(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。Int. Cl.[7]
C07K 14/47

(11) 공개번호 특2003-0081490
(43) 공개일자 2003년10월17일

(21) 출원번호 10-2003-7011573
(22) 출원일자 2003년09월03일
번역문 제출일자 2003년09월03일
(86) 국제출원번호 PCT/GB2002/00900
(87) 국제공개번호 WO 2002/70711
(86) 국제출원출원일자 2002년03월01일
(87) 국제공개일자 2002년09월12일

(30) 우선권주장 0105360.2 2001년03월03일 영국(GB)

(71) 출원인 글락소 그룹 리미티드
영국 유비6 0엔엔 미들섹스 그린포오드 버클리 애비뉴 글락소 웰컴 하우스

(72) 발명자 애쉬만,클레어
영국에스지12엔와이허트포드셔스티브니지건넬즈우드로드글락소스미스클라인

크로웨,제임스,스코트
영국에스지12엔와이허트포드셔스티브니지건넬즈우드로드글락소스미스클라인

엘리스,조나단,헨리
영국에스지12엔와이허트포드셔스티브니지건넬즈우드로드글락소스미스클라인

루이스,앨런,피터
영국에스지12엔와이허트포드셔스티브니지건넬즈우드로드글락소스미스클라인

(74) 대리인 남상선

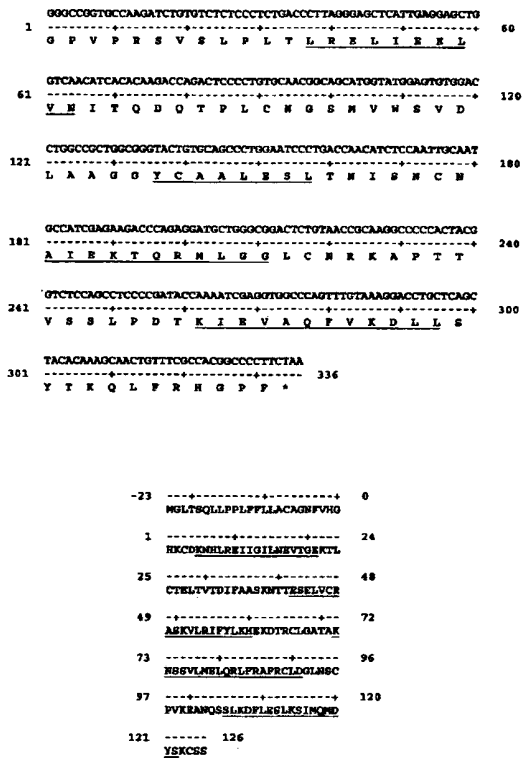
심사청구 : 없음

(54) 백신

요약

본 발명은 자기-항원에 대한 면역화를 위해 유용한 단리된 폴리펩티드에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 생체내로 투여되는 경우, 자가-항체를 생성시킬 수 있는 자기-단백질에 관한 것이다. 본 발명은 특히 인간 사이토카인을 인간에서 면역원성이 되게 하는 것에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 이러한 화합물을 포함하는 약제 조성물 및 의약 분야에서 이러한 화합물의 용도 및 이러한 화합물을 제조하는 방법에 관한 것이다.

대표도



명세서

기술분야

본 발명은 자기-항원에 대한 면역에 유용한 단리된 폴리펩티드에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 생체내로 투여될 경우, 자가-항체를 생성시킬 수 있는 자기-단백질에 관한 것이다. 본 발명은 특히 인간 사이토카인이 인간에서 면역원성이 되게 하는 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 이러한 화합물을 포함하는 약제 조성물 및 의약에서 이러한 화합물의 용도, 및 이러한 화합물을 제조하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

천식은 하부기도의 염증에 의해 초래되는 만성 폐질환으로서, 재발성 호흡 곤란을 특징으로 한다. 환자의 기도는 민감하며, 아무런 증상이 없더라도 어느 정도까지는 붓거나 염증이 생긴다. 염증은 기도의 폭을 좁게하여 폐로의 기류 유입 및 유출을 감소시켜, 호흡 곤란을 초래하고, 천명을 일으키고, 흉부 압박 및 기침을 초래한다. 천식은 알레르겐(예를 들어, 먼지진드기, 꽃가루, 곰팡이), 자극물(예를 들어, 연기, 증기, 강한 냄새), 호흡 감염물, 운동 및 건조한 날씨에 대한 과민성에 의해 촉발된다. 이러한 요인들은 기도 및 기도 내막을 붓게하여 심지어는 염증을 일으키게 하며, 그 후, 호흡이 어렵고 곤란해지고, 천식 증상이 나타날 때까지 점액이 기도를 막게 되고, 기도 주위의 근육들이 조여지게 된다.

COPD는 천식과 유사한 증상을 나타내고, 천식을 치료하는데 사용되는 약물과 동일한 약물로 치료되는 호흡기 질환을 설명하는데 사용되는 포괄적인 용어이다. COPD는 만성의 진행성인 주로 비가역적 기류 폐쇄를 특징으로 한다. 이러한 질환의 진행에 기여하는 개개의 요인은 공지되어 있지 않지만, 흡연이 이중 90%에 해당하는 것으로 여겨진다. 증상으로는 기침, 만성 기관지염, 호흡곤란 및 호흡기 충혈 (injection)이 있다. 결국, 이러한 질환은 심각한 장애 및 사망을 초래할 것이다.

모노클로날 항체의 제조, 투여 및 관용에 관련된 다양한 문제점으로 인해, 백신접종에 의해 적합한 특이성을 띠는 내생 항체를 유도하기 위한 환자 고유의 면역 시스템을 구축하는 방법에 대한 관심이 증가하고 있다. 그러나, 포유류는 일반적으로 혈청중에 존재하는 자기-단백질에 대한 높은 역가의 항체를 함유하지 않는데, 이는 면역 시스템이 이들의 형성을 억제하는 항상성 기전을 갖기 때문이다. 이러한 관용 기전의 중요성은 중증 근무력증과 같은 질환에 의해 입증되었으며, 여기서 자가-항체는 골격근의 니코틴 아세틸콜린 수용체로 유도되어 무력증 및 피로를 유발시킨다(Drachman, 1994, N Engl J Med 330:1797-1810). 따라서, 자가-항체-매개된 병리학을 유도하지 않으면서 항체 관용 기전을 회피할 수 있는 백신법이 요구된다.

허용불가능한 자가면역 독성을 유발시키지 않으면서, B 세포 관용을 파괴하기 위한 많은 방법이 고안되었다. 그러나, 이들 모두는 상당한 단점을 갖고 있다.

한 가지 기법은 자기-단백질(또는 이로부터 유래된 펩티드)을 고도로 면역원 성인 캐리어 단백질 예컨대, 키홀 림펫 헤모시아닌(keyhole limpet haemocyanin)에 화학적으로 가교시키는 것을 포함한다(Antibodies: A laboratory manual' Harlow, E and Lane D. 1988, Cold Spring Harbor Press). 이러한 방법은 면역원성이 불량한 표적 예컨대, 저분자량 화학 화합물에 대한 항체를 생성시키기 위해 널리 사용된 합텐-캐리어 시스템을 변형시킨 방법이다. 그러나, 화학 융합 과정으로 인해 잠재적으로 가치가 있는 에피토프를 파괴시킬 수 있으며, 많은 유발된 항체 반응은 캐리어 단백질에서 유도된다. 게다가, 이러한 방법은 단지 단백질 백신접종에만 적용가능하며, 핵산 면역원과는 양립불가능하다.

캐리어 단백질 기법을 변형시킨 방법은 캐리어 단백질(예를 들어, B형 간염 코어 단백질) 및 자기-단백질 둘 모두를 포함하는 융합 단백질을 엔코딩하는 유전자를 구성하는 것을 포함한다(The core antigen of hepatitis B virus as a carrier for immunogenic peptides', Biological Chemistry. 380(3):277-83, 1999). 융합 유전자는 핵산 백신의 일부로서 직접적으로 투여될 수 있다. 대안적으로, 이는 실험관내의 적합한 숙주 세포에서 발현될 수 있으며, 유전자 생성물은 정제되고, 애쥬번트의 유무에 상관없이 통상적인 백신으로서 전달된다. 그러나, 거대 캐리어 단백질을 자기-단백질에 융합시키는 것은 자기-단백질의 구조를 압박하거나 왜곡시켜, 천연 분자와의 항체의 교차 반응성을 유도하는데 있어서 효율성이 감소된다. 또한, 통상적인 가교된 캐리어 시스템과 같이, 많은 항체 반응은 융합체의 캐리어 부분에 대해 유도된다. 항-캐리어 반응은 백신의 후속 부스터 투여의 효능을 제한하거나, 알레르기성 또는 아나필락시 반응의 기회를 증가시킬 수 있 다.

더욱 정교한 방법은 달룸(Dalum) 등에 의해 기술되었으며, 여기서 하나의 클래스 II MHC-제한 에피토프가 표적 분자내로 삽입된다. 이들은 이러한 방법을 이용하여 유비퀴틴 (Dalum et al, 1996, J Immunol 157:4796-4804; Dalum et al, 1997, Mol Immunol 34:1113-1120) 및 사이토카인 TNF (Dalum et al, 1999, Nature Biotech 17:666-669)에 대한 항체를 유도하는 것을 설명하였다. 그 결과, 모든 T 세포 헬프 (help)는 이러한 단일 에피토프 또는 접점의 서열로부터 발생하였다. 이러한 방법은 고안된 백신에 대한 적합한 MHC 클래스 II 일배체형을 갖는 피검체 또는 실제로 접합 에피토프에 결합시킬 수 있는 클래스 II 분자를 갖는 행운의 피검체에서는 이용될 수 있지만, 인간이 전형적인 군집과 같은 임의의 정상적인 비근교계 군집의 경우, 군집의 상당 부분에서 백신이 효능을 발휘하지 못할 것이다. 추가로, 삽입된 에피토프가 전형적으로 오발부민 또는 리소자임과 같은 전혀 관련되지 않은 단백질로부터 유래하기 때문에, 부가적 서열은 표적 단백질의 폴딩을 어느 정도 까지는 방해하여, 표적 단백질의 완전한 천연 입체형태의 채택을 억제할 것이다.

이와 반대로, 본 발명은 고유 형태에 가까운 입체형태로 표적 분자를 보유하는, 다수의 잠재적인 T 세포 에피토프를 제공한다. 이러한 특성으로 인해 본 발명의 백신은 인간 환자로 이루어진 군집과 같은 복잡한 비근교계 군집에서 효과적인 면역원으로서 작용한다. 이러한 특성은 자기-단백질을 돌연변이시켜, 그 지점에서 유사한 단백질에서 발견될 수 있는 서열이 생성되게 함으로써 달성된다.

다수의 최근 문헌은 알레르기성 천식의 오발부민 모델에서 병리학을 유도하는 데에 있어서 Th2 사이토카인 IL-13의 중요한 역할을 규명하였다 (Wills-Karp et al, 1998; Grunig et al, 1998). 이러한 연구에서, 이전에 오발부민에 대해 감작성이 있는 마우스에 IL-13과 결합하고 이를 중화시키는 가용성 IL-13 수용체를 주입하였다. 처리군에서는 아세틸콜린에 대한 기도 과민반응성이 완전히 제거되었다. 조직학적 검증 결과 처리된 마우스는 대조군에서 나타난 배상세포 화생을 역행시켰다. 보충 실험에서, 폐 IL-13 수준은 형질전환 마우스에서의 과다발현에 의해 상승되거나 단백질을 야생형 마우스의 기도내로 인스톨 (install)함으로써 상승되었다. 이 둘 모두의 셋팅에 있어서, 기도 과민반응, 호산구 침습 및 점액 생성 증가가 관찰되었다 (Zhu et al, 1999). 이러한 데이터는 IL-13 활성이 잘 확인된 모델에서 알레르기성 천식의 여러 주요 임상적 및 병리학적 특성을 유발시키기에 충분하며 필수적이라는 것을 보여준다.

따라서, IL-13에 대한 중화 반응을 유도할 수 있는 백신은 인간의 알레르기성 천식의 치료를 위한 유용한 치료제를 구성할 것이다. 또한, 특정 기생충 감염 관련된 질환(Brombacher, 2000) 및 섬유증에서 IL-13 생성과 관련된 질환(Chiaramonte et al, 1999), 예컨대, 만성 폐쇄성 폐 질환의 치료에 적용될 것이다. 본 발명은 이러한 필요성을 충족시킬 것이다.

따라서, 본 발명의 개념 및 이론은 IL-13과 관련하여 기술되지만, 제 2의 종에서 유사 단백질을 갖는 모든 포유류 자기-단백질에 대해 적용될 수 있다.

발명의 개요

본 발명은 인간 단백질과 30% 내지 100% 미만 동일한 단리된 폴리펩티드로서,

(a) 인간 이외의 유사 단백질의 특징이 되는 하나 이상의 돌연변이를 함유하고;

(b) 인간에서 항체를 생성시킬 수 있고;

(c) 항체가 인간 단백질 및 폴리펩티드 둘 모두에 결합하기에 충분하게 인간 단백질과 구조적으로 유사하며;

(d) 항체가 아닌 폴리펩티드를 제공한다.

이와 같이, 본 발명은 한 구체예에서, 포유류 자기-항원으로부터의 B 세포 에피토프, 및 제 2 포유류종으로부터의 유사 단백질 서열을 초래하는 돌연변이를 갖는 단백질을 제공하며, 이러한 단백질은 B-세포 에피토프가 유래되는 종에서 B-세포 에피토프가 유래되는 천연 단백질을 인지하는 면역 반응을 일으킬 수 있다.

바람직하게는, 유사 단백질의 서열은 5개, 더욱 바람직하게는 8개를 초과하는 연속 아미노산이다. 따라서, 본 발명의 단백질은 5개, 바람직하게는 8개 이상의 연속 아미노산에 있어서 유사 서열과 동일한 서열을 함유한다. 대안적인 구체예에서, 제 2 포유류종으로부터의 유사 단백질의 프레임워크내로 치환에 의해 이식된 자기 단백질의 B 세포 에피토프를 갖는 단백질을 제공하며, 이러한 단백질은 B 세포 에피토프가 유래되는 종에서 B-세포 에피토프가 유래되는 천연 단백질을 인지하는 면역 반응을 일으킬 수 있다.

본 발명의 단백질은 항체가 아니라는 것이 인식될 것이다.

생성된 면역 반응은 바람직하게는 항체 반응, 가장 바람직하게는 중화 항체 반응이다.

일반적으로, 돌연변이는 바람직하게는 분자의 표면 노출되지 않은 영역내로 도입되어, 표면 노출 영역이 보존된다. 면역계는 표면 노출 영역을 이용할 수 있으므로, 이러한 영역은 종종 B-세포 에피토프를 함유한다. 따라서, 본 발명은 자기 단백질의 보존된 표면 노출 영역을 포함하고 표면 노출되지 않은 영역내로 돌연변이가 도입된 단백질을 제공하며, 상기 돌연변이는 이러한 단백질이 자기 단백질이 유래되는 종에서 자기-단백질에 대한 면역 반응을 일으킬 수 있도록 유사 단백질의 서열을 생성시킨다.

자기 단백질은 바람직하게는 인간 단백질이지만, 자기 면역 반응을 일으키는 것이 바람직한 임의의 포유류로부터의 단백질일 수 있다. 면역 반응은 바람직하게는 본 발명의 천연 단백질 및 면역원에 대해 특이적이다. 이러한 단백질은 그 밖의 자기 단백질에 대해서는 최소의 교차반응성 또는 중화능을 지닌다.

자기 항원은 바람직하게는 사이토카인, 더욱 바람직하게는 4중 나선 사이토카인, 더욱 바람직하게는 IL-4 또는 IL-13, 가장 바람직하게는 IL-13 이다. 따라서, 본 발명의 바람직한 구체예에 있어서, 뮤린 IL-13 주쇄에 제공되는 인간 IL-13으로부터의 B 세포 에피토프를 포함하는 키메라 단백질이 제공된다. 이러한 구성물은 인간에서 특이적 항 IL-13 항체 반응을 일으킬 수 있다. 이러한 구성물은 도 9에 도시되어 있다 (seq: ID No 21 및 22). 유사하게는, 인간 IL-표면 영역 및 뮤린 프레임워크를 포함하는 IL-4 구성물이 도 13에 제시되어 있다 (Seq ID: No 25).

또한, 본 발명은,

- 본 발명의 폴리누클레오티드를 포함하고, 본 발명의 폴리펩티드를 발현할 수 있는 발현 벡터;

- 본 발명의 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포;

- 본 발명의 숙주 세포를 폴리펩티드를 발현시키기에 적당한 조건하에서 본 발명의 숙주 세포를 유지시키고, 상기 폴리펩티드를 단리하는 것을 포함하여, 본 발명의 폴리펩티드를 생성하는 방법; 및

- 본 발명의 폴리펩티드 또는 폴리누클레오티드 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 백신 조성물을 제공한다.

또 다른 양태에 있어서, 본 발명은 본 발명에 따른 폴리펩티드를 설계하고 제조하는 방법으로서,

1. 항체 반응이 바람직한, 자기 단백질, 전형적으로 인간 단백질의 하나 이상의 영역을 확인하는 단계,

2. 자기 단백질의 아미노산 서열을 확인하는 단계,

3. 아미노산 서열이 단계 2에서 확인된 서열로부터 수득되는 단계 1에서 확인되는 하나 이상의 표적 영역을 함유하는 키메라 분자의 유사 단백질 구성물의 아미노산 서열을 재조합 DNA 기술에 의해 확인하는 단계로서, 돌연변이 단백질이 자기 단백질을 인지하는 면역 반응을 일으킬 수 있도록, 생성된 단백질을 자기 단백질의 형태와 유사한 형태로

폴딩시킬 수 있기에 충분한 단계 3에서 확인된 서열(들)로부터의 아미노산을 확인하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

GST = 글루타티온 S-트랜스퍼라제, rmIL-13 = 재조합 마우스 IL-13, rhIL-13 = 재조합 인간 IL-13, cIL-13 = 키메라 IL-13

도 1은 마우스 키메라 IL-13 백신 구성물의 서열을 도시한다. 밑줄그어진 아미노산 기호는 인간 IL-13의 서열을 나타내고, 아무 표시가 없는 기호는 뮤린 IL-13으로부터 유래된 것이다.

도 2는 쿠마시 블루 (Coomassie Blue)로 전체 단백질에 대해 염색된, 4 내지 20% Tris-글리신 SDS-PAGE 겔 (Novex)에 의한 GST cIL-13의 분석을 도시한다.

도 3은 GST-cIL-13의 웨스턴 블롯 분석을 도시한다.

도 4는 cIL-13 및 GST-cIL-13과, 항-mIL-13 폴리클로날 항체, 항-hIL-13 폴리클로날 항체 및 항-GST 폴리클로날 항체와의 상호작용의 ELISA 분석을 도시한다.

도 5는 cIL-13 및 GST-cIL-13과, mIL-13 수용체, mIL-13Rα1 및 mIL-13Rα2와의 상호작용의 ELISA 분석을 도시한다.

도 6은 A549 용해물의 항-포스포-STAT6 웨스턴 블롯을 도시한다.

도 7은 GST-cIL-13 (마우스 F5) 또는 cIL-13 (마우스 E5)을 사용한 면역접종에 의해 유도된 항체 반응을 도시한다.

도 8은 A549 용해물의 항-포스포-STAT6 웨스턴 블롯 분석을 도시한다.

도 9는 인간에서 사용되는 키메라 IL-13 백신을 도시한다. 밑줄그어진 아미노산 기호는 뮤린 IL-13에서 발견되는 서열을 나타내고, 아무 표시가 없는 기호는 인간 IL-13으로부터 유래된 것이다.

도 10은 cIL-13과 함께 다양한 애쥬번트를 투여한 후의 항-마우스 IL-13 항체 프로파일을 도시한다.

도 11은 cIL-13의 투여 후의 마우스의 혈청 중화능을 도시한다.

도 12는 마우스 면역원으로서 사용되는 또 다른 cIL-13을 도시한다.

도 13은 인간 항 IL-4 백신에 사용되는 키메라 IL-4를 도시한다.

발명의 상세한 설명

명세서 및 첨부된 청구의 범위 전반에 걸쳐서, 문맥상 별다른 사항이 필요치 않는 한, '포함한다'라는 용어 또는 '포함하는' 등과 같은 이의 파생 형태는 포괄적인 것으로 해석되어야 하는데, 즉, 이들 용어를 사용하는 것은 명확하게 언급되지 않은 정수 또는 엘리먼트를 포함할 수 있음을 암시한다.

본 명세서에 기술된 바와 같이, 본 발명은 단리된 폴리펩티드 및 단리된 폴리누클레오티드에 관한 것이다. 본 발명과 관련하여, '단리된'이란 용어는, 적어도 어느 정도 정제되거나, 예를 들어 재조합 방법 또는 기계적 합성법에 의해 합성적으로 생성되는 한에 있어서, 폴리펩티드 또는 폴리누클레오티드가 이의 천연 상태로 존재하지 않음을 의미하는 것으로 의도된다. 따라서, '단리된'이란 용어는 폴리펩티드 또는 폴리누클레오티드가 세포, 세포 또는 세포 단편의 현탁액, 단백질, 펩티드, 발현 벡터, 유기 또는 무기 용매, 또는 적절한 경우, 그 밖의 물질과 같은 기타 생물학적 또는 비-생물학적 물질과 함께 존재할 가능성을 포함하지만, 폴리누클레오티드가 자연계에서 발견되는 상태로 존재하는 경우는 제외한다.

본 발명의 잇점은 본 발명의 폴리펩티드가 항체 반응이 바람직한 자기 단백 질, 예를 들어 인간 단백질의 영역을, 우수한 T 세포 헬프를 제공하도록 하기에 인간 단백질과 충분한 상이하지만 인간 단백질과 매우 유사한 형태로 폴딩되

도록 진화에 의해 최적화된, 유사 단백질의 특징이 되는 영역과 함께 함유한다는 데에 있다. 이는 자기 항원을 인지하는 항체가 생성되게 할 수 있다. 전형적으로, 생성된 면역 반응은 중화 항체 반응을 일으키는 것을 포함한다.

본 발명에 따른 인간 단백질은 인간 게놈에 의해 엔코딩되는 전장 단백질 또는 인간 게놈에 의해 엔코딩되는 전장 단백질의 도메인 또는 서브-유닛일 수 있다. 자기 항원의 작용 도메인- 또는 수용체 결합 도메인에 대한 중화 항체를 생성하는 것이 바람직한 경우, 이들 영역만을 포함하는 키메라 항원이 제조될 수 있다. 따라서, 이러한 도메인의 노출 영역, 또는 이러한 도메인의 B 세포 에피토프는 보존되고, 유사 단백질의 돌연변이가 B 세포 에피토프 이외의 부분 또는 표면 노출 도메인내로 도입된다.

'단백질'이란 용어는 예를 들어 신경펩티드와 같은 펩티드로서 언급될 수 있는 아미노산 잔기의 보다 짧은 서열을 포함하도록 의도된다. 인간 단백질은 전형적으로 글리코실화, 단백분해성 절단, 인산화, 및 당업자에게 널리 공지된 그 밖의 변화와 같은 번역후 변화의 대상일 것이다. 인간 단백질은 바람직하게는 사이토카인, 호르몬, 성장 인자 또는 세포외 단백질, 더욱 바람직하게는 4중 나선 사이토카인, 가장 바람직하게는 IL-13 이다. 사이토카인으로는, 예를 들어 IL1, IL2, IL3, IL-4, IL5, IL6, IL7, IL8, IL9, IL10, IL11, IL12, IL13, IL14, IL15, IL16, IL17, IL18, IL20, IL21, IL25, TNF, TGF, GMCSF, MCSF 및 OSM이 있다. 4중 나선 사이토카인으로는 IL2, IL3, IL-4, IL5, IL13, GMCSF 및 MCSF가 있다. 호르몬으로는, 예를 들어 황체형성 호르몬 (LH), 여포 자극 호르몬 (FSH), 융모막성 고나도트로핀 (CG), VGF, GHrelin, 어구티 (agouti), 어구티 관련 단백질 및 신경펩티드 Y가 있다. 성장 인자로는, 예를 들어 VEGF가 있다. 세포외 단백질로는, 예를 들어 APP 또는 B-아밀로이드가 있다.

유사 단백질은 자기-단백질, 예를 들어 인간 단백질에 대해 오르톨로거스 (orthologous)하거나 파랄로거스 (paralogous)한 단백질인데, 오르톨로거스 단백질은 다양한 생물체의 공통 선조에 대한 혈족에 의해 규명될 수 있으며, 따라서 이것은 다양한 생물체에서 유사한 보존된 기능을 수행하는 것으로 여겨진다. 따라서, 오르톨로거스 유전자는 하나의 선조 유전자로부터 유래되는 서열이 유사한 유전자로서, 다양한 종에서 등가의 유전자이며, 공통 선조로부터 특성에 따라 진화해왔다. 특히, 인간의 경우, 오르톨로거스 단백질은 인간 이외의 포유류에서 구조적으로 등가인 분자이다. 파랄로거스 단백질은 복제에 의해 주어진 생물체에서 1개가 넘는 복사체에서 나타나는 단백질 (Venter, Science; 1336, vol 291; 2001), 즉, 유전자 복제에 의해 다양해진 상동 서열 (공통의 진화 선조를 공유함)이다. 바람직하게는, 유사 단백질은 오르톨로그 (orthologue)이다. 오르톨로거스 단백질은 전형적으로 인간 단백질과 동일한 명칭을 지니며, 전형적으로 동일한 기능을 수행하는데, 예를 들어 뮤린 IL-13은 인간 IL-13에 대한 오르톨로그이다. 유사 단백질은 전형적으로 포유류 또는 조류, 예를 들어 소과 동물, 양, 뮤린과 같은 설치류, 돼지, 원숭이, 고양이과 동물, 개과 동물 또는 인간이다. 바람직하게는, 유사 단 백질은 뮤린이다. 따라서, 본 발명과 관련하여, 뮤린 IL-13은 인간 IL-13에 대한 유사 (및 오르톨로거스) 단백질이다. 유사하게는, 원숭이 IL-4는 인간 IL-4에 대한 유사 (및 오르톨로거스) 단백질이다.

본 발명의 폴리펩티드는 바람직하게는 유사 단백질의 특징이 되는 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개 이상의 돌연변이를 포함한다. 더욱 바람직하게는, 폴리펩티드는 3개 이상의 돌연변이를 포함한다. 각각의 돌연변이는 동일하거나 상이한 유사 단백질의 특징이 될 수 있다. 따라서, 첫 번째 돌연변이는 뮤린 유사체의 특징이 될 수 있고, 두 번째 돌연변이는 원숭이 유사체의 특징이 될 수 있다. 한 가지 특징에 따르면, 폴리펩티드는 3개 이상의 돌연변이를 포함하며, 각각의 돌연변이는 다양한 유사체의 특징이 된다. 그러나, 바람직하게는, 각각의 돌연변이는 동일한 유사체의 특징이 된다. 돌연변이는 단백질의 아미노산 서열의 변화이며, 예를 들어 결실, 삽입 및 치환을 포함한다. 바람직하게는, 돌연변이는 치환이다. 바람직하게는, 1개가 넘는 아미노산이 각각의 표면 노출되지 않은 영역에서 치환된다.

유사 단백질의 특징이 되는 돌연변이는, 돌연변이가 인간 단백질에 대해 이수행된 후, 유사 단백질의 서열과 동일성이 보다 가까운 인간 단백질의 서열을 초래하는 돌연변이이다. 예를 들어, 인간 서열이 ProProArgVal 이고, 뮤린 유사체가 서열 ProProTyrVal을 지니는 경우, 유사 단백질의 특징이 되는 돌연변이는 Tyr을 Arg로 치환하는 것이다. 바람직하게는, 돌연변이는 생리학적 조건하에서 수용액에서 천연 폴딩된 활성 단백질 중의 표면 잔기인 잔기에서는 수행되지 않는다. 이러 한 표면 잔기, 특히 루프 구조를 형성하는 잔기는 종종 B 세포 에피토프이며, 이들 영역 모두가 보존되는 것이 바람직하다. 이렇게 도입된 돌연변이는 자기-단백질의 관용을 파괴하는 기능을 지니며, 돌연변이되지 않은 단백질이 유래되는 종에서 면역원성이다.

한 가지 구체예에 있어서, 본 발명의 폴리펩티드는 바람직하게는 인간 단백질의 전장에 걸쳐서 인간 단백질과 30% 이상 100% 미만의 동일성을 지닌다. 바람직하게는 폴리펩티드는 인간 단백질과 40% 이상, 예를 들어 50% 이상 동일하다. 보다 바람직하게는 폴리펩티드는 인간 단백질과 60% 이상, 예를 들어 70% 이상 동일하다. 가장 바람직하게는 폴리펩티드는 인간 단백질과 85% 이상, 예를 들어 약 90% 동일하다. 이러한 단백질은 인간 단백질을 인지하는 인간의 면역 반을을 야기할 수 있다.

예를 들어, UWGCG 팩키지는 상동성을 계산하기 위하여 사용될 수 있는(예를 들어 디폴트 세팅으로 사용될 수 있는) BESTFIT 프로그램을 제공한다(참고 문헌: Devereus et al. (1984) Nucleic Acids Research 12, p387-395). PILEUP 및 BLAST 알고리즘은 예를 들어 문헌(Altschul (1993) J. Mol, Evol. 36, 290-300; Altschul et al (1990) J. M

ol. Biol. 215:403-10)에 기술된 바와 같이 상동성 또는 정렬 서열(통상적으로 이들의 디폴트 세팅상의)을 계산하는데 사용될 수 있다.

BLAST 분석을 수행하기 위한 소프트웨어는 국립 생물 정보 센터(참조: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)를 통하여 공개적으로 입수가능하다. 이러한 알고리즘은 먼저, 데이터베이스 서열에서 동일한 길이의 워드 (word)와 정렬될 경우에 양값 한계 스코어 T와 일치하거나 이를 충족시키는 질의 서열 중에서 길이 W의 짧은 워드를 확인함에 의해 높은 수치의 서열 쌍(HSP)를 확인하는 것을 포함한다. T는 이웃하는 워드 스코어 한계 (참조: Altschul et al, 1990)을 의미한다. 이러한 초기 이웃하는 워드 히트 (word hit)는 이들을 함유하는 HSP를 발견하기 위한 검색을 개시하기 위한 시드 (seed)로서 작용한다. 이러한 워드 히트는 누적되는 정렬 수치가 증가할 수 있는 한은 각 서열을 따라 양 방향으로 연장된다. 각 방향으로의 워드 히트의 연장은, 누적되는 정렬 수치가 최대 값으로부터 양 X 만큼 떨어지거나; 하나 이상의 마이너스 수치의 잔기 정렬의 누적으로 인하여 누적되는 수치가 0 이하로 떨어지거나; 각 서열의 끝에 도달하는 경우에 중단된다. BLAST 알고리즘 파라미터 W, T, 및 X는 민감도 및 정렬 속도를 결정한다. BLAST 프로그램은, 프로그램이 폴리누클레오티드에 사용되는 경우에, 디폴트로서 암호 길이(W) 11, BLOSUM62 스코어링 매트릭스(참조: Henikoff and Henikoff, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915-10919) 정렬(B) 50, 기대값(E) 10, M=5, N=4, 및 양 가닥의 비교를 사용한다.

BLAST 알고리즘은 2개의 서열 간에 유사성의 통계적 분석을 수행한다 (참고: Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5787). BLAST 알고리즘에 의해 제공되는 유사성의 한 척도는 최소 합 확률(P(N))이고, 이는 2개의 누클레오티드 또는 아미노산 서열이 우연히 일치할 수 있는 확률의 지표를 제공하다. 예를 들어, 서열은, 제 1 서열과 제 2 서열의 비교에서 최소 합 확률이 약 1 미만, 바람직하게는 약 0.1 미만, 보다 바람직하게는 약 0.01 미만, 가장 바람직 하게는 약 0.001 미만인 경우에 다른 서열과 유사한 것으로 간주된다.

본 발명에 따른 폴리펩티드의 성공적인 설계는, 예를 들어, 적절한 숙주 세포에 발현되는 경우에 폴리펩티드가 자기 단백질의 형태와 충분히 유사한 형태를 채택하여 천연 자기 단백질과 교차 반응성을 가지는 항체가 생성됨을 증명함에 의해 증명될 수 있다. 이는 ELISA에서 모노클로날 또는 폴리클로날 항체의 결합과 같은 면역학적 기술, 또는 원편광 2색성과 같은 생리화학적 기술, 또는 X-레이 결정학과 같은 결정학 기술 또는 컴퓨터 모델링, 또는 당업자에 널리 공지된 많은 다른 방법을 사용하여 제시될 수 있다.

성공적인 설계의 추가 확인은 적절한 백신접종 방법에서 생성된 폴리펩티드를 그 자체로 투여하고 단백질에 결합할 수 있는 항체가 유발되는 지를 관찰함에 의해 달성될 수 있다. 이러한 결합은 재조합 또는 정제된 천연 단백질을 사용하는 ELISA 기술을 사용하거나, 민감성 세포 또는 조직에 대한 단백질의 효과를 조사하는 생물학적검정을 통하여 평가될 수 있다. 특히 바람직한 평가는 온전한 숙주에서 단백질의 활성에 관련하여 인과 관계를 나타내는 현상을 관찰하고, 본 발명의 방법에 의해 유발된 항체의 존재가 그 현상을 조절하는지 여부를 결정하는 것이다. 이와 같이, 본 발명의 단백질은 천연 단백질이 유도되는 종에서 천연 항원에 대해 항체를 생성시킬 수 있을 것이다.

본 발명의 폴리펩티드는, 요망되는 특성을 첨가하거나(예를 들어, 정제를 용이하게 하거나 면역원성을 증가시키는 서열 태그의 첨가), 바람직하지 않은 특성(예를 들어 수용체에서의 불필요한 작용 활성) 또는 막통과 도메인을 제거하기 위하 여, 돌연변이, 예를 들어 아미노산의 치환, 삽입, 또는 결실에 의해 추가로 변형될 수 있다. 특히, 본 발명은 구체적으로 발현을 증강시키는 GST 발현 파트너 또는 폴리히스티딘 태그와 같이 정제를 용이하게 하는 융합 파트너를 고려한다.

바람직한 구체예에서, 마우스 IL-13에 특징적인 하기 돌연변이 또는 이들의 보존적 치환을 하나 이상 가지는 인간 IL-13이 제공된다. 하기 넘버링은 E.coli의 IL-13의 시그날 서열을 가지고 발현되는 IL-13을 의미한다.

30번 위치에서 R →K

37번 위치에서 V →S

63번 위치에서 Y →F

65번 위치에서 A →V

68번 위치에서 E →D

80번 위치에서 E →Y

81번 위치에서 K →R

85번 위치에서 M →I

87번 위치에서 G →H

113번 위치에서 Q →H

115번 위치에서 V →I

117번 위치에서 D →K

보다 바람직하게는 인간 IL-13은 2개 이상, 바람직하게는 적어도 3, 4, 5, 6개 또는 그 이상의 돌연변이 또는 이들의 보존적 치환을 포함한다. 12개 돌연변이 가 모두 존재하는 것이 바람직하다.

'보존적 치환'은 하나의 아미노산이 유사한 특성을 가지는 다른 아미노산으로 치환되어 펩티드 화학 분야의 당업자가 폴리펩티드의 2차 구조 및 수치 특성이 실질적으로 변화하지 않을 것임을 기대할 수 있는 것을 의미한다.

예를 들어, 특정 아미노산은 단백질 구조에서, 예를 들어 항체의 항원 결합 영역 또는 기질 분자의 결합 영역과 같은 구조와의 상호적인 결합 능력의 상당한 손실 없이 다른 아미노산으로 치환될 수 있다. 단백질의 생물학적 작용 활성을 규정하는 것은 단백질의 규정하는 것은 단백질의 상호적인 능력 및 특성이기 때문에, 특정 아미노산 서열 치환은 단백질 서열 및 물론, 그 기초가 되는 DNA 코딩 서열에서 이루어질 수 있고, 그럼에도 불구하고 유사 특성을 가지는 단백질이 수득된다. 따라서, 생물학적 유용성 또는 활성의 상당한 손실 없이 개시된 조성물의 펩디드 서열 또는 상기 팹티드를 엔코딩하는 대응하는 DNA 서열에 다양한 변경이 이루어질 수 있다.

이러한 변경을 수행하기 위하여, 아미노산의 하이드로패틱 인덱스(hydropathic index)가 고려될 수 있다. 단백질에 상호작용성 생물학적 기능을 부여하는데 있어서 아미노산 하이드로패틱 인덱스의 중요성은 당분야에서 일반적으로 이해된다 (참조: Kyte and Doolittle, 1982, 참조로 본원에 통합됨). 아미노산의 상대적인 하이드로패티 (hydropathy) 특성은 생성된 단백질의 2차 구조에 기여하고, 이는 다시 단백질과 다른 분자 예를 들어 효소, 기질, 수용체, DNA, 항체, 항원 등과의 상호작용을 규정한다. 각 아미노산의 하이드로패틱 인덱스가 이 의 소수성과 전하 특성에 기초하여 결정된 바 있다(참조: Kyte and Doolittle, 1982). 이러한 값은 하기와 같다: 이소루신(+4.5), 발린(+4.2), 루신(+3.8), 페닐알라닌(+2.8); 시스테인/시스틴(+2.5); 메티오닌(+1.9), 알라닌(+1.8); 글리신(-0.4); 트레오닌(-0.7); 세린(-0.8); 트립토판(-0.9); 티로신(-1.3); 프롤린(-1.6); 히스티딘(-3.2); 글루타메이트(-3.5); 글루타민(-3.5); 아스파르테이트(-3.5); 아스파라긴(-3.5); 라이신(-3.9); 및 아르기닌(-4.5).

특정 아미노산이 유사한 하이드로패틱 인덱스 또는 수치를 가지는 다른 아미노산에 의해 치환될 수 있고, 이것이 여전히 유사한 생물학적 활성을 가지는 단백질을 생성한다는 것, 예를 들어, 여전히 생물학적 기능상으로 등가인 단백질을 생성한다는 것은 당 분야에 공지되어 있다. 이러한 변경을 가하기 위하여, 하이드로패틱 인덱스가 ±2 이내인 아미노산의 치환이 바람직하고, 하이드로패틱 인덱스가 ±1 이내인 아미노산의 치환이 특히 바람직하고, 하이드로패틱 인덱스가 ±0.5 이내인 아미노산의 치환이 보다 특히 바람직하다. 또한, 유사 아미노산의 치환이 친수성에 기초하여 효과적으로 수행될 수 있다는 것이 당 분야에서 이해된다. 미국 특허 제 4,554,101호(이의 내용 전체가 본원에 구체적으로 참고로 통합됨)는 인접한 아미노산의 친수성에 의해 결정되는 단백질의 최대 국소적인 친수성도의 평균값이 단백질의 생물학적 특성과 상관관계를 가진다는 것을 기술하고 있다.

미국 특허 제 4,554,101호에 상세히 기술된 바와 같이, 하기와 같은 친수성도가 아미노산 잔기에 할당된 바 있다: 아르기닌(+3.0); 라이신(+3.0); 아스파르테이트(+3.0±1); 글루타메이트(+3.0±1); 세린(+0.3); 아스파라긴(+0.2); 글루타민(+0.2); 글리신(0); 트레오닌(-0.4); 프롤린(-0.5±1), 알라닌(-0.5); 히스티딘(-0.5); 시스테인(-1.0); 메티오닌(-1.3); 발린(-1.5); 루신(-1.8); 이소루신(-1.8); 티로신(-2.3); 페닐알라닌(-2.5); 트립토판(-3.4). 아미노산이 유사한 친수성도를 가지는 다른 아미노산으로 치환될 수 있고 여전히 생물학적으로 등가이라는 것, 특히 면역학적으로 등가인 단백질이라는 것은 당 분야에 널리 공지되어 있다. 이러한 변경에서, 친수성도가 ±2 이내인 아미노산의 치환이 바람직하고, 친수성도가 ±1 이내인 아미노산의 치환이 특히 바람직하고, 친수성도가 ±0.5 이내인 아미노산의 치환이 보다 특히 바람직하다.

따라서, 상기 개괄된 바와 같이, 아미노산 치환은 일반적으로 아미노산 측쇄 치환체의 상대적인 유사도, 예를 들어 소수성, 친수성, 전하, 크기 등에 기초한다. 다양한 상기 특성을 고려하는 치환의 예는 당업자에게 널리 공지되어 있고, 이는 하기를 포함한다: 아르기닌 및 라이신; 글루타메이트 및 아스파르테이트; 세린 및 트레오닌; 글루타민 및 아스파라긴; 및 발린, 루신, 및 이소루신. 이들은 바람직한 보존적 치환이다.

아미노산 치환은 또한 잔기의 극성, 전하, 용해도, 소수성, 친수성 및/또는 양쪽성 특성의 유사성에 기초하여 이루어질 수 있다. 예를 들어, 음전하를 띤 아미노산은 아스파르트산 및 글루타민산을 포함하고; 양전하를 띤 아미노산은 라이

신 및 아르기닌을 포함하고; 유사한 친수성을 가지는, 전하를 띠지 않은 극성 헤드 기를 가지는 아미노산은 루신, 이소루신, 및 발린; 글리신 및 알라닌; 아스파라긴 및 글루타민; 및 세린, 트레오닌, 페닐알라닌 및 티로신을 포함한다. 보존적 변경을 나타낼 수 있는 아미노산의 다른 군은 (1) 알라닌, 프롤린, 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 세린, 트레오닌; (2) 시스테인, 세린, 티로신, 트레오닌; (3) 발린, 이소루신, 루신, 메티오닌, 알라닌, 페닐알라닌; (3) 발린, 이소로신, 루신, 메티오닌, 알라닌, 페닐알라닌; (4) 라이신, 아르기닌, 히스티딘, 및 (5) 페닐알라닌, 티로신, 트립토판, 히스티딘을 포함한다.

바람직한 구체예에서, 본 발명의 돌연변이된 IL-13은 하나 이상의 하기 서열 또는 보존적 치환을 포함하는 이들의 변이체를 포함한다:

L K E L I E E L S N; (SEQ ID No 1)

F C V A L D S L: (SEQ ID No 2)

A I Y R T Q R I L H G; (SEQ ID No 3)

K I E V A H F I T K L L; (SEQ ID No 4).

본 발명의 폴리펩티드는 본 발명의 폴리누클레오티드에 의해 엔코딩된다. 당업자는 유전 암호를 사용하여 폴리펩티드를 엔코딩하는 폴리펩티드 서열을 용이하게 결정할 수 있을 것이다. 일단 필요한 핵산 서열이 결정되면, 실시예에 기재한대로 소망하는 서열을 갖는 폴리누클레오티드를 제조할 수 있다. 당업자라면 프라이머 및 PCR 조건과 같은 필수적인 임의의 파라미터를 용이하게 변경하여 적용할 수 있다. 또한 유전자 코드의 축중에 기인하여, 아마도 본 발명의 폴리펩티드를 엔코딩하는 하나 이상의 폴리누클레오티드가 존재할 수 있음이 당업자에게 이해될 것이다.

본 발명의 폴리누클레오티드는 통상적으로 RNA, 예를 들어 mRAN이거나 DNA, 예를 들어 게놈 DNA, cDNA 또는 합성 DNA이다. 바람직하게는 폴리누클레오티드가 DNA이다. 특히 바람직하게는 cDNA이다.

본 발명은 추가로 발현 벡터를 제공하고, 이것은 본 발명의 폴리누클레오티드를 포함하는 핵산 구성물이다. 또한, 핵산 구성물은 적절한 개시제, 프로모터, 인핸서 및 그 밖의 요소들, 예컨대 포유류 세포내에서 단백질의 발현을 가능하게 하는 데에 필요할 수 있고 이를 위해 정확한 배향으로 배치되는 폴리아데닐화 시그널을 포함할 것이다.

프로모터는 진핵 프로모터, 예를 들어 CD68 프로모터, Gal1, Gal10 또는 NMT1 프로모터, 원핵 프로모터, 예를 들어 Tac, Trc 또는 Lac, 또는 바이러스 프로모터, 예를 들어 사이토메갈로바이러스 프로모터, SV40 프로모터, 폴리헤드린 프로모터, P10 프로모터, 또는 호흡기 합포체 바이러스 LTR 프로모터일 수 있다. 프로모터가 바이러스 프로모터인 것이 바람직하다. 특히, 프로모터가, HCMV IE 유전자로부터의 엑손 1을 임의로 포함하는 사이토메갈로바이러스 즉시형 초기 프로모터인 것이 바람직하다.

전사 조절 요소는 인핸서, 예를 들어 간염 B 표면 항원 3'비번역 영역, CMV 인핸서; 인트론, 예를 들어 CD68 인트론, 또는 CMV 인트론 A, 또는 조절 영역, 예를 들어 CMV 5'비번역 영역을 포함할 수 있다.

폴리누클레오티드는 핵산 구성물 상의 프로모터에 작동적으로 결합되어, 이 구성물을 포유류 세포에 삽입시, 폴리누클레오티드가 발현되어 엔코딩되는 폴리펩티드를 생산하도록 하는 것이 바람직하다. 핵산 구성물의 주쇄는 RNA 또는 DNA일 수 있고, 예를 들어 플라스미드 DNA, 바이러스 DNA, 세균 DNA, 세균성 인공 염색체 DNA, 효모 인공 염색체 DNA, 합성 DNA일 수 있다. 또한 핵산 구성물이 인공 핵산, 예를 들어 포스포로티오에이트 RNA 또는 DNA일 수 있다. 바람직하게는 구성물이 DNA이다. 플라스미드 DNA가 특히 바람직하다.

본 발명은 추가로 본 발명의 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 이러한 세포는, 포유류 세포 또는 곤충 세포와 같이, 예를 들어 바큘로바이러스 발현 시스템을 이용하는 일시적, 또는 바람직하게는 안정한 고등 진핵 세포주, 하등 진핵 세포, 예컨대 효모, 또는 세균 세포와 같은 원핵 세포를 포함한다. 본 발명의 폴리펩티드를 엔코딩하는 벡터의 삽입에 의해 개질될 수 있는 구체적인 실례가 되는 세포는 포유류 HEK293T, CHO, HeLa, NSO 및 COS 세포를 포함한다. 바람직하게는 선택된 세포주가 안정할 뿐만 아니라, 폴리펩티드의 성숙한 글리코실화를 가능하게 하는 세포주일 것이다. 발현은 형질전환된 난모 세포에서 이루어질 수 있다. 형질전환성 인간 이외의 동물, 바람직하게는 마우스의 세포에서 본 발명의 폴리펩티드가 발현되거나, 염소, 양 및 소와 같은 거대 포유류의 밀크 (milk)로 발현될 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드를 발현시키는 형질전환된 인간 이외의 동물이 본 발명의 범위내에 포함된다. 또한 본 발명의 폴리펩티드를 제노푸스 레이비스(*Xenopus laevis*) 난모세포에서 발현시킬 수 있다.

또한, 본 발명은 약제학적으로 허용되는 담체와 임의로 조합된 본 발명의 핵산 구성물 또는 폴리펩티드를 치료적 유효량으로 포함하는 약제학적 조성물 또는 백신 조성물에 관한 것이고, 이는 바람직하게 인산염 완충 식염수(PBS), 염

수, 덱 스트로스, 물, 글리세롤, 에탄올, 리포좀 또는 이들의 조합과 같은 약제학적으로 허용되는 부형제와 조합된다. 백신 조성물은 선택적으로, 금속 비드, 바람직하게는 금 비드상에 제형화된 본 발명의 핵산 구성물을 치료적 유효량으로 포함한다. 또한 본 발명의 백신 조성물은, 예를 들어 구체화된 것, 이미퀴모드(imiquimod), 투카레졸(tucaresol) 또는 명반과 같은 애쥬번트를 포함할 수 있다.

단백질 애쥬번트 제형은 고역가 항체 반응을 유도하므로 바람직하다.

바람직하게는 애쥬번트를 본 발명과 동시에 복용하고 바람직한 구체예에서 함께 제형화한다. 본 발명에서 고려되는 애쥬번트로는 다음과 같은 것들이 있고, 이 목록이 전부를 의미하는 것은 결코 아니며 그밖의 제제를 배제하지 않는다: 합성 이미다조퀴놀린, 예컨대 이미퀴모드 [S-26308, R-837], (Harrison, et al. 'Reduction of recurrent HSV disease using imiquimod alone or combined with a glycoprotein vaccine', Vaccine 19:1820-1826,(2001)); 및 레지퀴모드(resiquimod) [S-28463, R-848], (Vasilakos, et al. 'Adjuvant activites of immune response modifier R-848; Comparison with CpG ODN', Cellular immunology 204:64-74(2000)), 항원 제시 세포 및 T-세포 표면에 구조적으로 발현되는 카르보닐 및 아민의 스키프(Schiff) 염기, 예컨대 투카레졸 (Rhodes, J, et al. 'Therapeutic potentiation of the immune system by constimulatory Schiff-base-forming drugs', Nature 377:71-75(1995)), 사이토카인, 케모카인과 공-자극 분자, Th1 유도인자, 예컨대 인터페론 감마, IL-2, IL-12, IL-15 및 IL-18, Th2 유도인자, 예컨대 IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 및 IL-13, 및 그 밖의 케모카인 및 보조-자극 유전자, 예컨대 MCP-1, MIP-1 알파, MIP-1 베타, RANTES, TCA-3, CD80, CD86 및 CD40L, 그 밖의 면역자극성 표적 리간드, 예컨대 CTLA-4 및 L-셀렉틴, 세포소멸 자극 단백질과 펩티드, 예컨대 Fas, (49), 합성 지질을 기재로 하는 애쥬번트, 예컨대 백스펙틴(vaxfectin) (Reyes et al., 'Vaxfectin enhances antigen specific antibody titres and maintains Th1 type immune responses to plasmid DNA immunization', Vaccine 19:3778-3786), 스쿠알렌, 알파-토코페롤, 폴리솔베이트 80, DOPC 및 콜레스테롤, 내독소, [LPS], 문헌[부틀러, 비.(Beutler, B.), 'Endotoxin, 'Toll-like receptor 4, and the afferent limb of innate immunity', Current Opinion in Microbiology 3:23-30(2000)]; CpG 올리고- 및 디-누클레오티드, 문헌 [사토, 와이.(Sato, Y.) 외, 'Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization', Science 273(5273):352-354(1996), 헤미, 에이치(Hemmi, H.) 외, 'A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA', Nature 408:740-745(2000)] 및 Toll 수용체를 개시하여 Th1 유도성 사이토카인을 생산하는 그밖의 가능한 리간드, 예컨대 합성 미코박테리아 지단백질, 미코박테리아 단백질 p19, 펩티도글리칸, 타이코산 및 지질 A.

우세한 Th1형 반응을 유도하는 바람직한 특정 애쥬번트로는, 예를 들어 모노포스포릴 지질 A와 같은 지질 A 유도체, 또는 바람직하게는 3-데-O-아실화 모노포스포릴 지질 A가 있다. MPL ® 애쥬번트가 코릭사 코포레이션(Corixa Corporation)으로부터 시판된다 (Seattle, WA; 참조, 미국특허 제 4,436,727호; 4,877,611호; 4,866,034호 및 4,912,094호). CpG-함유 올리고누클레오티드(CpG 디누클레오티드가 메틸화되지 않음)가 또한 우세한 Th1 반응을 유도한다. 이러한 올리고누클레오티드가 널리 공지이고, 예를 들어 WO 96/02555호, WO 99/33488호와 미국특허 제 6,008,200호 및 5,856,462호에 개시된다. 면역자극성 DNA 서열이 또한 사토(Sato) 등, *Science* 273:352, 1996에 개시된다. 또 다른 바람직한 애쥬번트는, QS21 및 QS7(Aquila Biopharmaceuticals Inc., Framingham, MA); 에신(Escin); 디기토닌(Digitonin); 또는 집소필라 또는 케노포듐 퀴노아(*Gypsophila* or *Chenopodium quinoa*) 사포닌을 포함하는, 퀼 A(Quil A)와 같은 사포닌 또는 이것의 유도체를 포함한다.

본 발명은 또한, 본 발명에 따른 단백질, 폴리누클레오티드, 벡터 또는 약제학적 조성물의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, IL-13 매개 질환, 이와 관련된 여하한 징후 또는 질환을 치료하거나 예방하는 방법을 제공한다. 약제학적 조성물의 투여는, 예를 들어 '초회-부스트(prime-boost)' 치료적 백신화 요법에 따라, 하나 이상의 개별적인 용량의 형태를 취할 수 있다. 특정 경우에 '초회(prime)' 백신화가 본 발명에 따른 폴리누클레오티드의 입자 매개성 DNA 전달을 통해 플라스미드-유래된 벡터로 혼입되는 것이 바람직할 것이고, 동일한 폴리누클레오티드 서열을 포함하는 재조합 바이러스 벡터를 투여시켜 '부스트(boost)'하거나, 애쥬번트 중의 단백질을 이용하여 자극한다. 거꾸로, 바이러스 벡터 또는 단백질 제형, 통상적으로 애쥬번트로 제형화된 단백질을 이용하여 초회감작이 이루어지고 본 발명에 따른 DNA 백신으로 자극된다.

자기-항원, 예를 들어 IL-13 매개되는 질환의 치료를 위하여, 애쥬번트가 Th1 반응의 우선적인 유도인자인 것이 바람직하다. 특히, 애쥬번트는, (WO96102555)에 기재된 것과 같은 면역자극성 CpG 올리고누클레오티드를 포함한다. 통상의 면역자극성 올리고누클레오티드는 8-100개의 염기 길이를 가질 것이고, 일반식 X_1CpGX_2를 포함하며, 식 중에서 X_1과 X_2는 누클레오티드 염기이고, C와 G는 메틸화되지 않는다.

본 발명의 애쥬번트 또는 백신에 사용되는 바람직한 올리고누클레오티드는, 바람직하게는 셋 이상, 보다 바람직하게는 6개 이상의 누클레오티드에 의해 단리되는 둘 이상의 디누클레오티드 CpG 모티프를 함유하는 것이 바람직하다. 본 발명의 올리고누클레오티드는 통상적으로 데옥시누틀레오티드이다. 바람직한 구체예에서, 포스포로디에스테르 및 그밖의 인터누클레오티드 결합이, 혼합된 인터누클레오티드 결합, 예컨대 혼합된 포스포로티오에이트/포스포디에스테르를 갖는 올리고누클레오티드를 포함하는 본 발명의 범위내에 있을지라도, 올리고누클레오티드의 인터누클레오

티드는 포스포로디티오에이트이거나, 보다 바람직하게는 포스포로티오에이트 결합이다. 올리고누클레오티드를 안정화시키는 그밖의 인터누클레오티드 결합이 이용될 수 있다. 포스포로티오에이트 올리고누클레오티드 또는 포스포로디티오에이트의 제조 방법이 미국특허 제 5,666,153호, 미국특허 제 5,278,302호 및 WO 95/26204호에 기술되어 있다.

바람직한 올리고누클레오티드의 예는 다음 서열을 갖는다. 이러한 서열은 바람직하게는 포스포로티오에이트 개질된 누클레오티드간 결합을 함유한다.

올리고 **1: TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT (CpG 1826) (SEQ ID NO 5)**
올리고 **2: TCT CCC AGC GTG CGC CAT (CpG 1758) (SEQ ID NO 6)**
올리고 **3: ACC GAT GAC GTC GCC GGT GAC GGC ACC ACG (SEQ ID NO 7)**
올리고 **4: TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT (CpG 2006) (SEQ ID NO 8)**
올리고 **5: TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT (CpG 1668) (SEQ ID NO 9)**

또 다른 CpG 올리고누클레오티드는 이에 불연속 결실 또는 첨가를 지니는 바람직한 서열을 포함할 수 있다. 본 발명에서 사용되는 CpG 올리고누클레오티드는 본 기술 분야에서 공지된 어떠한 방법(예, EP468520)에 의해서 합성될 수 있다. 용이하게는, 그러한 올리고누클레오티드는 자동화 합성기를 사용함으로써 합성될 수 있다. CpG 올리고누클레오티드를 함유하는 애쥬번트 제형으로 상품명 '이뮨이지(ImmunEasy)'로 시판중인 애쥬번트 제형을 키아진(Qiagen)으로부터 구매할 수 있다.

본 발명의 조성물은 예방 및 치료용으로 사용할 수 있다. 본 발명은 약물로 사용하기 위한 본 발명에 따른 폴리펩티드 또는 폴리누클레오티드를 제공한다. 본 발명은 또한 알레르기, 호흡기 질환, 예컨대, 천식 및 COPD, 기생충 감염 관련된 병, 섬유증 또는 간경변의 치료를 위한 약물의 제조에서의 본 발명의 폴리펩티드 또는 폴리올리고누클레오티드의 용도를 제공한다.

본 발명은 또한 유효량의 본 발명의 백신 조성물을 환자에게 투여하고 백신 조성물에 대한 면역 반응을 유발시킴을 포함하는 백식접종 방법을 제공한다.

본 발명은 또한 알레르기, 호흡기 질환, 기생충 감염 관련된 병, 섬유증 및 간경변과 같은 IL-13 매개된 병에 대하여 포유 동물의 백신접종에 사용하기 위한 본원에 기재된 백신 조성물을 제공한다. 호흡기 질환에는, 예를 들어, 천식, 예컨대, 알레르기성 천식, 및 만성 폐쇄성 폐질환(COPD)이 포함된다. 특히, IL-13에 대한 중화반응을 유도할 수 있는 백신 조성물은 따라서 인간의 천식, 특히, 알레르기성 천식의 치료에 유용할 수 있다. 이러한 백신 조성물은 또한 특정의 기생충 감염 관련된 병[문헌: Brombacher, 2000 *Bioessays* 22:646-656] 및 IL-13 생성이 섬유증과 관련되는 질환[문헌: Chiaramonte et al, 1999, *J Clin Inv* 104:777-785], 예컨대, 만성 폐쇄성 폐질환(COPD) 및 간경화증의 치료에 사용될 수 있다.

본 발명의 백신 조성물은 다양한 방법, 예를 들어, 경구 및 비내 투여와 같은 점막내 투여; 폐내, 근육내, 피하 또는 진피내 경로로 투여될 수 있다. 항원이 단백질 기재 백신으로서 투여되어야 하는 경우, 백신은 전형적으로는 애쥬번트와 함께 제형될 것이며, 사용전에 주사용 물에 제현탁될 것이다. 그러한 조성물은 주사용 조성물로서, 예를 들어, 무균의 수성 분산액, 바람직하게는 등장액으로서 대상자에게 투여될 수 있다. 전형적으로는, 그러한 조성물은 점막내로 투여될 수 있지만, 다른 투여 경로도 가능하다.

피내 투여를 위한 한 가지 기술은 입자충격투여법('유전자 건(gene gun)' 기술로 공지되어 있으며, 미국특허 제5371015호에 기재되어 있다)을 포함한다. 단백질은 당과 함께 제형되어 작은 입자를 형성하거나, 항원을 엔코딩하는 DNA가 불활성 입자(예컨대, 금 비드)상에 피복될 수 있고, 이들이 수용자의 표면(예, 피부)를 통과하기에, 예를 들어, 돌출 장치로부터 고압하에 작동하는 배출수단에 의해서 통과하기에 충분한 속도로 가속된다. (본 발명의 핵산 백신 구성물로 피복된 입자 및 단백질 당 입자는 본 발명의 범위내에 있으며, 그러한 입자가 로딩된 장치도 본 발명의 범위내에 있는 것이다). 핵산 입자 구성물 또는 그러한 구성물을 함유하는 조성물을 수용자에게 집적 투여하는 다른 방법은 초음파, 전기 자극, 일렉트로포레이션 및 미국특허 제5,697,901호에 기재되어 있는 마이크로씨딩(microseeding)을 포함한다.

본 발명의 핵산 구성물은 또한 유전자 치료에 유용한 특수 전달 벡터 수단에 의해서 투여될 수 있다. 유전자 치료방법은, 예를 들어, 문헌[Verme et al., Nature 1997, 389:239-242]에 기재되어 있다. 바이러스 및 비-바이러스 시스템 둘 모두가 사용될 수 있다. 바이러스 기재 시스템에는 레트로바이러스 기재 시스템, 렌티바이러스 기재 시스템, 아데노바이러스 기재 시스템, 아데노-관련 바이러스 기재 시스템, 헤르페스 바이러스 기재 시스템 및 백시니아-바이러스 기재 시스템이 포함된다. 비-바이러스 기재 시스템에는 핵산의 직접 투여 및 리포좀 기재 시스템이 포함된다. 예를 들어, 벡터는 리포좀에 의해서 캡슐화되거나, 폴리락티드 코-글리콜리드 (PLG) 입자내에 캡슐화될 수 있다.

본 발명의 핵산 구성물은 또한 형질전환된 숙주 세포 수단에 의해서 투여될 수 있다. 그러한 세포에는 대상으로부터 수거된 세포가 포함된다. 핵산 백신 구성물은 시험관내에서 수거된 세포내로 도입되고, 형질 전환된 세포가 후에 대상에게 도입될 수 있다. 본 발명의 핵산 구성물은 상동 재조합 방법에 의해서 세포에 존재하는 핵산내로 통합될 수 있다. 형질 전환된 세포는, 요구되는 경우, 시험관내에서 성장할 수 있고, 그 결과 생성된 하나 이상의 세포가 본 발명에 사용될 수 있다. 세포는 공지된 수술 방법 또는 미세수술 방법(예, 이식, 미세주입 등)에 의해서 환자의 적절한 부위에 제공될 수 있다. 적합한 세포에는 수지상 세포가 포함된다.

전달되는 백신 조성물의 양은 면역되는 포유류의 종 및 체중, 처리/예방되는 질환 상태, 채택된 백신접종 프로토콜 (즉, 단일 투여 대 반복 투여), 투여 경로, 및 선택된 애쥬번트 화합물의 효능 및 용량에 따라서 아주 다양할 수 있다. 이러한 다양성을 근거로 하여, 의사 또는 수의사는 적절한 용량 수준을 결정할 수 있을 것이며, 예를 들어, 백신이 핵산인 경우, 용량은 0.5 내지 5μg/kg의 핵산 구성물 또는 이를 함유하는 조성물일 수 있다. 특히, 용량은 투여 경로에 따라서 다양할 수 있다. 예를 들어, 금 비드상의 진피내 투여를 이용하는 경우, 전체 용량은 바람직하게는 1μg 내지 10ng일 것이며, 특히 바람직하게는, 전체 용량은 10μg 내지 1ng일 것이다. 핵산 구성물이 직접적으로 투여되는 경우에, 전체 용량은 일반적으로 더 많은데, 예를 들어, 50μg 내지 1mg 또는 그 이상이다. 상기 용량은 평균적인 경우의 예시이다.

단백질 백신에서, 각각의 백신 용량형 내의 단백질의 양은 전형적인 백신에서의 상당한 역효과 없이 면역 보호 반응을 유도하는 양으로 선택된다. 그러한 양은 어떠한 면역원이 사용되며 어떻게 존재하느냐에 따라서 다양할 것이다. 일반적으로, 각각의 용량은 1 내지 1000μg의 단백질, 바람직하게는 1 내지 500μg, 더욱 바람직하게는 1 내지 100μg, 가장 바람직하게는 1 내지 50μg을 포함하는 것이 예상된다. 특정의 백신에 대한 최적의 양은 접종되는 대상에서의 적절한 면역 반응의 관찰을 포함한 표준 연구에 의해서 확인될 수 있다. 초기 접종 후에, 대상은 충분한 간격으로 1회 또는 수 회의 부스터 면역을 받을 수 있다. 그러한 백신 제형은 초회 접종 요법용 또는 부스터 접종 요법용일 수 있으며; 예들 들어, 경피, 피하 또는 근내 경로를 통해서 전신 투여되거나, 예를 들어, 비내 또는 경구 경로를 통해서 점막 표면으로 적용될 수 있다.

물론, 보다 높거나 낮은 용량 범위가 유리한 개개의 경우가 있을 수 있으며, 그러한 경우도 본 발명의 범위내에 있는 것이다.

백신 조성물은 일회 기준으로 투여되거나, 예를 들어, 약 1 일 내지 약 18 개월 동안, 바람직하게는 한달 동안, 반복적으로, 예를 들어, 1 내지 7회, 바람직하게는 1 내지 4회 투여될 수 있다. 이러한 투여는 임의로 환자의 잔류 수명동안 1 내지 12 개월의 규칙적인 간격으로 계속 투여될 수 있다. 한 가지 양태로서, 환자는 초회 부스터 접종에서 상이한 형태의 항원이 접종될 것이다. 예를 들어, 항원이 DNA 기재 백신으로서 먼저 투여되고, 이어서, 단백질 애쥬번트 기본 제형으로서 투여될 것이다. 그러나, 다시 한번 더 설명하면, 이러한 치료 요법은 관련되는 동물의 크기 및 종, 핵산 백신의 양 및/또는 투여되는 단백질 조성물, 투여 경로, 사용된 어떠한 애쥬번트 화합물의 효능 및 양, 숙련된 수의사 또는 의사에게는 자명할 수 있는 어떠한 그 밖의 인자에 따라 다양할 것이다.

하기 실시예는 인간이 아닌 마우스에서의 본 발명의 이론을 예시하는 것으로, 단백질은 인간 단백질 특성의 돌연변이를 지닌 뮤린이지만, 결과는 단백질이 마우스 특징의 돌연변이를 지닌 인간으로부터의 B 세포 에피토프, 또는 다른 유사 한 단백질을 지니는 인간의 치료를 용이하게 예측할 수 있도록 예시하고 있다.

본 발명의 하기 실시예 전반에 걸쳐서, 분자 및 세포 생물학에서의 광범위하게 다양한 공지 및 실시 기술이 이용되고 있다. 이들에 대한 실질적인 상세한 사항은 문헌[Sambrook et al., 1989, 2 nd edition. Cold Spring Harbor Press: New York]을 포함한 많은 교재에서 알 수 있다. 아미노산 서열 또는 표시는 단일문자 코드 또는 3문자 코드로 주어질 수 있다. 두문자 'h'는 인간으로부터의 단백질 또는 유전자를 의미하며, 'm'은 뮤린으로부터의 단백질 또는 유전자를 의미하고, 'c'는 키메라 구성물을 의미한다. 'r'은 재조합 단백질을 나타내는 것으로 사용된다.

실시예

1. 뮤린 IL-13에 대한 백신의 설계

IL-13은 SCOP[문헌: Murzin et al., 1995, *J Mol Biol* 247:536-540] 정의된 4중 나선 사이토카인 폴드 패밀리에 속한다. 이러한 폴드 수퍼패밀리의 각각의 구성원은 구조적으로 관련되어 있지만, 서열 수준에서 정렬하는 것은 어렵다. IL-13의 3D 구조는 아직 결정되지 않았지만, 많은 다른 4중 나선 사이토카인에 대한 구조가 결정되었다. IL-13 오르톨로그(orthologue)에 대한 단백질 다중 서열 정렬을 결정하고, 또한 하나 이상의 구성원의 구조가 결정(IL-4, GM-CSF, IL-5 및 IL-2)된 상기 폴드를 나타내는 많은 다른 사이토카인에 대한 단백질 다중 서열 정렬을 결정하였다. 2차 구조 예측은 DSC[문헌: King and Sternberg, 1996, *Prot Sci* 5:2298-2310], SIMPA96[문헌: Levin, 1997, *Prot Eng* 7:771-776] 및 Pred2ary[문 헌: Chandonia and Karplus, 1995, *Prot Sci* 4:275-285]를 사용하여 IL-13

단백질 다중 서열 정렬에 대해서 수행하였다. 개개의 사이토카인 단백질 다중 서열 정렬을 서로에 대해서 배열하는데, 서열 정보 및 구조 정보(공지된 결정 구조 및 2 차 구조 예측으로부터)를 사용하여 배열하였다.

항원성 부위, 특히, B-세포 에피토프를 뮤린 IL-13에 대해서 카멜레온 소프트웨어(Cameleon software: Oxford Molecular)를 사용하여 예측하고, 이들을 IL-4상에 단백질 다중 서열 정렬법을 이용하여 지도화하여 이들이 IL-13상에 구조적으로 위치할 수 있다는 아이디어를 얻었다. 이러한 검정으로부터, 잠재적으로 항원성을 나타내며 수용체 결합에 관여했던 노출 영역이 선택되었다.

이 모델로부터, 키메라 IL-13 서열이 설계되는데, 여기서 예측된 항원성 루프의 서열이 뮤린 IL-13으로부터 수득되며, 이러한 예측된 구조(주로 나선형) 영역의 서열은 인간 IL-13으로부터 수득되었다. 이렇게 설계하는 목적은, 중화 항체가 생성될 수 있는 가능성에 대해 뮤린 IL-13으로부터의 표적 에피토프를 확인하기 위한 것이며, 천연 단백질과 구조적으로 유사함에도 불구하고, 하나 이상의 CD4 T 헬퍼 에피토프가 존재하도록 천연(뮤린) 단백질에 대한 충분한 서열 변형을 함유하고 있는 프레임워크 상에서 이들을 존재하도록 하기 위한 것이다. 키메라 IL-13 백신의 이러한 실시예에 대해 선택된 핵산 및 단백질 서열이 도 1에 도시되어 있다(SEQ ID NO 19 및 20). 밑줄그어진 서열은 인간 오르톨로그에서 확인된 서열에 상응한다. 12개의 아미노산이 도 1에서의 서열을 달성하도록 치환되었다. 유전자 코드의 축중에 의해 다수의 가능한 핵산 서열이 동일한 단백질을 엔코딩할 수 있다는 것이 이해되어야 한다. 또한, 본 발명의 범주 내에서 노출되지 않은 영역에서 그 밖의 오르톨로그 변이를 지니는 그 밖의 가능한 키메라 IL-13 백신 설계가 존재함도 이해될 것이다.

1.2 키메라 IL-13의 제조

키메라 IL-13(cIL-13) DNA 서열이 일련의 부분적으로 중첩된 DNA 올리고누클레오티드로부터 합성되었으며, 서열 cIL-13-1 내지 cIL-13-6이 표 1에 표시되어 있다. 이러한 올리고는 어닐링되고, PCR에 의해 cIL13 DNA를 형성시켰는데, 이때 사이클의 사양은 94℃에서 1분 동안에 이어서 94℃에서 30초 동안 25 사이클, 55℃에서 1분 동안 그리고 72℃에서 2분 동안이었다. 72℃에서 7분 동안 수행한 후, 완료된 경우에 4℃로 냉각시켰다. 상기 반응 생성물은 예측된 크기, 361개의 염기쌍의 밴드를 포함하며, 이것은 T/A 클로닝 벡터 pCR2.1(네덜란드, 그로닌겐에 소재한 인비트로겐 제품)로 서브클로닝되어 pCR2.1-cIL-13을 형성하였다. 이후, pCR2.1-cIL-13으로부터의 BamH1 및 Xho1 cIL-13의 분해된 단편이, pGEX4T3-cIL-13/1을 형성하는 pGEX4T3(영국 벅스 아머샴에 소재한 아머샴 파마시아 제품)에서 BamH1 및 Xho1 부위로 서브클로닝되었다. pGEX4T3-cIL-13/1 구성물을 시퀀싱하는 경우에, 본 발명자들은 GST와 CIL-13에 대한 서열 사이에서 (pCR2.1 벡터로부터 유래한) DNA 서열의 여분의 39개의 염기쌍을 발견하였다. 이를 교정하기 위해, 본 발명자들은 pGEX4T3-cIL-13/1을 사용하는 cIL-13, 프라이머 CIL-13Fnew 및 cIL-13R에 대해 PCR을 반복하였다. 이후, 수득된 PCR 생성물이 BamH1 및 Xho1 제한 부위를 사용하여 pGEX4T3 내로 역으로 클로닝되어, 발현 벡터 pGEX4T3-cIL-13을 형성시켰다. 이러한 구성물의 서열을 디데옥시 터미네이터 시퀀싱에 의해 확인하였다. 이 벡터는 글루타티온-S-트랜스퍼라제 및 cIL-13(GST-cIL-13)으로 구성되는 유전자 융합 단백질을 엔코딩한다. 단백질의 2개 부분이 트롬빈에 대한 인지 부위를 함유하는 짧은 스페이서에 의해 연결된다. 이러한 융합 단백질은 글루타티온 세파로오스 친화도 크로마토그래피에 의해 용이하게 정제된 후, 직접 사용되거나, 유리 cIL-13의 제제가 트롬빈을 사용한 절단에 의해 생성될 수 있다.

표 1. 키메라 IL-13을 구성하는데 사용된 올리고누클레오티드

올리고	서열 (5'-3')
cIL-13-1R (SEQ ID NO 10)	TGTGATGTTGACCAGCTCCTCAATGAGCTCCCTAAGGG TCAGAGGGAGAGACACAGATCTTGGCACCGGCCC
cIL-13-2F (SEQ ID NO 11)	AGGAGCTGGTCAACATCACACAAGACCAGACTCCCCT GTGCAACGGCAGCATGGTATGGAGTGTGGACCTGGC
cIL-13-3R (SEQ ID NO 12)	GCAATTGGAGATGTTGGTCAGGGATTCCAGGGCTGCA CAGTACCCGCCAGCGGCCAGGTCCACACTCCATAC
cIL-13-4F (SEQ ID NO 13)	TGACCAACATCTCCAATTGCAATGCCATCGAGAAGACC CAGAGGATGCTGGGCGGACTCTGTAACCGCAAGGC
cIL-13-5R (SEQ ID NO 14)	AAACTGGGCCACCTCGATTTTGGTATCGGGGAGGCTG GAGACCGTAGTGGGGGCCTTGCGGTTACAGAGTCC
cIL-13-6F (SEQ ID NO 15)	AAATCGAGGTGGCCCAGTTTGTAAAGGACCTGCTCAG CTACACAAAGCAACTGTTTCGCCACGGCCCCTTC
cIL-13F (SEQ ID NO 16)	CGCGGATTCGGGCCGGTGCCAAGATCTG
cIL-13R (SEQ ID NO 17)	CTCCGCTCGAGTCGACTTAGAAGGGGCCGTGGCGAAA
cIL-13Fnew (SEQ ID NO 18)	CGCGGATCCGGGCCGGTGCCAAGATCTG

pGEX4T3-cIL-13 발현 벡터를 E. coli BLR주(영국 캠브리지에 소재한 캠브리 지 바이오사이언스에 의해 공급된 노바겐)로 형질전환시켰다. 0.5 mM의 IPTG를 37℃에서 4시간 동안 대수 증식기 중에 있는 배양물에 첨가시킴으로써, GST-cIL-13의 발현을 유도하였다. 이후, 원심분리시켜 이 박테리아를 수집하고, 이들로부터 유사한 GST-인간 IL-13 융합 단백질(참조: McKenzie et al, 1993, Proc Natn Acad Sci 90:3735-3739)의 정제에 대해 상기 기술된 방법에 의해 GST-cIL-13을 정제하였다.

cIL-13 특성의 특징화

정제된 GST-cIL-13의 샘플을 SDS-PAGE 전기영동에 의해 검정하였다. 도 2로부터, 정제된 단백질이 GST-cIL-13에 대해 예측된 크기의 단백질을 함유한다는 것을 알 수 있다. 낮은 밴드는 소량의 GST를 나타내는데, 이는 제조 동안의 융합 단백질의 부분적인 분리에 의해 유발된다.

정제된 단백질이 GST-cIL-13이라는 사실을 확인하기 위해, 샘플을 SDS-PAGE에 의해 분리시키고, 이를 PVDF 막상으로 블로팅시킨 후에, 웨스턴 블로팅법으로 IL-13 및 GST 면역활성의 존재에 대해 검정하였다. cIL-13이 인간 및 뮤린 IL-13 모두로부터 유발된 서열을 함유하고 있기 때문에, 인간 IL-13 또는 마우스 IL-13에서 지정된 특이적인 항혈청에 의해 인지될 것이라는 것이 예측되었다. 블롯을, 0.05%의 Tween-20(TBST)를 함유하는 TBS(50mM의 트리즈마 히드로클로라이드, 138mM의 염화나트륨, 2.7mM의 염화칼륨, pH 8.0) 중의 3%의 우태아 혈청 알부민(BSA)을 사용하여 4℃에서 하룻밤 동안 블록킹시키고, 실온에서 1시간 동안 1차 항체를 흔들어주면서 인큐베이팅시키고 나서 TBST로 4회 세척시켰다. 2차 항체를 진탕시키 면서 실온에서 1시간 동안 첨가한 후, 4회 세척하고, 수퍼시그날 화학발광 시약 (SuperSignal Chemiluminescent Reagent) (Pierce, Rockfor, Illinois, USA)을 사용하여 발색시켰다.

도 3 (하기 범례)은 이러한 분석의 결과를 보여주는데, 이는 정제된 단백질이 인간 IL-13, 마우스 IL-13 및 GST에 대한 항체에 의해 인지됨을 나타내며, 이로써 예측된 구조를 확인시켜 준다.

레인	샘플	1차 항체
1	GST-cIL-13	항-mIL-13
2	rhIL-13	항-mIL-13
3	rmIL-13	항-mIL-13
4	마커	
5	GST-cIL-13	항-hIL-13
6	rhIL-13	항-hIL-13
7	rmIL-13	항-hIL-13
8	마커	-
9	GST-cIL-13	항-GST
10	rhIL-13	항-GST
11	rmIL-13	항-GST
12	GST	항-GST

본 실험에 사용된 1차 항체는 다음과 같다: anti-hIL-13 [카탈로그 넘버 AF-213-NA, 영국 옥스포드 아빙돈에 소재한 알 amp; 디 시스템스 제품, 사용량 1μg/㎖)]; anti-mIL-13 [카탈로그 넘버 AF-413-NA, 알 amp; 디 시스템스 제품, 사용량 1μg/㎖)]; 및 anti-GST [카탈로그 넘버 27-4590D, 파마시아 제품, 사용량 1/200]. 본 실험에 사용된 2차 항체는 다음과 같다: HRP-컨쥬게이트된 항염소 IgG [카탈로그 넘버 A-5420, 영국 도르셋 풀리에 소재한 시그마-알드리치 컴퍼니 리미티드 제품, 사용량 1/40,000].

상기 단백질 샘플은 실시예 2에 기술된 바와 같이 제조된 GST-cIL-13; 재조합 인간 IL-13(rhIL-13) [카달로그 넘버 CH1-013, 영국 캠브리지에 소재한 캠브리지 바이오사이언스 제품]; 재조합 마우스 IL-13(rmIL-13) [카달로그 넘버 413-ML-025, 알 amp; 디 시스템스 제품]; 및 상기한 바와 같은 (참조: Sambrook et al, 1989, 2 nd edition, Cold Spring Harbor Press: New York) 빈 pGEX4T3 벡터로 형질전환된 E. coli로부터 제조된 GST이었다.

1.3 키메라 IL-13의 확인

GST-cIL-13이 용액중에서 천연 IL-13의 입체형태와 유사한 입체형태을 취하고 있음을 확인하기 위해서, (트롬빈 절단에 의해 GST-cIL-13으로부터 형성된) GST-cIL-13 및 cIL-13의 샘플을 ELISA로 검정하였다. 96웰의 맥시소프 (Maxisorp) 플레이트 [영국 페이즐리에 소재한 라이프 테크놀로지 리미티드 제품]를 cIL-13, GST-cIL-13, mIL-13, hIL-13 또는 탄산염-중탄산염 완충액 중의 GST로 4℃에서 하룻밤 동안 코팅시켰다. 이후, 이 플레이트를 RT에서 1시간 동안 3%의 BSA/TBST를 사용하여 블록킹시키고, TBST 중에서 3회 세척한 후, 실온에서 1시간 동안 1차 항체를 인큐베이팅시키고 나서 TBST 중에서 3회 세척하였다. 2차 항체를 1시간 동안 첨가시키고, TBST 중에서 3회 세척한 다음, 0-페닐렌디아민 디히드로클로라이드 퍼 록시다아제 기질(OPD, 시그마 알드리치 제품)을 사용하여 30분 동안 현상시켰다. 이 실험에 사용된 1차 및 2차 항체는 상기한 바와 같다. 도 4에 도시된 바와 같이, GST-cIL-3 및 cIL-13을 인간 IL-13 및 마우스 IL-13에 대한 항체에 의해 특이적으로 인지하였다. 이러한 데이터로부터, 키메라형성 처리가 단백질 입체형태를 조잡하게 변경시키지 않는다는 사실을 확인하였다.

1.4 수용체에 대한 키메라 IL-13의 결합

cIL-13이 공지된 마우스 IL-13 수용체(mIL-13R1 또는 mIL-13R2)중 어느 하나에 결합할 수 있는 지를 결정하기 위해 ELISA를 설정하였다. 96웰의 맥시소프 플레이트를 탄산염-중탄산염 완충액 중의 항-인간 IgG(카달로그 넘버 I-3382, 시그마 알드리치 제품)로 4℃에서 하룻밤 동안 코팅시켰다. 이후, 플레이트를 3%의 BSA/TBST로 실온에서 1시간 동안 블록킹시키고, TBST 중에서 3회 세척시킨 다음, mIL-13R1-Fc 또는 mIL-13R2-Fc(카달로그 넘버 각각 491-IR-200 및 539-IR-100, 알 amp; 디 시스템스 제품)를 사용하여 실온에서 1시간 동안 인큐베이팅시켰다. 세척시킨 후에, 플레이트를 1시간 동안 실온에서 mIL-13 또는 cIL-13 또는 GST-cIL-13을 희석시켜 인큐베이팅시키고, 다시 비오티닐화된 anti-mIL-13(카달로그 넘버 BAF413, 알 amp; 디 시스템스 제품)과 함께 인큐베이팅시켰다. 이를 추가로 세척시키고, 스트렙트아비딘 컨쥬게이트된 양고추냉이 퍼옥시다아제와 함께 인큐베이팅시킨 후에, 상기 플레이트를 0-페닐렌디아민 디히드로클로라이드 퍼옥시다아제 기질을 사용하여 30분 동안 발색시켰다. 도 5에 표시된 바와 같이, cIL-13 및 GST-cIL-13 모두는 mIL-13 수용체중 하나에 결합될 수 있다는 것을 알 수 있다. 또한, 이들 데이터로부터 키메라형성 처리가 단백질 형태를 조잡하게 변경시키지 않는다는 사실이 확인되었다.

1.5 키메라 IL-13의 생체활성

GST-cIL-13의 생체활성은, 인간의 폐 섬유아세포주 A549에서 STAT6을 인산화시키는 이들 단백질의 능력에 의해 평가되었다. 이들 세포는 IL-4 및 IL-13 모두에 응답하는 인간 타입-2 IL-4 수용체를 발현한다. hIL-4, hIL-13 또는 mIL-13을 사용하여 이들 세포를 자극시키면, RPMI(라이프 테크놀로지 제품) 중의 60mm 조직 배양물 디쉬(라이프 테크롤로지 제품) 내로 플레이팅시키고, 70%의 합류물로 성장시킨 시그널링 단백질 STAT 6.5 $\times 10^{5}$ A549 세포의 인산화가 유도되었다. 이후, 이 세포들을 2 내지 150 ng/㎖의 사이토카인과 함께 인큐베이팅시키고, 37°C에서 15분 동안 cIL-13을 정제시켰다. GST 융합 파트너의 존재가 사이토카인의 생체활성을 변경시킬 수 있기 때문에, 키메라 IL-13을 GST-cIL-13 융합 단백질로서 검정하고, 자유 cIL-13을 트롬빈 분리에 의해 융합되지 않도록 하였다. 대조군으로서, rmIL-13 및 GST를 또한 시험하였다. 이후, 세포 용해물을 제조하고, 이를 토끼의 항-포스포-STAT6 폴리클로날 항체(영국 허츠 히츠킨에 소재한 NEB, 카달로그 넘버 9361S)를 사용하여 포스포-STAT6의 존재에 대해서 웨스턴 블롯팅법으로 검정하였다. 블롯을 5%의 BSA/TBST(BSA는 1차 항체가 포스포에 특이적인 0.1% Tween-20임에 따라, 시그마 알드리치로부터 제조된 A-7906임) 중에서 하룻밤 동안 블록킹시키고, 1차 항체를 1시간 동안 실온에서 1/1000에서 첨가한 다음, TBST로 3회 세척하 였다. 항-토끼 HRP 컨쥬게이트된 2차 항체(A-4914, 시그마 알드리치 제품)를 1시간 동안 실온에서 1/5000에서 첨가하고, TBST로 4회 세척한 다음, HRP 화학발광성 기질 ECL 시약(아머샴 파마시아 제품)을 사용하여 현상시켰다. 이 실험의 결과가 도 6에 표시되어 있다.

각 레인을 하기 단백질로 로딩하였다:

레인	처리된 A549 세포 용해물

1	50ng/ml rmIL-13 (R&D Systems)
2	10ng/ml rmIL-13 (R&D Systems)
3	2ng/ml rmIL-13 (R&D Systems)
4	50ng/ml cIL-13
5	10ng/ml cIL-13
6	2ng/ml cIL-13
7	150ng/ml GST-cIL-13
8	30ng/ml GST-cIL-13
9	6ng/ml GST-cIL-13
10	어떠한 처리도 하지 않음
11	1μg/ml GST
12	0.25μg/ml GST
13	분자량 마아커

재조합 단백질 시약으로서 도 3에 기술된 것을 사용하였다.

50 또는 10ng/㎖(그러나, 2ng/㎖는 아님)의 rmIL-13으로 A549 세포를 처리하여, 생체활성을 나타내는 STAT6의 인산화가 유도되었다. 50ng/㎖(단, 10 또는 2ng/㎖는 아님)의 cIL-13으로 A549 세포를 처리하여, 생체활성을 나타내는 STAT6의 인산화가 유도되었다. 마찬가지로, 150ng/㎖의 GST-cIL-13(이것은 몰기준으로 대 략 50ng/㎖의 cIL-13에 상당함)은 생체활성을 나타내는 반면, 30 및 6ng/㎖는 그렇지 않다. 따라서, cIL-13은 이러한 수용체에서 효능제로 작용하나, 이들 실험 조건 하에서는 mIL-13 보다 대략 5배 미만의 생체활성을 나타내었다.

1.6 cIL-13을 사용한 면역접종

그 후, cIL-13 및 GST-cIL-13을 면역원으로 사용하여 Balb/c 마우스로 마우스 IL-13에 대한 자가항체의 형성을 유도하였다. 6 내지 8주령의 암컷 마우스 꼬리의 기저부에, 프로인트 완전 애쥬번트(CFA) 중에 용해시킨 대략 30μg의 단백질을 피하 (sc) 주사하였다. 그 후, 동일 부위에서 3회의 부스터 면역접종을 수행하였고, 각각은 부스트에 대해 불완전 프로인트 애쥬번트 중의 대략 10μg 단백질로 구성된다. 각각의 처리군은 5마리의 동물을 포함하고, 이들 동물은 하기 표 2의 프로토콜에 따라 면역접종되었다.

표 2

군	면역접종
A	CFA/IFA s/c 중의 식염수 대조군
B	CFA/IFA s/c 중의 30/10μg GST
C	면역접종되지 않은 순수한 마우스
D	CFA/IFA s/c 중의 30/10μg GST-hIL-13
E	CFA/IFA s/c 중의 30/10μg cIL-13
F	CFA/IFA s/c 중의 30/10μg GST-cIL-13

일(Day)	처리
-12	사전 채혈
0	1차 면역접종
14	제 1 부스트 면역접종
27	꼬리 채혈
42	꼬리 채혈
49	제 2 부스트 면역접종
70	꼬리 채혈
97	꼬리 채혈
99	제 3 부스트 면역접종
113	꼬리 채혈
140	꼬리 채혈

혈청 샘플을 표 2에 명시된 시점에서 꼬리 정맥의 정맥 천자(venepuncture)에 의해 얻었다. 원심분리에 의해 정화시킨 후, 마우스 IL-13, 인간 IL-13 및 GST에 대한 특이적 IgG 반응의 존재에 대해 샘플을 ELISA 검정하였다. 군 A 내지 D의 동물은 어떠한 시점에서도 항-마우스 IL-13 항체를 보유하지 않았다. 군 B, D 및 F의 모든 동물들은 GST에 대해 강력한 IgG 반응을 나타내었다 (군 E의 동물들은 또한 GST에 대해 강한 항체 반응을 나타냈는데, 이는 이들 마우스를 면역접종하는데 사용된 cIL-13 샘플에 잔류하는 GST가 존재하기 때문이다). 항-마우스 IL-13 항체 반응이 군 F의 5마리 동물 중 5마리 모두에게서 유도되었고, 군 E의 5마리 동물 중 4마리에게서 유도되었다. 도 7a 및 도 7b는 군 F의 동물 중 한 마리 및 군 E (7b)의 동물중 한마리에 대한 면역학적 분석을 보여준다(각각 gst-cIL-13 및 cIL-13 면역접종됨). 이러한 결과에서는, GST-cIL-13 또는 cIL-13으로의 면역접종이 mIL-13에 대한 관용을 파괴하여 마우스 항-mIL-13 항체를 생성할 수 있음을 시사한다.

강력한 항-mIL-13 IgG 반응을 갖는 두 마리의 마우스 (F1d70 및 F5d97)로부터의 혈청을, A549/포스포-STAT6 검정에서 rmIL-13의 생체활성 중화능에 대해 시험하였다. A549 세포로 37°C에서 15분간 인큐베이션하기 전에, 20 ng/ml 또는 10ng/ml의 rmIL-13(R amp; D System)을 실온에서 15분간 혈청 비함유 RPMI 조직 배지 중의 1% 혈청과 함께 인큐베이팅시켰다. 세포 융해물을 제조하고, 앞서 기술된 바와 같이 포스포-STAT6의 존재 하에 웨스턴 블롯에 의해 분석하였다. 네가티브 대조군으로서, 항-hIL-13 혈청을 GST-hIL-13으로 면역접종된 Balb/c 마우스로부터 얻었으며, ELISA에 의해 강한 항-hIL-13 IgG 반응을 가지나, 항-mIL-13 항체는 갖지 않는 것으로 나타났다. 포지티브 대조군으로서, 정상 마우스 혈청에 중화 항-mIL-13 항체(R amp; D Systems, catalogue number AF-413-NA)를 타서 최종 농도가 1μg이 되게 하였다.

상기 실험의 결과는 도 8에 도시되어 있으며, 하기 사항이 시험되었다:

레인	사이토카인	항체
1	20ng/ml rmIL-13	정상 마우스 혈청
2	10ng/ml rmIL-13	정상 마우스 혈청

3	0ng/ml rmIL-13	정상 마우스 혈청
4	20ng/ml rmIL-13	혈청 샘플 F1d70
5	10ng/ml rmIL-13	혈청 샘플 F1d70
6	0ng/ml rmIL-13	혈청 샘플 F1d70
7	20ng/ml rmIL-13	항-hIL-13 마우스 혈청
8	10ng/ml rmIL-13	항-hIL-13 마우스 혈청
9	0ng/ml rmIL-13	항-hIL-13 마우스 혈청
10	분자량 마커	-
11	0ng/ml rmIL-13	정상 마우스 혈청 + 항-mIL-13
12	20ng/ml rmIL-13	혈청 샘플 F5d97
13	10ng/ml rmIL-13	혈청 샘플 F5d97
14	0ng/ml rmIL-13	혈청 샘플 F5d97
15	20ng/ml rmIL-13	정상 마우스 혈청 + 항-mIL-13
16	10ng/ml rmIL-13	정상 마우스 혈청 + 항-mIL-13

본 발명의 키메라 IL-13 면역원으로의 면역접종은 외적 첨가 항-뮤린 IL-13 항체(레인 15, 16)에 필적할 만한 형태로, 마우스 IL-13 항체(레인, 4, 5, 12, 13)의 생체활성을 중화시킬 수 있는, 마우스 IL-13에 대한 자가 항체의 생성을 유도한다. 이러한 활성은 정상 마우스 혈청(레인 1, 2)에서도, GST-hIL-13(레인 7, 8)으 로 면역접종된 동물로부터의 항체(레인 7, 8)에서도 존재하지 않는다.

상기 데이터는 cIL-13으로 백신처리하여 항체 활성의 외적 중화를 유도하므로써 IL-13 의존성 질병을 갖는 포유류을 치료하는 근거를 제공한다.

1.7 대안적 구조물

1.7.1 6 his 태깅된 cIL-13 디자인

박테리아에 의해 생성된 단백질인 GST-cIL-13은 불용성이고, 시험관내 가용화 및 리폴딩을 요한다. 크기 배제 크로마토그래피에서는 리폴딩 과정(refolding process)이 수개의 시차적으로 폴딩된 형태를 생성하는 것을 나타내는데, 이것은 면역 반응의 비율이 순수한 마우스 IL-13을 결합시키지 않는 무관한 항체를 생성시킬 수 있는 형태에 대해 유도되는 것임을 시사한다.

그러므로, 이러한 후보물질은 가능한 가장 유력한 중화 항 마우스 IL-13 항체 반응을 생성시키지 않을 수 있다.

이러한 이유로, 6 his-cIL-13은 포유류 발현 벡터로 클로닝되어, 포유류 발현된 6 his-cIL-13은 가용성이며, 시험관내에서 리폴딩을 요하지 않는다.

1.7.2 도 12(SEQ ID NO 23 및 24)은 상이한 유사 돌연변이가 이루어진 백신 항원을 보여준다. 서열 'GPVPR' 서열에서 글리신 잔기가 잔기 1인 도식에 따라 넘버링된 단백질 서열. 한줄로 밀줄친 서열은 보정된 구조적 모델로부터 예측된 나선 영역에 상응한다. 두줄로 밑줄그어진 진한 잔기는 돌연변이 마우스 서열에 혼입된 지점을 나타낸다.

11 마우스 Leu가 Val(래트)로 교체됨.

21 마우스 Ser이 Thr(비-오르토형)로 교체됨.

63 마우스 Thr이 Phe(비-오르토형)로 교체됨.

71 마우스 Gly가 Ala(개/돼지/소)로 교체됨.

100 마우스 Ser이 Thr(개)로 교체됨.

104 마우스 Gln이 Asn(비-오르토형)로 교체됨.

108 마우스 His가 Arg(비-오르토형)로 교체됨.

1.8 인간 치료로의 적용

도 9는 인간의 항-인간 IL-13 항체의 생성시 유도된 본 발명에 따른 어느 한 가능한 백신 항원을 도시한 것이다. 이는, 과도하거나 부적합한 IL-13에 의해 특징되는 질병, 예를 들어 천식의 치료에 유용할 것이다. 마우스 IL-13에 상응하는 서열이 밑줄그어져 있다. 상기 구조는 뮤린 IL-13에 유사한 12개의 아미노산 치환을 포함한다. 이들은 다음과 같다:

위치 30에서 R → K

위치 37에서 V → S

위치 63에서 Y → F

위치 65에서 A → V

위치 68에서 E → D

위치 80에서 E → Y

위치 81에서 K → R

위치 85에서 M → I

위치 87에서 G → H

위치 113에서 Q → H

위치 115에서 V → I

위치 117에서 D → K

도 13(SEQ ID NO 25)은 키메라 IL-4를 기초로 하는 인간용의 하나의 가능한 백신을 보여주고 있다. 이는 키메라 인간 IL-4 백신 단백질의 예이다. 밑줄그어진 아미노산 잔기는 알파-나선 구조 영역을 포함하고, 아미노산 21이 제 1 나선으로 내포된 마우스 IL-4로부터 유도된 것이다. 별다른 표시없는 기호는 인간 IL-4로부터 유도된 아미노산 잔기를 나타낸다. 알파-나선 영역의 위치는 문헌으로부터 수득하였다 [참조: Zuegg, J et al(2001) Immunol and Cell Biol 79:332-339].

실시예 2: gst-cIL-13에 대한 면역 반응은 마우스 IL-13에 특이적이며, 마우스 IL-4와는 교차 반응하지 않는다

마우스 IL-13이 마우스 IL-4와 구조적으로 유사하기 때문에, GST-cIL-13 면역접종된 마우스로부터의 혈청(고역가 항-마우스 IL-13 자가항체를 함유하는 것으로 나타난)을 항-마우스 IL-4 ELISA 및 시험관내 mIL-4 중화 생물학적 검정을 사용하여 마우스 IL-4에 대한 교차 반응성에 대해 분석하였다.

2.1 항-마우스 IL-4 ELISA.

96-웰 맥시소프 플레이트를 중탄산 나트륨 완충액중의 항-마우스 IL-4 모노클로날 항체(Cat. No. MAB404, R+D Systems)로 4°C에서 밤새 코팅하였다. 그 다음, 플레이트를 실온에서 1시간 동안 3% BSA/TBST로 블록킹시키고 TBST로 3회 세척 하고, 마우스 IL-4(Cat. No. 404-ML-005, R+D Systems)와 함께 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 세척후에, 플레이트를 실온에서 1시간 동안 마우스 혈청과 함께 인큐베이션하고, 다시 세척하고, HRP 컨쥬게이트 항-마우스 IgG 폴리클로날 항체(Cat. No. A-9309, SIGMA)와 함께 인큐베이션하였다. 추가 세척후에, 플레이트를 O-페닐렌디아민 디히드로클로라이드 퍼옥시다아제 기질로 30분 동안 발색시켰다.

혈청중의 항-마우스 IL-4 항체 수준을 종점 역가로서 표시하였다. 종점 역가는 ELISA 배경 판독의 2배와 등가인 혈청 희석도로 정의된다.

마우스	항-마우스 IL-4 항체 종점 역가	항-마우스 IL-13 항체 종점 역가
C2 (4 X GST-cIL-13 백신 투여후 125일째에 채취한 혈청 샘플)	1/900	1/80000

매우 낮은 수준의 마우스 IL-4 교차반응성이 이러한 혈청 샘플에서 검출되었다. 대조적으로, 이전에는 이러한 혈청 샘플에서 항-마우스 IL-13 항체 ELISA를 이용하여 훨씬 더 높은 항-마우스 IL-13 항체 종점 역가가 측정되었다. 이러한 ELISA에 의해 측정한 마우스 IL-4 교차반응성의 수준은 생체내에서 마우스 IL-4 중화 효과를 갖는 것으로 예측되지 않았다. 이러한 혈청 샘플을 생체내 마우스 IL-4 생물학적 검정에서 마우스 IL-4 중화능에 대하여 평가하였다.

2.2 시험관내 마우스 IL-4 중화 생물학적 검정

마우스 IL-4는 시험관내에서 CTLL 세포의 증식을 자극한다. 따라서, 이러한 세포에서 이러한 GST-clL-13 백신을 접종시킨 마우스로부터 얻은 혈청의 마우스 IL-4 중화능을 평가하기 위한 검정을 개발하였다.

마우스 CTLL 세포(Cat. No. 87031904, ECACC)상에서 재조합 마우스 IL-4의 생체활성을 중화시키는 마우스 혈청의 능력을 측정하기 위하여, 3ng/ml 재조합 마우스 IL-4를 96-웰 조직 배양 플레이트(Invitrogen)에서 1시간 동안 37℃에서 다양한 농도의 혈청과 함께 인큐베이션하였다. 이러한 예비인큐베이션 후에, CTLL 세포를 첨가하였다. 다양한 혈청 희석액, 재조합 마우스 IL-4 및 CTLL 세포를 함유하는 검정용 혼합물을 가습된 CO_2 인큐베이터에서 70시간 동안 37℃에서 인큐베이션하였다. MTT 기질(Cat. No. G4000, Promega)을 인큐베이션 마지막 4시간 동안 첨가한 후, 산용액을 가하여 반응을 정지시키고 대사된 청색 포르마겐 생성물을 용해시켰다. 각 웰의 용액의 흡광도를 570nm 파장에서 96-웰 플레이트 판독기로 판독하였다.

이러한 검정은 1/100 이상의 혈청 희석도에서 마우스 IL-4 중화능을 측정할 수 있을 뿐임에 유의하여야 한다. 1/100 미만의 혈청 희석도는 CTLL 세포에서 비특이적 증식 효과를 유도한다.

마우스 IL-4 생체활성을 중화시키는 혈청의 능력은 소정량의 마우스 IL-4의 생체활성을 50% 중화시키기 위해 필요한 혈청 희석도(= ND_{50})로 표시하였다. 혈청 샘플 희석도가 클수록, 중화능이 더 강력하다.

시험한 마우스 C2 혈청의 최고 농도는 1/100 희석도였다. 이것은 3ng/ml 마우스 IL-4의 생체활성을 50% 중화시키지 않았으므로, ND_{50} 은 < 1/100 희석도로 표시하였다.

마우스	마우스 IL-4 중화능(ND_{50})	마우스 IL-13 중화능(ND_{50})
C2 (4 X GST-cIL-13 백신 투여후 125일째에 채취한 혈청 샘플)	< 1/100	1/5300

마우스 IL-4 중화능은 이러한 혈청 샘플에서 시험한 혈청의 희석도에서 검출되지 않았다. 대조적으로(마우스 IL-13 중화능에 대하여 평가한 경우), 이러한 혈청 샘플은 마우스 IL-13 생체활성을 강력하게 중화시켰다.

이러한 데이터는 비록 항-마우스 IL-4 항체 ELISA에 의해 혈청중에서 매우 낮은 수준의 마우스 IL-4 교차반응성이 측정될 수 있을지라도 마우스 IL-4 중화능의 관련은 없음을 입증한다.

2.3 마우스 혈청 샘플의 마우스 IL-13 중화능을 평가하기 위한 새로운 마우스 IL-13 중화 생물학적 검정

종래의 GST-clL-13 생체활성 및 마우스 IL-13 중화능 데이터는 A549 세포에서 STAT-6 인산화 리드아웃을 이용하여 산출하였다. 이러한 검정은 성가시며 용이하게 정량 데이터를 산출할 수 없다. 마우스 IL-13은 시험관내에서 TF-1 세포의 증식을 자극한다. 따라서, 이러한 세포에서 GST-clL-13로 백신접종된 마우스로부터 얻은 혈청의 마우스 IL-13 중화능을 평가하기 위한 검정을 개발하였다.

2.4 시험관내 마우스 IL-13 중화 생물학적 검정

인간 TF-1 세포(사내에서 입수)상에서 재조합 마우스 IL-13의 생체활성을 중화시키는 마우스 혈청의 능력을 측정하기 위하여, 5ng/ml 재조합 마우스 IL-13를 96 웰 조직 배양 플레이트(Invitrogen)에서 1시간 동안 37℃에서 다양한 농도의 혈청과 인큐베이션하였다. 이러한 예비인큐베이션 후에, TF-1 세포를 첨가하였다. 다양한 혈청 희석액, 재조합 마우스 IL-13 및 TF-1 세포를 함유하는 검정용 혼합물을 가습된 CO_2 인큐베이터에서 70시간 동안 37℃에서 인큐베이션하였다. MTT 기질(Cat. No. G4000, Promega)을 인큐베이션 마지막 4시간 동안 첨가한 후, 산용액을 가하여 반응을 정지시키고 대사된 청색 포르마겐 생성물을 용해시켰다. 각 웰의 용액의 흡광도를 570nm 파장에서 96-웰 플레이트 판독기로 판독하였다.

이러한 검정은 1/100 이상의 혈청 희석도에서 마우스 IL-13 중화능을 측정할 수 있을 뿐임에 유의하여야 한다. 1/100 미만의 혈청 희석도는 TF-1 세포에서 비특이적 증식 효과를 유도한다.

마우스 IL-13 생체활성을 중화시키는 혈청의 능력은 소정량의 마우스 IL-13의 생체활성을 50% 중화시키기 위해 필요한 혈청 희석도(= ND_{50})으로 표시하였다. 혈청 샘플 희석도가 클수록, 중화능이 더 강력하다.

GST-clL-13로 면역접종된 마우스로부터 얻은 혈청의 마우스 IL-13 중화능을 상기 방법에 의해 측정하였다. 강력한 IL-13 중화 반응이 하기에 표시한 바와 같이 일어났다.

마우스 (4 X GST-cIL-13 백신 투여후 125일째에 채취한 혈청 샘플)	**마우스 IL-13 중화능(ND_{50})**
C1	1/1250
C2	1/5230
C3	1/523
C4	1/417
C5	1/1670

2.5 '오발부민 챌린지' 마우스 천식 모델에서 효능에 필요한 마우스 IL-13 중화 수준의 측정

천식 치료를 위한 IL-13 자가백신의 필요한 효능을 기준화하기 위하여, '오발부민 챌린지' 마우스 천식 모델에서 오발부민 챌린지 동안 마우스를 다양한 용량의 토끼 항-마우스 IL-13 폴리클로날 항체로 처리하였다(복막내 주사로 수동적으로 투여). 기도 과반응성(AHR), 배상세포 화생(GCM) 및 폐염증세포 함량과 같은 모델 파라미터를 실험 종료시에 측정하였다. 이 모델에서 효능은 마우스 혈청에서 얻어진 마우스 IL-13 중화 수준과 관련이 있었다. 마우스 중화 생물학적 검정은 혈청 샘플에서 마우스 IL-13 중화 수준을 측정하기 위하여 사용되었다.

처리군 (토끼 항-마우스 IL-13 항체의 수동투여 용량)	**마우스 IL-13 중화능(ND_{50})**
최고용량	1/4100
고용량	1/2670
중간용량	1/476
최저용량	1/207

최고 3가지 용량의 항체를 투여받은 처리군은 모두 유사하였다. 이들 3개군 모두는 본 모델에서 사용된 금 표준 처리(덱사메타손, 복막내 경로로 3 x 1.5mg/kg 투여)와 동등(AHR의 경우)하거나 보다 우수한(GCM의 경우) 효능을 나타내었다. 최저용량의 항체가 투여된 경우에는 덱사메타손의 경우와 '비처리' 양성 대조군의 경우의 중간 정도의 효능을 나타내었다.

따라서, '중간용량' 처리군에서 얻어진 IL-13 중화 수준이 본 동물 모델에서 IL-13 자가백신에 요구되는 효능 역치를 나타낸다. 효능 역치는, 천식 모델에서 100% 효과를 보이기 위해 필요한, 마우스 혈청내에서의 IL-13 중화의 최소 수준으로 정의된다. 따라서, $1\times ED_{100}$ 은 1/476의 ND_{50} 에 상당한다.

정의된 효능 역치의 중요성

'오발부민 챌린지' 마우스 천식 모델에서의 효과를 위해 요구되는 IL-13 중화의 수준이 상기에 정의되었다. 마우스 C1-3 및 C5에서 GST-clL-13으로 유도된 IL-13 중화의 수준은 천식 모델에서 효과를 위해 요구되는 효능 역치를 초과한다. 이러한 결과는 도 11에 도시되었다.

따라서, GSL-cIL-13 백신은 마우스 천식 모델에서 효능을 나타내는 것으로 예측된다.

실시예 3: 다양한 애쥬번트와 조합된 GST-clL-13의 면역원성 프로파일

3.1 면역접종 프로토콜

Balb/c 마우스에서 마우스 IL-13에 대한 자가-항체의 형성을 유도하기 위한 면역원으로서 GST-clL-13을 사용하였다. 6 내지 8주령된 암컷 마우스에 애쥬번트중의 약 100μg 단백질을 1회 투여하였다. 그 후, 애쥬번트 중의 50μg 단백질로 구성된 부스터 면역접종을 4회 시행하였다. 각 처리군은 5마리를 포함하고, 이들은 하기 표의 프로토콜에 따라 면역성이 부여되었다.

지정된 시점(timepoint)에 꼬리정맥을 정맥천자하여 혈청 샘플을 수득하였다. 원심분리에 의해 분류한 후, 샘플을 마우스 IL-13에 대한 특이 IgG 반응의 존재에 대하여 ELISA로 검정하였다.

군	면역접종
A	AS03 중의 GST-cIL-13 i/m
B	명반 중의 GST-cIL-13 i/p
C	'이뮨이지' 중의 GST-cIL-13 i/m
D	CFA/IFA 중의 GST-cIL-13 s/c
E	PBS 중의 GST-cIL-13 s/c
F	면역접종 없음

일(Day)	처리
-7	사전 채혈
0	1차 면역접종
21	제 1 부스트 면역접종
35	꼬리 채혈
49	제 2 부스트 면역접종
63	꼬리 채혈
77	제 3 부스트 면역접종
92	꼬리 채혈
106	제 4 부스트 면역접종
125	꼬리 채혈

3.2 면역원 + 애쥬번트 제형.

에멀젼 애쥬번트 AS03의 제조

트윈(Tween) 80을 인산염 완충 식염수(PBS)에 용해시켜 PBS 중의 2% 용액을 제조하였다. 100ml 2배 농도의 에멀젼을 제공하기 위하여, 5g의 DL 알파 토코페롤 및 5ml의 스쿠알렌을 완전히 혼합되게 와동시켰다. 90ml의 PBS/트윈 용액을 첨가하고 완전히 혼합하였다. 그후, 수득된 에멀젼은 시린지를 통해 통과시키고, 최종적으로 M110S 미세유체역학 장치를 사용하여 미세유동화시켰다. 수득된 오일 액적은 약 180 nm의 크기를 가졌다.

단백질 용액과의 1:1로 애쥬번트를 혼합하고, 잠깐 와동시키고 (중간 속도로 10초) 오비탈 진탕기 상에서 실온에서 10분 동안 배양시켰다. 2개의 상이한 위치에서 근육내 경로를 통해 마우스 당 총 100μℓ 현탁액을 주사 및 투여하기 전에 잠깐 와동시켰다 (즉, 마우스 당 2×50μℓ, 각각의 사두근내에 1회 주사). 각 면역접종 전에 새로운 것을 준비하였다.

명반

시그마(SIGMA)사로부터 제공됨(Cat. No. A-1577). 2mg/ml의 PBS 중의 명반 현탁액을 준비하였다. 단백질 용액과 1:1로 애쥬번트를 혼합하고, 잠깐 와동시키 고, 실온에서 10분 동안 부드럽게 진탕시키면서 배양하였다. 마우스당 총 100μℓ의 현탁액을 복강내(i/p) 주사 및 투여하기 전에 잠깐 와동시켰다. 각 면역접종 전에 새로운 것을 준비하였다.

CpG-ImmunEasy

Qiagen사로부터 공급됨(Cat. No. 303101). 부드러운 와동으로 애쥬번트 저장 용기를 혼합시키고, 상하 방향으로 5회 부드럽게 피펫팅하여 단백질과 1:1로 애쥬번트를 혼합시켰다. 실온에서 15분 동안 배양시켰다. 혼합물을 상하로 5회 부드럽게 피펫팅하고, 2개의 별개 위치에서 근육내 경로로 마우스 당 100μℓ 현탁액을 투여하였다 (즉, 마우스 당 2×50μℓ, 각각의 사두근내에 1회 주사). 각 면역접종 전에 새로운 것을 준비하였다.

CFA/IFA

시그마사로부터 공급됨(Cat. Nos. F-5881, F-5506). 사전 혼합된 주된 CFA 또는 부스트용 IFA와 1:1로 제형하였다. 샘플을 회전혼합하여 CFA/IFA와 균일한 백색 현탁액을 확보하였다. 사용하기 전에 적어도 30분 동안 얼음상에 저장하고, 투여 전에 완전히 회전혼합시켰다.

3.3 항-마우스 IL-13 항체 반응

항-마우스 IL-13 항체 검출 ELISA를 이용하여 혈청 샘플내에서 항-마우스 IL-13 항체 반응을 관찰하였다.

96-웰 Maxisorp 플레이트를 탄산-중탄산 완충액 중의 항-마우스 IL-13 모노클로날 항체(Cat. No. MAB, R+D 시스템)로 4℃에서 밤새 코팅시켰다. 플레이트를 3% BSA/TBST로 실온에서 1시간 동안 블록킹시키고, TBST에서 3회 세척하고, 실온에서 1시간 동안 마우스 IL-13(Cat. No. 413-ML-025, R+D 시스템)과 배양하였다. 세척 후, 실온에서 1시간 동안 마우스 혈청과 함께 배양시키고, 다시 세척하고, HRP 컨쥬게이트된 항-마우스 IgG 폴리클로날 항체(SIGMA, Cat. No. A9309)와 배양시켰다. 추가로 플레이트를 세척하고 나서, 플레이트를 0-페닐렌디아민 디히드로클로라이드 퍼옥시다제 기질로 30분 동안 발현시켰다.

혈청 중의 항-마우스 IL-13 항체의 수준은 종점 역가로 표현되었다. 종점 역가는 ELISA 배경 판독을 2배로 하는데 상당하는 혈청의 희석도로서 정의된다.

마우스	항-마우스 IL-13 항체 종점 역가			
	AS03	명반	CpG	CFA/IFA
1	1/875	1/7250	1/67500	1/6750
2	1/9250	1/800	1/80000	1/975
3	1/160	1/9000	1/54000	1/6000
4	1/9000	1/6500	1/62500	1/16000
5	1/3600	1/10000	1/77500	1/31000

도 10은 1/100에서 희석된 혈청 샘플에 대한, 다양한 처리군내에서의 125일째의 항-마우스 IL-13 항체 프로파일을 도시한 것이다.

CpG 애쥬번트와 조합하여 GST-clL-13으로 면역처리된 모든 5마리 마우스가 강한 항-마우스 IL-13 자가-항체 반응을 나타내었다. 이것은 다른 애쥬번트와 대조적으로서, 다른 애쥬번트에서는 각 군에 걸쳐 반응이 별로 일관되지 못하고, 일부 마우스는 매우 약한 반응을 나타내었다.

이러한 결과는, CpG 애쥬번트가 시험된 다른 애쥬번트와 비교하여 일관되고 높은 역가의 항-마우스 IL-13 자가-항체 반응을 나타내는데 보다 효과적임을 나타낸다.

이러한 혈청 샘플은 시험관내 IL-13 중화 생물검정에서 IL-13 중화능에 대하여 분석하였다.

3.4 IL-13 중화능.

인간 TF-1 세포(ATCC Cat. No. CRL-2003)에 대한 재조합 마우스 IL-13의 생체활성을 중화시키는 마우스 혈청의 능력을 측정하기 위하여, 5ng/ml 재조합 마우스 IL-13을 96-웰 조직 배양 플레이트(Gibco BRL)내에서 37℃에서 1시간 동안 다양한 농도의 혈청과 함께 배양시켰다. 사전 배양 기간에 이어서, TF-1 세포를 첨가하였다. 다양한 혈청 희석도를 함유하는 검정 혼합물, 재조합 마우스 IL-13 및 TF-1 세포를 가습 CO_2 배양기내에서 37℃에서 70시간 동안 배양시켰다. MTT 기질(Cat. No. G4000, Promega)을 배양 중 최종 4시간 동안 첨가하고 나서, 산 용액으로 반응을 종결시키고 대사된 청색 포마잔(formazan) 생성물을 용해시켰다. 각 웰내의 용액의 흡수는 96-웰 플레이트 판독기내에서 570nm 파장에서 판독되었다.

이러한 검정은 1/100 이상의 혈청 희석도내에서 마우스 IL-13 중화능을 측정할 수 있을 뿐이라는 것을 주목하라. 1/100 미만의 혈청 희석도는 TF-1 세포에서 비-특이적 증식 효과를 유도한다.

마우스 IL-13 생체활성을 중화시키는 혈청의 능력은, 5ng/ml 마우스 IL-13의 생체활성을 50%(=ND_{50}) 중화시키는데 요구되는 혈청의 희석도로서 표현된다. 희석 혈청 샘플이 더 많이 요구될수록, 중화능은 더욱 강력하다.

시험된 마우스 D5 혈청의 최고 농도는 1/100 희석도이다. 이것은 5ng/ml 마우스 IL-13의 생체활성을 50% 정도 중화시키지 못하므로, ND_{50} 은 <1/100 희석으로서 표현된다.

마우스 (125일째에 채취된 혈청 샘플)	**마우스 IL-13** **중화능** **(ND_{50})**
C1	1/1250
C2	1/5230
C3	1/523
C4	1/417
C5	1/1670
D5	<1/100

CpG 애쥬번트와 조합하여 GST-clL-13으로 면역된 모든 5마리 마우스로부터 채취된 125일째의 혈청 샘플은 시험관내 생물검정에서 마우스 Il-13의 생체활성을 유력하게 중화시킬 수 있다. 대조적으로, 마우스 D5 (CFA/IFA 중의 GST-clL-13으로 면역된)로부터 채취된 125일째의 혈청 샘플은 시험된 모든 희석도에서 마우스 IL-13의 생체활성을 중화시킬 수 없었다.

이러한 결과는 CpG 애쥬번트가 시험된 다른 애쥬번트와 비교하여 항-마우스 IL-13 자가-항체 반응을 중화시키는 것을 증가시키는데 보다 효과적임을 나타낸다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

인간 단백질과 30% 이상 100% 미만 동일한 단리된 단백질로서, 단백질이 항체가 아니며, 폴리펩티드가,

(a) 유사한 인간 이외의 단백질의 특징인 하나 이상의 돌연변이를 함유하고,

(b) 인간에서 항체를 생성시킬 수 있고,

(c) 항체가 인간 단백질 및 폴리펩티드 둘 모두에 결합하기에 충분하게 인간 단백질과 구조적으로 유사한 단백질.

청구항 2.
단백질이 B-세포 에피토프가 유래되는 종에서 B-세포 에피토프가 유래되는 천연 단백질을 인지하는 면역 반응을 일으킬 수 있도록, 포유류 자기-항원으로부터의 B-세포 에피토프를 지니고, 제 2 포유류 종의 유사 단백질의 서열을 초래하는 돌연변이를 지니는 단백질.

청구항 3.
단백질이 B-세포 에피토프가 유래되는 종에서 B-세포 에피토프가 유래되는 천연 단백질을 인지하는 면역 반응을 일으킬 수 있도록, 제 2 포유류 종으로부터의 유사 단백질의 프레임워크내로 치환에 의해 이식되는, 자기-단백질의 B-세포 에피토프를 지닌 단백질.

청구항 4.
제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, 표면 노출되지 않은 영역내로 도입되는 보존된 표면 영역을 포함하며, 상기 돌연변이는 단백질이 자기-단백질이 유래되는 종에서 자기 단백질에 대한 면역 반응을 일으킬 수 있도록 유사 단백질의 서열을 초래함을 특징으로 하는 단백질.

청구항 5.
제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 있어서, 면역 반응이 중화 항체 반응임을 특징으로 하는 단백질.

청구항 6.
제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 단백질 또는 B-세포 에피토프가 사이토카인으로부터 유래됨을 특징으로 하는 단백질.

청구항 7.
제 6항에 있어서, 4중 나선 사이토카인임을 특징으로 하는 사이토카인.

청구항 8.
제 7항에 있어서, IL-4 또는 IL-13임을 특징으로 하는 사이토카인.

청구항 9.
하기 치환 또는 이의 보존적 치환을 포함하는 치환 중 하나 이상을 지닌 돌연변이된 인간 IL-13:

30번에서 R →K

37번에서 V →S

63번에서 Y →F

65번에서 A →V

68번에서 E →D

80번에서 E →Y

81번에서 K →R

85번에서 M →I

87번에서 G →H

113번에서 Q →H

115번에서 V →I

117번에서 D →K

청구항 10.
제 9항에 있어서, 제 9항에 기재된 다수의 치환을 지님을 특징으로 하는 돌연변이된 인간 IL-13.

청구항 11.
제 9항 또는 제 10항에 있어서, 하기 서열 또는 하나 이상의 보존적 치환을 포함하는 이러한 서열의 변이체 중 하나 이상을 지님을 특징으로 하는 돌연변이된 인간 IL-13:

L K E L I E E L S N

F C V A L D S L

A I Y R T Q R I L H G

K I E V A H F I T K L L

청구항 12.
도 9에 도시된 돌연변이된 인간 IL-13.

청구항 13.
제 1항 내지 제 12항 중 어느 한 항에 따른 단백질을 엔코딩하는 폴리누클레오티드.

청구항 14.
제 13항에 있어서, DNA가 프로모터에 작동적으로 결합됨을 특징으로 하는 폴리누클레오티드.

청구항 15.
제 13항 또는 제 14항의 폴리누클레오티드를 포함하는 벡터.

청구항 16.
제 13항 또는 제 14항의 폴리누클레오티드 또는 제 15항의 벡터로 형질전환된 숙주.

청구항 17.
제 1항 내지 제 15항 중 어느 한 항에 따른 단백질, 폴리누클레오티드, 벡터를 약제학적으로 허용되는 담체 또는 부형제와 함께 포함하는 약제 조성물.

청구항 18.
제 17항에 있어서, 애쥬번트를 추가로 포함함을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 19.
제 18항에 있어서, 제 1항 내지 제 12항 중 어느 한 항에 따른 단백질 및 면 역자극 올리고누클레오티드를 포함함을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 20.
제 19항에 있어서, 면역자극 올리고누클레오티드가 하기 군으로부터 선택됨을 특징으로 하는 약제 조성물:

올리고 **1(SEQ ID NO:1): TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT (CpG 1826)**

올리고 **2 (SEQ ID NO:2): TCT CCC AGC GTG CGC CAT (CpG 1758)**

올리고 **3(SEQ ID NO:3): ACC GAT GAC GTC GCC GGT GAC GGC ACC ACG**

올리고 **4 (SEQ ID NO:4): TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT (CpG 2006)**

올리고 **5 (SEQ ID NO:5): TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT (CpG 1668)**

청구항 21.

의약에 사용되는, 제 1항 내지 제 20항 중 어느 한 항에 따른 단백질, 폴리누클레오티드, 벡터, 숙주 또는 조성물.

청구항 22.

IL-13 매개 질병을 치료하기 위한 약제의 제조에 사용되는, 제 1항 내지 제 12항 중 어느 한 항에 따른 단백질의 용도.

청구항 23.

제 22항에 있어서, 천식을 치료하는 데에 사용됨을 특징으로 하는 용도.

청구항 24.

안전하고 유효한 양의 제 17항 내지 제 20항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하여, IL-13 매개 질병을 치료하거나 예방하는 방법.

청구항 25.

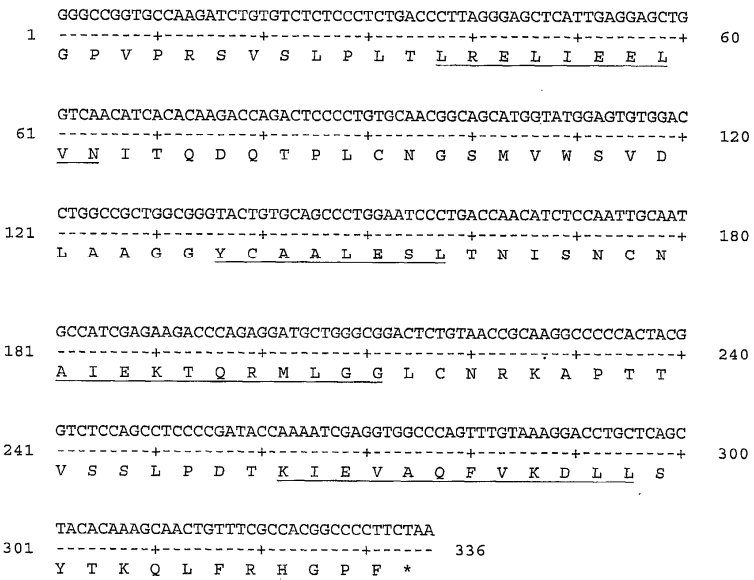
1. 항체 반응이 바람직한 자기, 전형적으로 인간 단백질의 하나 이상의 영역을 확인하는 단계.

2. 자기 단백질의 아미노산 서열을 확인하는 단계.

3. 아미노산 서열이 단계 2에서 확인된 서열로부터 수득되는 단계 1에서 확인된 하나 이상의 표적 영역을 함유하는 키메라 분자의 유사 단백질 구성물의 아미노산 서열을 재조합 DNA 기술에 의해 확인하는 단계로서, 돌연변이 단백질이 자기 단백질을 인지하는 면역 반응을 일으킬 수 있도록, 생성된 단백질을 자기 단백질의 형태와 유사한 형태로 폴딩시킬 수 있기에 충분한 단계 3에서 확인된 서열(들)로부터의 아미노산을 확인하는 단계를 포함하여, 제 1항 내지 제 12항 중 어느 한 항에 따른 단백질을 제조하는 방법.

도면

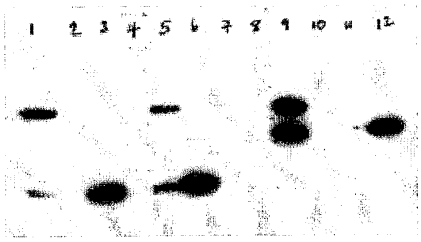
도면1



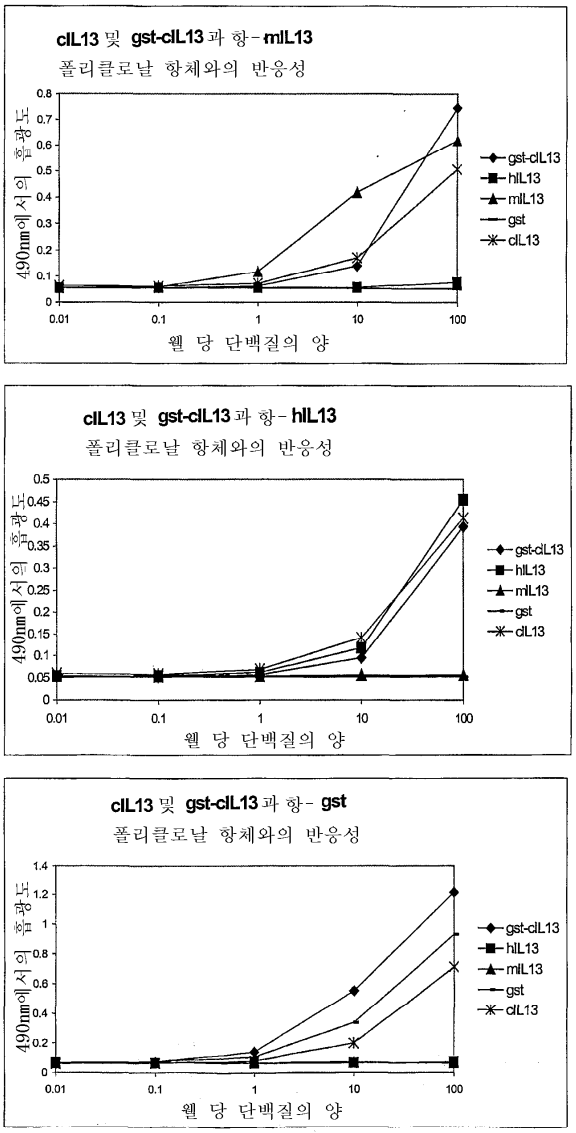
도면2


175kDa
85kDa
45kDa
32.5kDa
GST-cIL13 (~38kDa)

도면3


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

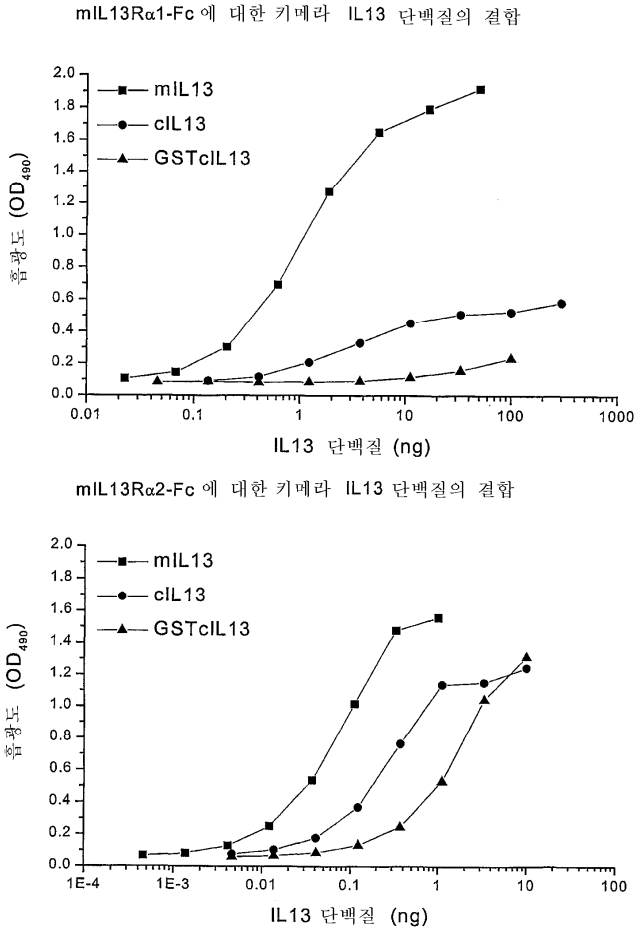
도면4


clL13 및 gst-clL13 과 항-mlL13
폴리클로날 항체와의 반응성
490nm에서의 흡광도
웰 당 단백질의 양
gst-clL13
hlL13
mlL13
gst
clL13

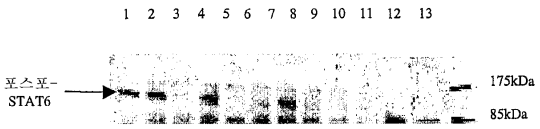
clL13 및 gst-clL13 과 항- hlL13
폴리클로날 항체와의 반응성
490nm에서의 흡광도
웰 당 단백질의 양
gst-clL13
hlL13
mlL13
gst
clL13

clL13 및 gst-clL13 과 항- gst
폴리클로날 항체와의 반응성
490nm에서의 흡광도
웰 당 단백질의 양
gst-clL13
hlL13
mlL13
gst
clL13

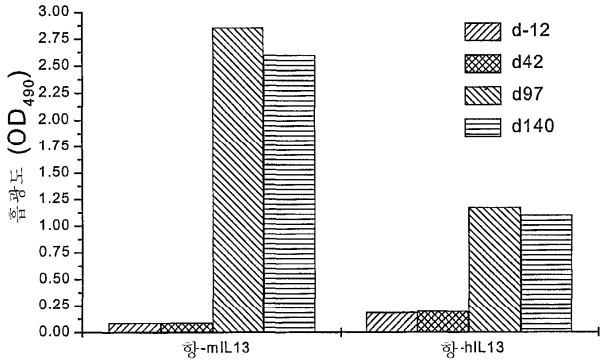
도면5


mIL13Rα1-Fc 에 대한 키메라 IL13 단백질의 결합
mIL13
cIL13
GSTcIL13
흡광도 (OD490)
IL13 단백질 (ng)
mIL13Rα2-Fc 에 대한 키메라 IL13 단백질의 결합
mIL13
cIL13
GSTcIL13
흡광도 (OD490)
IL13 단백질 (ng)

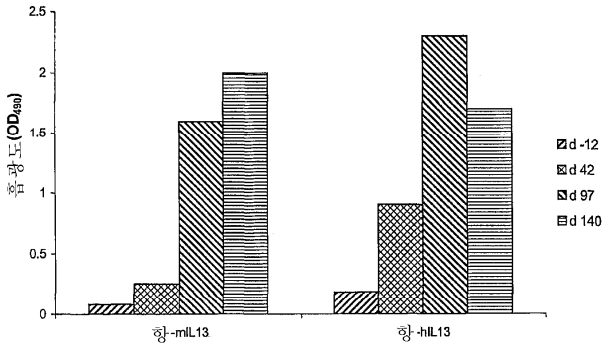
도면6


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13
포스포-
STAT6
175kDa
85kDa

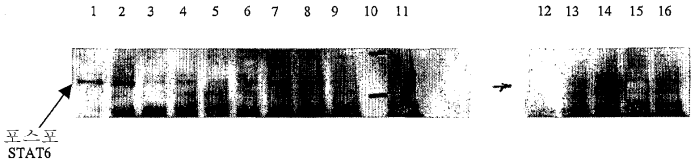
도면7a


d-12
d42
d97
d140
흡광도 (OD490)
항-mIL13
항-hIL13

도면7b



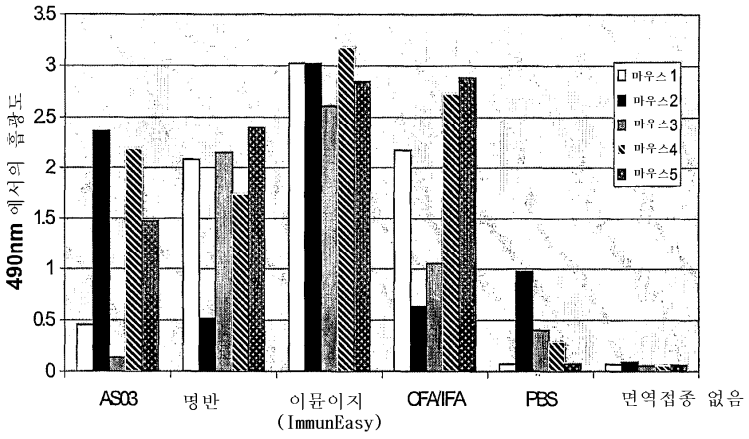
도면8



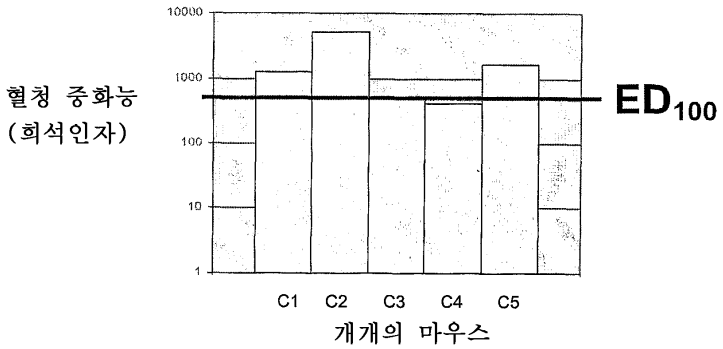
도면9

```
   1 ATGGCGCTTTTGTTGACCACGGTCATTGCTCTCACTTGCCTTGGCGGCTTTGCCTCCCCA   60
     ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
     M  A  L  L  L  T  T  V  I  A  L  T  C  L  G  G  F  A  S  P

  61 GGCCCTGTGCCTCCCTCTACAGCCCTTAAGGAGCTTATTGAGGAGCTGAGCAACATCACC  120
     ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
     G  P  V  P  P  S  T  A  L  K  E  L  I  E  E  L  S  N  I  T

 121 CAGAACCAGAAGGCTCCGCTCTGCAATGGCAGCATGGTTTGGAGCATCAACCTGACAGCT  180
     ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
     Q  N  Q  K  A  P  L  C  N  G  S  M  V  W  S  I  N  L  T  A

 181 GGCATGTTCTGTGTAGCCCTGGATTCCCTGATCAACGTGTCAGGCTGCAGTGCCATCTAC  240
     ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
     G  M  F  C  V  A  L  D  S  L  I  N  V  S  G  C  S  A  I  Y

 241 AGGACCCAGAGGATATTGCATGGCTTCTGCCCGCACAAGGTCTCAGCTGGGCAGTTTTCC  300
     ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
     R  T  Q  R  I  L  H  G  F  C  P  H  K  V  S  A  G  Q  F  S

 301 AGCTTGCATGTCCGAGACACCAAAATCGAAGTAGCCCACTTTATAACAAAACTGCTCTTA  360
     ---------+---------+---------+---------+---------+---------+
     S  L  H  V  R  D  T  K  I  E  V  A  H  F  I  T  K  L  L  L

 361 CATTTAAAGAAACTTTTTCGCGAGGGACGGTTCAACTGA                       399
     ---------+---------+---------+---------
     H  L  K  K  L  F  R  E  G  R  F  N  *
```

도면10



도면11



도면12

```
     atggcgctctgggtgactgcagtcctggctcttgcttgccttggtggtctcgccgcccca
   1 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+   60
 -19 M  A  L  W  V  T  A  V  L  A  L  A  C  L  G  G  L  A  A  P     0

     GGGCCGGTGCCAAGATCTGTGTCTCTCCCTGTGACCCTTAAGGAGCTTATTGAGGAGCTG
  61 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+  120
   1 G  P  V  P  R  S  V  S  L  P  V  T  L  K  E  L  I  E  E  L    20

     ACCAACATCACACAAGACCAGACTCCCCTGTGCAACGGCAGCATGGTATGGAGTGTGGAC
 121 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+  180
  21 T  N  I  T  Q  D  Q  T  P  L  C  N  G  S  M  V  W  S  V  D    40

     CTGGCCGCTGGCGGGTTCTGTGTAGCCCTGGATTCCCTGACCAACATCTCCAATTGCAAT
 181 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+  240
  41 L  A  A  G  G  F  C  V  A  L  D  S  L  T  N  I  S  N  C  N    60

     GCCATCTTCAGGACCCAGAGGATATTGCATGCCCTCTGTAACCGCAAGGCCCCCACTACG
 241 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+  300
  61 A  I  F  R  T  Q  R  I  L  H  A  L  C  N  R  K  A  P  T  T    80

     GTCTCCAGCCTCCCCGATACCAAAATCGAAGTAGCCCACTTTATAACAAAACTGCTCACC
 301 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+  360
  81 V  S  S  L  P  D  T  K  I  E  V  A  H  F  I  T  K  L  L  T   100

     TACACAAAGAACCTGTTTCGCCGCGGCCCCTTCTAA
 361 ---------+---------+---------+------   396
 101 Y  T  K  N  L  F  R  R  G  P  F  *     112
```

도면13

```
 -23  ---+---------+---------+    0
      MGLTSQLLPPLFFLLACAGNFVHG

   1  ---------+---------+----   24
      HKCDKNHLREIIGILNEVTGEKTL

  25  -----+---------+--------   48
      CTELTVTDIFAASKNTTESELVCR

  49  -+---------+---------+--   72
      ASKVLRIFYLKHEKDTRCLGATAK

  73  -------+---------+------   96
      NSSVLMELQRLFRAFRCLDGLNSC

  97  ---+---------+---------+  120
      PVKEANQSSLKDFLESLKSIMQMD

 121  ------  126
      YSKCSS
```

SEQUENCE LISTING

<110> Glaxo Group Ltd

<120> Vaccine

<130> PG4355

<160> 25

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutated epitope

<400> 1

Leu Lys Glu Leu Ile Glu Glu Leu Ser Asn

1 5 10

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutated epitope

<400> 2

Phe Cys Val Ala Leu Asp Ser Leu

1 5

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutated epitope

<400> 3

Ala Ile Tyr Arg Thr Gln Arg Ile Leu His Gly

1 5 10

<210> 4

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutated epitope

<400> 4

Lys Ile Glu Val Ala His Phe Ile Thr Lys Leu Leu

1 5 10

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> unknown

<220>

<223> synthetic immunostimulatory oligonucleotide

<400> 5

tccatgacgt tcctgacgtt 20

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> unknown

<220>

<223> synthetic immunostimulatory oligonucleotide

<400> 6

tctcccagcg tgcgccat 18

<210> 7

<211> 30

<212> DNA

<213> unknown

<220>

<223> synthetic immunostimulatory oligonucleotide

<400> 7

accgatgacg tcgccggtga cggcaccacg 30

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> unknown

<220>

<223> synthetic immunostimulatory oligonucleotide

<400> 8

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> unknown

<220>

<223> synthetic immunostimulatory oligonucleotide

<400> 9

tccatgacgt tcctgatgct 20

<210> 10

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR oligoprimer for Chimeric IL13 for murine use

<400> 10

tgtgatgttg accagctcct caatgagctc cctaagggtc agagggagag acacagatct 60

tggcaccggc cc 72

<210> 11

<211> 73

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR oligoprimer for Chimeric IL13 for murine use

<400> 11

aggagctggt caacatcaca caagaccaga ctcccctgtg caacggcagc atggtatgga 60

gtgtggacct ggc 73

<210> 12

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR oligoprimer for Chimeric IL13 for murine use

<400> 12

gcaattggag atgttggtca gggattccag ggctgcacag tacccgccag cggccaggtc 60

cacactccat ac 72

<210> 13

<211> 73

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR oligoprimer for Chimeric IL13 for murine use

<400> 13

tgaccaacat ctccaattgc aatgccatcg agaagaccca gaggatgctg ggcggactct 60

gtaaccgcaa ggc 73

<210> 14

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR oligoprimer for Chimeric IL13 for murine use

<400> 14

aaactgggcc acctcgattt tggtatcggg gaggctggag accgtagtgg gggccttgcg 60

gttacagagt cc 72

<210> 15

<211> 71

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR oligoprimer for Chimeric IL13 for murine use

<400> 15

aaatcgaggt ggcccagttt gtaaaggacc tgctcagcta cacaaagcaa ctgtttcgcc 60

acggcccctt c 71

<210> 16

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR oligoprimer for Chimeric IL13 for murine use

<400> 16

cgcggattcg ggccggtgcc aagatctg 28

<210> 17

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR oligoprimer for Chimeric IL13 for murine use

<400> 17

ctccgctcga gtcgacttag aaggggccgt ggcgaaa 37

<210> 18

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR oligoprimer for Chimeric IL13 for murine use

<400> 18

cgcggatccg ggccggtgcc aagatctg 28

<210> 19

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chimeric IL13 for murine use

<400> 19

gggccggtgc caagatctgt gtctctccct ctgaccctta gggagctcat tgaggagctg 60

gtcaacatca cacaagacca gactcccctg tgcaacggca gcatggtatg gagtgtggac 120

ctggccgctg gcgggtactg tgcagccctg gaatccctga ccaacatctc caattgcaat 180

gccatcgaga agacccagag gatgctgggc ggactctgta accgcaaggc ccccactacg 240

gtctccagcc tccccgatac caaaatcgag gtggcccagt ttgtaaagga cctgctcagc 300

tacacaaagc aactgtttcg ccacggcccc ttctaa 336

<210> 20

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chimeric IL13 for murine use

<400> 20

Gly Pro Val Pro Arg Ser Val Ser Leu Pro Leu Thr Leu Arg Glu Leu
1 5 10 15

Ile Glu Glu Leu Val Asn Ile Thr Gln Asp Gln Thr Pro Leu Cys Asn
20 25 30

Gly Ser Met Val Trp Ser Val Asp Leu Ala Ala Gly Gly Tyr Cys Ala
35 40 45

Ala Leu Glu Ser Leu Thr Asn Ile Ser Asn Cys Asn Ala Ile Glu Lys
50 55 60

Thr Gln Arg Met Leu Gly Gly Leu Cys Asn Arg Lys Ala Pro Thr Thr
65 70 75 80

Val Ser Ser Leu Pro Asp Thr Lys Ile Glu Val Ala Gln Phe Val Lys
85 90 95

Asp Leu Leu Ser Tyr Thr Lys Gln Leu Phe Arg His Gly Pro Phe
100 105 110

<210> 21

<211> 399

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chimeric IL13 for human use

<400> 21

atggcgcttt tgttgaccac ggtcattgct ctcacttgcc ttggcggctt tgcctcccca 60

ggccctgtgc ctccctctac agcccttaag gagcttattg aggagctgag caacatcacc 120

cagaaccaga aggctccgct ctgcaatggc agcatggttt ggagcatcaa cctgacagct 180

ggcatgttct gtgtagccct ggattccctg atcaacgtgt caggctgcag tgccatctac 240

aggacccaga ggatattgca tggcttctgc ccgcacaagg tctcagctgg gcagttttcc 300

agcttgcatg tccgagacac caaaatcgaa gtagcccact ttataacaaa actgctctta 360

catttaaaga aacttttcg cgagggacgg ttcaactga 399

<210> 22

<211> 132

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chimeric IL13 for human use

<400> 22

Met Ala Leu Leu Leu Thr Thr Val Ile Ala Leu Thr Cys Leu Gly Gly
1 5 10 15

Phe Ala Ser Pro Gly Pro Val Pro Pro Ser Thr Ala Leu Lys Glu Leu
20 25 30

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

Asn Gly Ser Met Val Trp Ser Ile Asn Leu Thr Ala Gly Met Phe Cys
50 55 60

Val Ala Leu Asp Ser Leu Ile Asn Val Ser Gly Cys Ser Ala Ile Tyr
65 70 75 80

Arg Thr Gln Arg Ile Leu His Gly Phe Cys Pro His Lys Val Ser Ala
85 90 95

Gly Gln Phe Ser Ser Leu His Val Arg Asp Thr Lys Ile Glu Val Ala
100 105 110

His Phe Ile Thr Lys Leu Leu Leu His Leu Lys Lys Leu Phe Arg Glu
115 120 125

Gly Arg Phe Asn
130

<210> 23

<211> 396

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chimeric IL13 for murine use

<400> 23

atggcgctct gggtgactgc agtcctggct cttgcttgcc ttggtggtct cgccgcccca 60

gggccggtgc caagatctgt gtctctccct gtgaccctta aggagcttat tgaggagctg 120

accaacatca cacaagacca gactcccctg tgcaacggca gcatggtatg gagtgtggac 180

ctggccgctg gcgggttctg tgtagccctg gattccctga ccaacatctc caattgcaat 240

gccatcttca ggacccagag gatattgcat gccctctgta accgcaaggc ccccactacg 300

gtctccagcc tccccgatac caaaatcgaa gtagcccact ttataacaaa actgctcacc 360

tacacaaaga acctgtttcg ccgcggcccc ttctaa 396

<210> 24

<211> 131

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chimeric IL13 for murine use

<400> 24

Met Ala Leu Trp Val Thr Ala Val Leu Ala Leu Ala Cys Leu Gly Gly

1 5 10 15

Leu Ala Ala Pro Gly Pro Val Pro Arg Ser Val Ser Leu Pro Val Thr

20 25 30

Leu Lys Glu Leu Ile Glu Glu Leu Thr Asn Ile Thr Gln Asp Gln Thr

35 40 45

Pro Leu Cys Asn Gly Ser Met Val Trp Ser Val Asp Leu Ala Ala Gly

50 55 60

Gly Phe Cys Val Ala Leu Asp Ser Leu Thr Asn Ile Ser Asn Cys Asn

65 70 75 80

Ala Ile Phe Arg Thr Gln Arg Ile Leu His Ala Leu Cys Asn Arg Lys

85 90 95

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

100 105 110

His Phe Ile Thr Lys Leu Leu Thr Tyr Thr Lys Asn Leu Phe Arg Arg

115 120 125

Gly Pro Phe

130

<210> 25

<211> 150

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chimeric IL4 for human use

<400> 25

Met Gly Leu Thr Ser Gln Leu Leu Pro Pro Leu Phe Phe Leu Leu Ala
1 5 10 15

Cys Ala Gly Asn Phe Val His Gly His Lys Cys Asp Lys Asn His Leu
20 25 30

Arg Glu Ile Ile Gly Ile Leu Asn Glu Val Thr Gly Glu Lys Thr Leu
35 40 45

Cys Thr Glu Leu Thr Val Thr Asp Ile Phe Ala Ala Ser Lys Asn Thr
50 55 60

Thr Glu Ser Glu Leu Val Cys Arg Ala Ser Lys Val Leu Arg Ile Phe
65 70 75 80

Tyr Leu Lys His Glu Lys Asp Thr Arg Cys Leu Gly Ala Thr Ala Lys
85 90 95

Asn Ser Ser Val Leu Met Glu Leu Gln Arg Leu Phe Arg Ala Phe Arg
100 105 110

Cys Leu Asp Gly Leu Asn Ser Cys Pro Val Lys Glu Ala Asn Gln Ser
115 120 125

Ser Leu Lys Asp Phe Leu Glu Ser Leu Lys Ser Ile Met Gln Met Asp
130 135 140

Tyr Ser Lys Cys Ser Ser
145 150