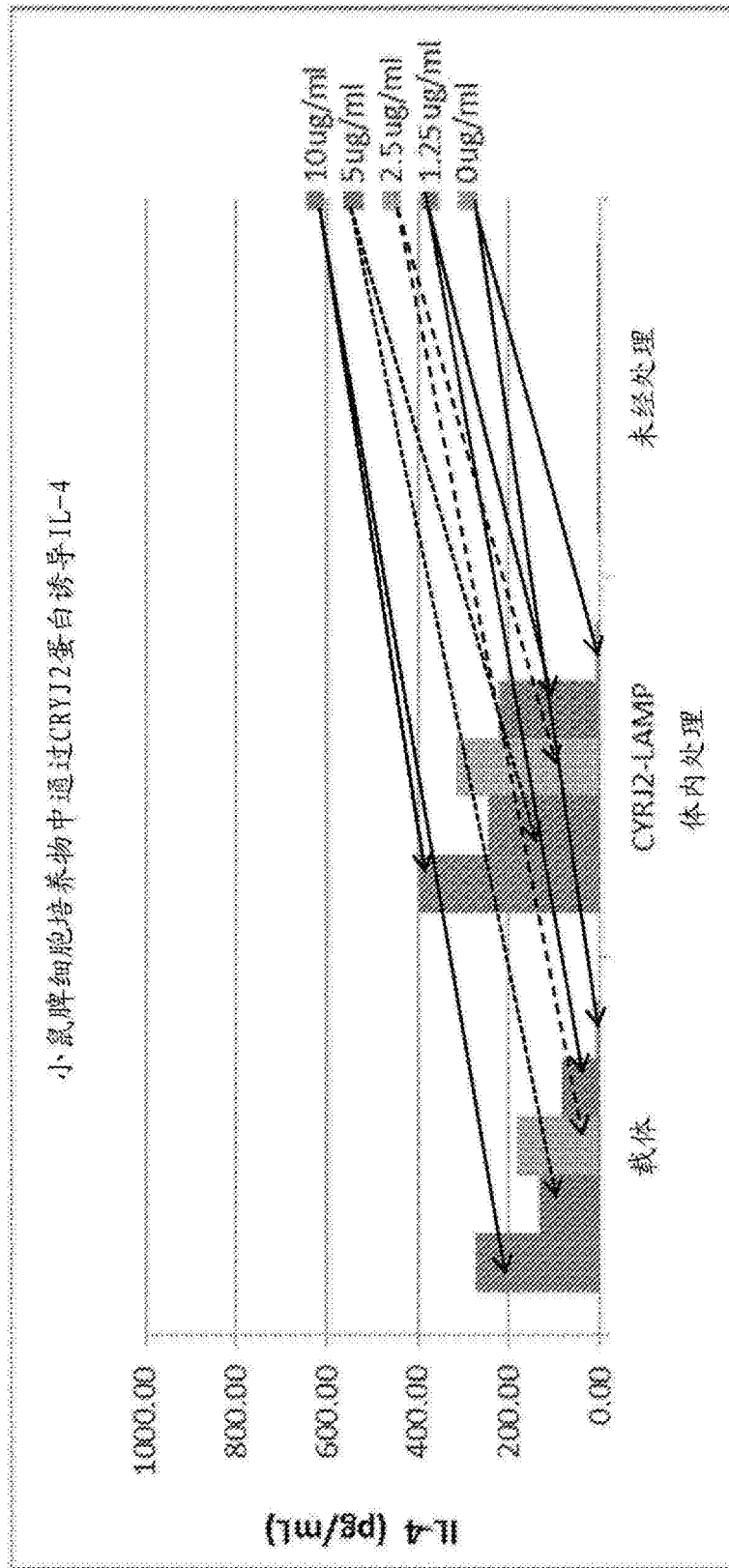


图14B

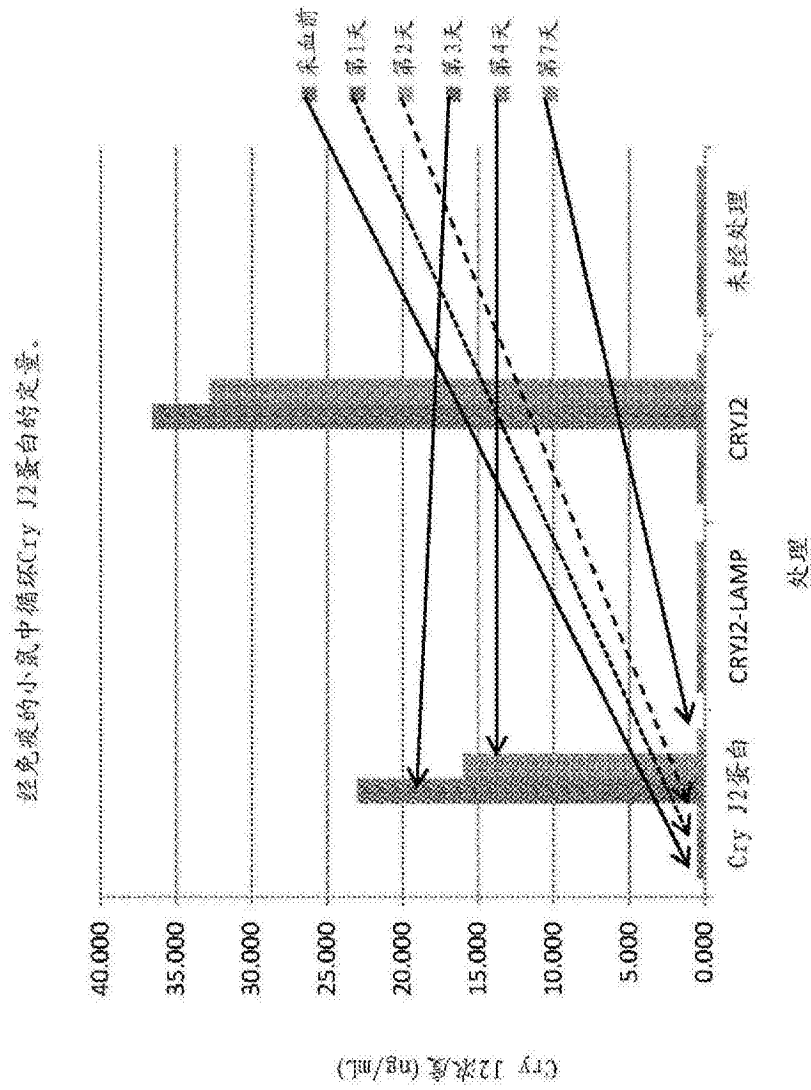


图15

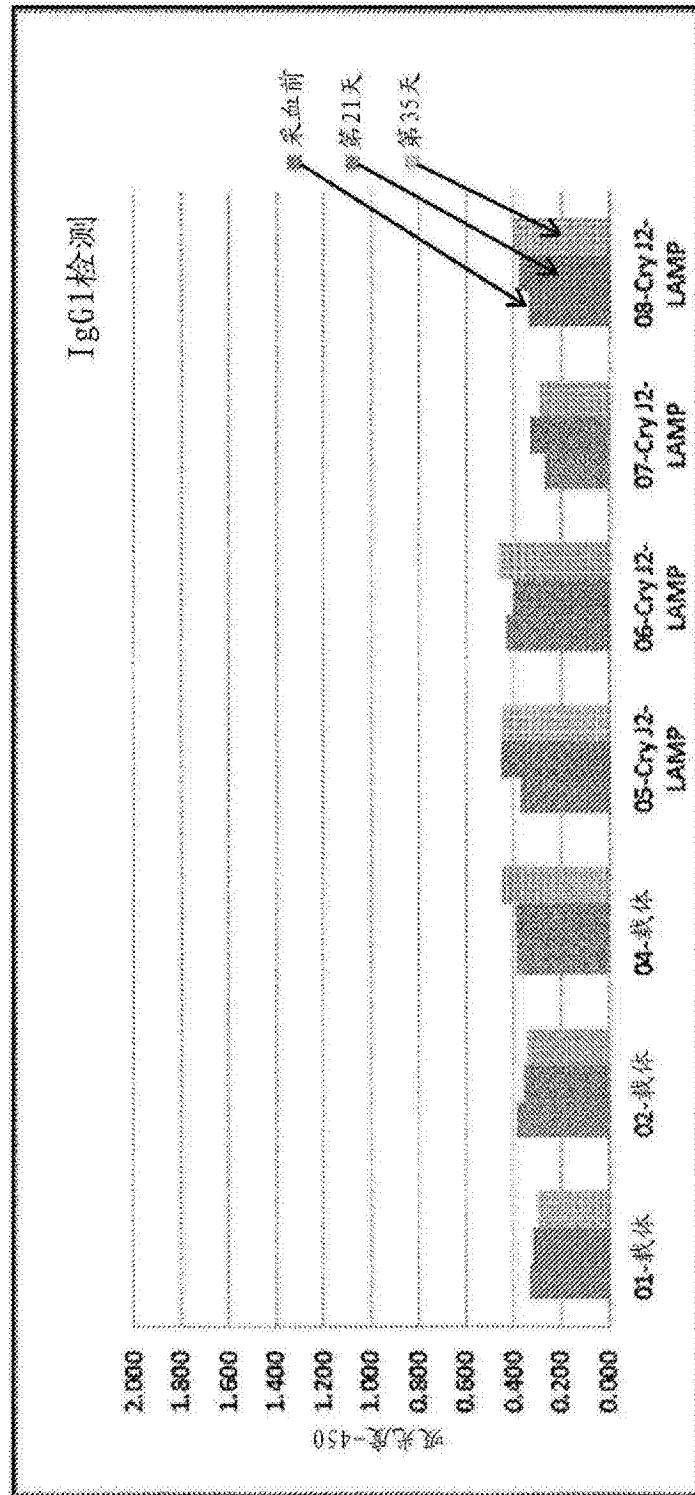


图16A

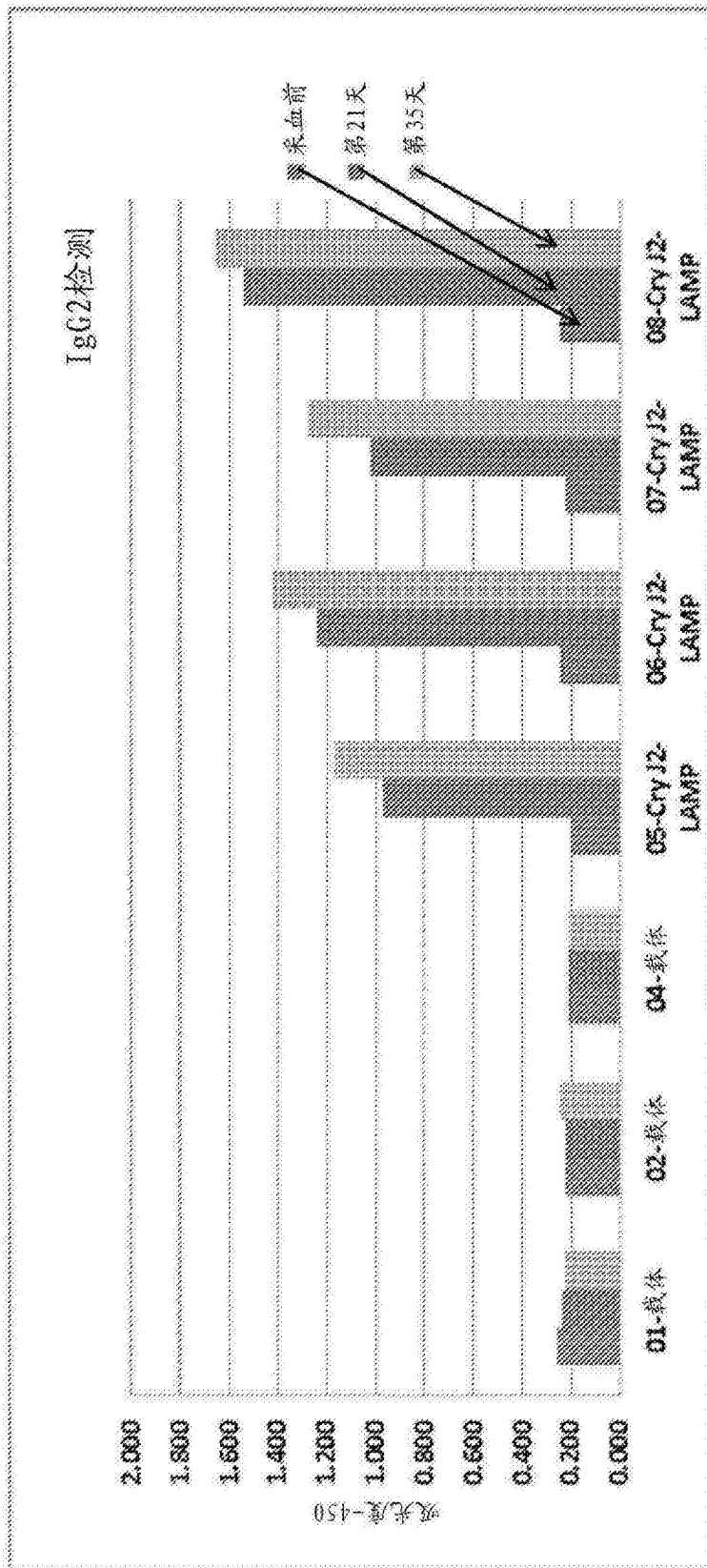


图16B

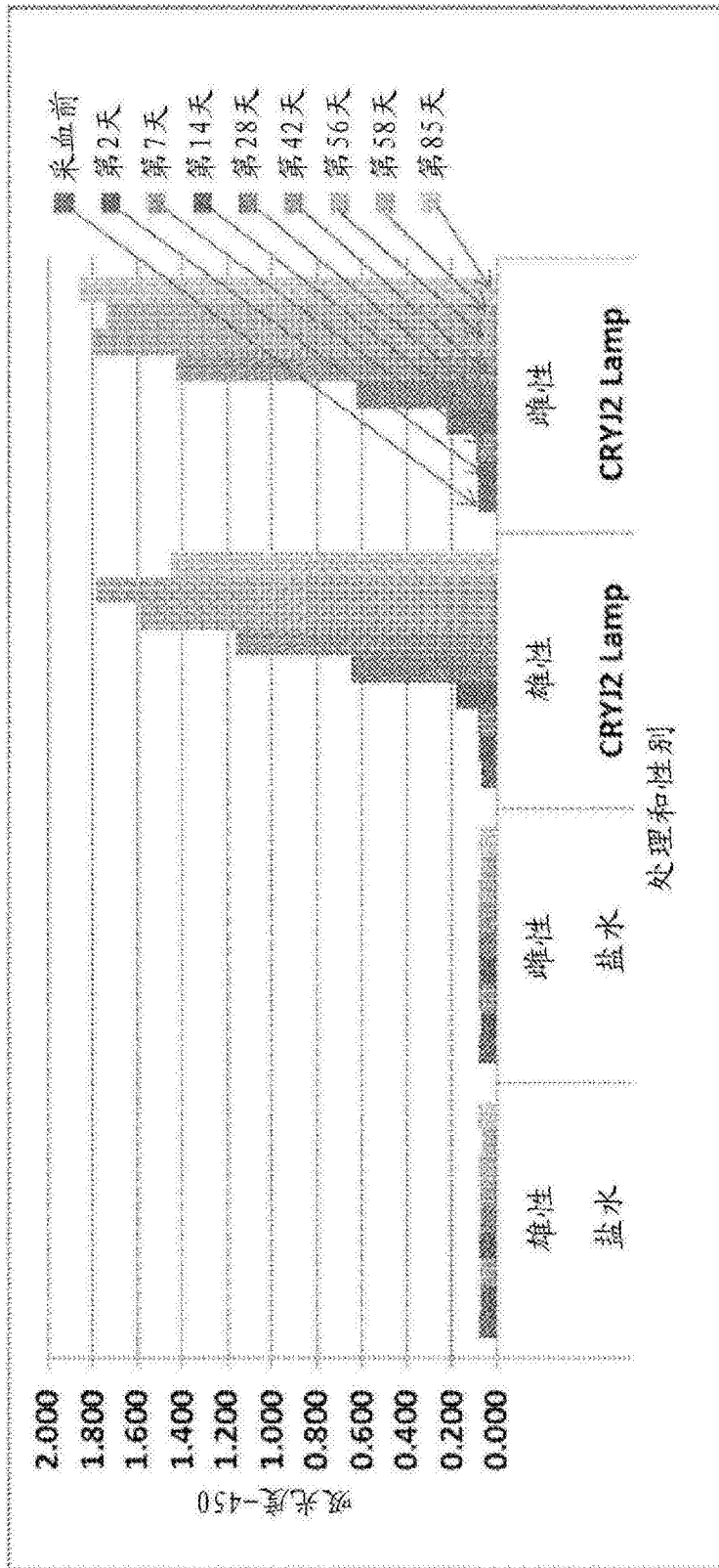


图17

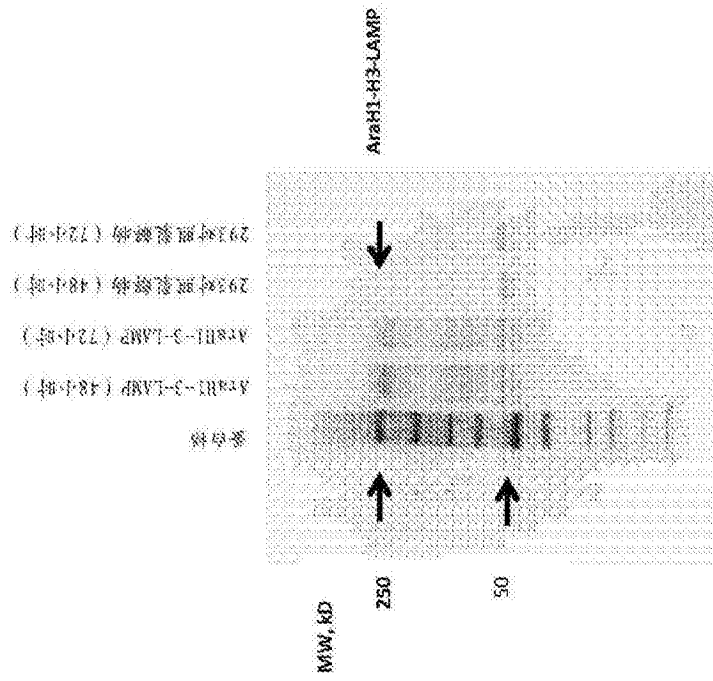


图18