



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(11) 공개번호 10-2014-0012093  
 (43) 공개일자 2014년01월29일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*A61K 39/395* (2006.01) *C07K 16/24* (2006.01)  
*A61P 37/06* (2006.01) *A61P 1/00* (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2013-7024150
- (22) 출원일자(국제) 2012년02월15일  
 심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2013년09월12일
- (86) 국제출원번호 PCT/IB2012/050699
- (87) 국제공개번호 WO 2012/110968  
 국제공개일자 2012년08월23일
- (30) 우선권주장  
 61/443,829 2011년02월17일 미국(US)

- (71) 출원인  
**노파르티스 아게**  
 스위스 체하-4056 바젤 리히트스트라체 35  
**유니베르시태트 취리히**  
 스위스 체하-8006 취리히 래미슈트라체 71
- (72) 발명자  
**뤼홀, 안네**  
 스위스 체하-4002 바젤 포스트파흐 노파르티스 파  
 르마 아게  
**로글러, 게르하르트**  
 스위스 체하-8091 취리히 래미슈트라체 100 뷔어  
 인네레 메디친 유니베르시태트스피탈 가스트로엔  
 테롤로지에 운트 헤파톨로지에 데파르트먼트 유니  
 버시티 오브 취리히 클리닉 뷔어  
**샤를, 미카엘**  
 스위스 체하-8091 취리히 래미슈트라체 100 뷔어  
 인네레 메디친 유니베르시태트스피탈 가스트로엔  
 테롤로지에 운트 헤파톨로지에 데파르트먼트 유니  
 버시티 오브 취리히 클리닉 뷔어
- (74) 대리인  
**위혜숙, 양영준**

전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **누공성 크론병의 치료**

**(57) 요약**

본 발명은 크론병 (Crohn's disease)의 분야에 속한다. 특히, 본 발명은 항-IL-13 항체를 사용하여 크론병에서  
 의 누공을 치료하는 것에 관한 것이다. 항체는 IgG일 수 있고, 특히 항-IL-13 항체 01951/G12일 수 있다.

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

크론병 (Crohn's disease)에 걸린 환자에서의 누공의 치료 또는 예방에 사용하기 위한, IL-13의 활성을 억제하거나 중화하는 항-IL-13 항체.

**청구항 2**

크론병에 걸린 환자에서의 누공의 치료 또는 예방을 위한 의약의 제조에 있어서, IL-13의 활성을 억제하거나 중화하는 항-IL-13 항체의 용도.

**청구항 3**

크론병에서의 누공 형성의 치료 또는 예방을 필요로 하는 대상체에게 IL-13의 활성을 억제하거나 중화하는 항-IL-13 항체를 투여하는 것을 포함하는, 크론병에 걸린 환자에서 누공의 형성을 치료 또는 예방하는 방법.

**청구항 4**

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 (a) 서열 1, 2, 6 또는 7에 제시된  $V_H$  CDR1, (b) 서열 3 또는 8에 제시된  $V_H$  CDR2, (c) 서열 4, 5, 9 또는 10에 제시된  $V_H$  CDR3, (d) 서열 11, 16, 17 또는 18에 제시된  $V_L$  CDR1, (e) 서열 12 또는 19에 제시된  $V_L$  CDR2, (f) 서열 13, 14, 15, 20, 21 또는 22에 제시된  $V_L$  CDR3으로 이루어지는 균으로부터 선택되는 하나 이상의 CDR을 포함하는 것인, 항체, 용도 또는 방법.

**청구항 5**

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 서열 7의 중쇄 가변 영역 CDR1; 서열 8의 중쇄 가변 영역 CDR2; 서열 10의 중쇄 가변 영역 CDR3; 서열 17의 경쇄 가변 영역 CDR1; 서열 19의 경쇄 가변 영역 CDR2; 및 서열 21의 경쇄 가변 영역 CDR3을 포함하는 것인, 항체, 용도 또는 방법.

**청구항 6**

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 서열 31에 제시된 중쇄 가변 영역 및 서열 33에 제시된 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인, 항체, 용도 또는 방법.

**청구항 7**

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 서열 41에 제시된 중쇄 및 서열 39에 제시된 경쇄를 포함하는 것인, 항체, 용도 또는 방법.

**청구항 8**

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가  $1 \times 10^{-9}$  M 또는 그 미만의  $K_D$ 로 IL-13에 결합하는 것인, 항체, 용도 또는 방법.

**청구항 9**

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 제약상 허용되는 담체와 함께 제제화되는 것인, 항체, 용도 또는 방법.

**청구항 10**

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 소염 치료제와 순차적으로 또는 동시에 공동-투여되는 것인, 항체, 용도 또는 방법.

**청구항 11**

항-IL-13 항체이거나 항-IL-13 항체를 포함하는 제약 조성물인 제1 성분, 및 지침서인 제2 성분을 포함하는 키

트.

**청구항 12**

제11항에 있어서, 시린지 또는 다른 전달 장치, 아주반트, 또는 제약상 허용되는 제제화 용액 중 하나 이상을 포함하는 제3 성분을 추가로 포함하는 키트.

**명세서**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 크론병 (Crohn's disease)의 분야에 속한다. 특히, 본 발명은 항-IL-13 항체를 사용하여 크론병에서의 누공을 치료하는 것에 관한 것이다. 항체는 IgG일 수 있고, 특히 항-IL13 항체 01951/G12일 수 있다.

**배경기술**

[0002] 크론병 (CD)은 위장관 (GI)의 만성 재발성/경감성 (remitting) 염증성 질환이다. CD에 의해 가장 종종 침범되는 GI관의 영역은 소장, 및 항문-직장을 포함한 결장이다. CD의 염증 및 궤양 형성은 소장 및 대장 모두에서 장 벽의 모든 층을 통해 확장할 수 있다. CD의 일반적인 증상은 설사, 복통, 직장 출혈, 및 체중 감소뿐만 아니라 합병증, 예컨대 장 농양, 누공, 및 장 폐색을 포함한다. CD는 섬유성 협착형 (fibrostenotic) (협착성 (stricturing)), 또는 비천공성, 비협착성 (염증성), 또는 주로 천공성 (누공성)인 질환을 비롯하여 많은 상이한 방식으로 임상적으로 나타날 수 있다. 누공성 CD 환자는 보다 침습적인 질환 과정을 보이는 경향이 있다. 누공은 외부 (장피 또는 항문 주위) 또는 내부, 예컨대 장-장 (entero-enteral) 또는 장-낭 (entero-cystic)일 수 있다. CD 누공의 누적 발생률은 진단 10년 및 20년 후에 33% 및 50%이다.

[0003] 이환율은 누공성 질환을 갖는 환자에서 크게 증가하고, 환자의 삶의 질에 상당한 부정적인 영향을 야기한다. 항문 주위 누공은 대변 실금 (incontinence), 농양 형성 및 항문 협착을 유발할 수 있고, 추가로 통증, 농양 및 배액과 연관될 수 있다. 누공의 치료는 위치, 중증도, 및 이전의 수술 병력을 포함한 많은 인자에 따라 결정된다.

[0004] 종합적으로, CD 누공은 치료가 어렵고, 거의 자연적으로 치유되지 않으며, 빈번하게 수술을 필요로 한다. 생물학적 작용제의 도입 전에, 대부분의 누공은 수술에 의한 개입을 필요로 하였고, 누공 재발률은 30-40%로 추정되었다 (1-3). 현재의 치료 표준은 항생제 (메트로니다졸/시프로플록사신 - 제1선), 면역억제제 (6-MP/아자티오프린 - 제2선) 및 생물학적제 (항-TNF $\alpha$  - 제3선, 또는 '하향식 (top-down)' 제1선)이다. 칼시뉴린 억제제가 현재 시험되고 있다. 흥미롭게도, 누공성 크론병에 대한 몇몇 치료 표준 요법 (예를 들어 아자티오프린 및 6-MP)은 기형 발생성이다.

[0005] 생물학적제의 출현은 치료 처치 수단을 확대하였고, 의사의 누공 치료 목적을 누공 배액의 감소로부터 누관의 진정한 폐쇄로 변경하였다. 그러나, 대략 50%의 환자는 항-TNF $\alpha$ 에 반응하지 않고, 따라서 침습적인 수술 절차와 연관된 실금의 위험을 고려할 때, 크론병의 누공 치료를 위한 새롭고 개선된 요법에 대한 의학적 필요성이 충족되지 않은 상태이다.

**발명의 내용**

**[0006] 발명의 개요**

[0007] IL-13 매개 신호전달이 크론병에 걸린 환자에서 누공 형성에 작용할 수 있음이 밝혀졌다. 따라서, 본 발명은 크론병에 걸린 환자에서의 누공의 치료 또는 예방에 사용하기 위한, IL-13의 활성을 억제하거나 중화하는 항-IL-13 항체를 제공한다. 또한, 크론병에 걸린 환자에서의 누공의 치료 또는 예방을 위한 의학의 제조에 있어서, IL-13의 활성을 억제하거나 중화하는 항-IL-13 항체의 용도, 및 크론병에서의 누공 형성의 치료 또는 예방을 필요로 하는 대상체에게 IL-13의 활성을 억제하거나 중화하는 항-IL-13 항체를 투여하는 것을 포함하는, 크론병에 걸린 환자에서 누공의 형성을 치료 또는 예방하는 방법이 제공된다.

[0008] 바람직하게는, 본 발명의 항체는 (a) 서열 1, 2, 6 또는 7에 제시된 V<sub>H</sub> CDR1, (b) 서열 3 또는 8에 제시된 V<sub>H</sub> CDR2, (c) 서열 4, 5, 9 또는 10에 제시된 V<sub>H</sub> CDR3, (d) 서열 11, 16, 17 또는 18에 제시된 V<sub>L</sub> CDR1, (e) 서열

12 또는 19에 제시된  $V_L$  CDR2, (f) 서열 13, 14, 15, 20, 21 또는 22에 제시된  $V_L$  CDR3으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 CDR을 포함한다.

- [0009] 바람직하게는, 본 발명의 항체는 서열 7의 중쇄 가변 영역 CDR1; 서열 8의 중쇄 가변 영역 CDR2; 서열 10의 중쇄 가변 영역 CDR3; 서열 17의 경쇄 가변 영역 CDR1; 서열 19의 경쇄 가변 영역 CDR2; 및 서열 21의 경쇄 가변 영역 CDR3을 포함한다
- [0010] 제공되는 항체는 바람직하게는 서열 31에 제시된 중쇄 가변 영역 및 서열 33에 제시된 경쇄 가변 영역을 포함하고, 보다 바람직하게는 항체는 서열 41에 제시된 중쇄 및 서열 39에 제시된 경쇄를 포함한다.
- [0011] 제공된 항체는 바람직하게는 IL-13에  $1 \times 10^{-9}$  M 또는 그 미만의  $K_D$ 로 결합한다. 제공되는 항체는 바람직하게는 제약상 허용되는 담체와 함께 제제화된다.
- [0012] 본 발명의 제공되는 항체, 용도 또는 방법의 바람직한 실시양태에서, 항체는 소염 치료제와 순차적으로 또는 동시에 공동 투여된다.
- [0013] 본 발명은 항-IL-13 항체이거나 항-IL-13 항체를 포함하는 제약 조성물인 제1 성분, 및 지침서인 제2 성분을 포함하는 키트를 추가로 제공한다.
- [0014] 제공되는 키트는 시린지 또는 다른 전달 장치, 아주반트, 또는 제약상 허용되는 제제화 용액 중의 하나 이상을 포함하는 제3 성분을 추가로 포함할 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

- [0015] 도 1. TGFβ는 누공 결장 고유층 섬유모세포 (CLPF)로부터 IL-13의 분비를 유도하였다. 비-누공성 (n=2) 또는 누공성 질환 (n=3)이 있는 환자로부터 유래된 CLPF를 TGFβ (50 ng/ml)로 처리하였다. 막대그래프는 각각의 비처리 대조군과 비교한 (A) SNAIL1 또는 (B) SLUG의 mRNA 수준을 보여준다. (C) 비-누공 (n=3) 및 누공 (n=5) CLPF를 TGFβ로 처리하였다. 막대그래프는 세포 상청액 내의 IL-13 농도를 pg/ml 단위로 보여준다. (D) 누공 CLPF를 TGFβ (50 ng/ml) 또는 TNF (100 ng/ml)으로 처리하였고, PTPN2 및 로딩 대조군인 β-액틴의 단백질 수준은 대표적인 웨스턴 블롯 (Western blot) (n=3)에 의해 제시한다. 막대그래프는 상기 웨스턴 블롯에 제시된 세포의 세포 상청액 내의 IL-13 농도를 나타낸다. (E) T<sub>84</sub> 세포를 비-특이적 또는 PTPN2-특이적 siRNA 구축물로 형질감염시키고, TNF (100 ng/ml)로 처리하였다. 막대그래프는 세포 상청액 내의 IL-13 농도를 각각의 대조군의 %로 제시한다 (n=4). (F) TGFβ (50 g/ml)로 처리된 HT29 IEC에서 PTPN2 및 로딩 대조군인 β-액틴의 단백질 수준은 대표적인 웨스턴 블롯에 의해 제시한다 (n=3). 별표는 비처리된 비-누공 CLPF (C) 또는 각각의 대조군 (E)과의 유의한 차이를 표시한다 (\*=p<0.05). #=p<0.05 vs. 대조 siRNA 세포의 24 h TNF 처리.
- 도 2. CD 환자로부터의 누공 검체 내의 IL-13 및 IL-13Rα<sub>1</sub> 단백질. 수술에 의해 절제된 누공을 면역조직화학적으로 염색하였다. (A) IL-13은 누관을 덮고 있는 세포 (회색 화살표) 및 누공에 인접한 변형된 음와 (deformed crypt)의 IEC에서 분명하게 볼 수 있었다. 정상 외형을 갖는 음와의 IEC는 IL-13 염색을 거의 보이지 않는다 (백색 화살표). (B) IL-13Rα<sub>1</sub>은 IL-13과 유사한 염색 패턴을 보인다. 이것은 누관을 덮고 있는 세포 및 누공에 인접한 변형된 음와의 IEC에서 분명하게 검출가능하였다. 각각의 염색에 대해, 2명의 별개의 환자로부터의 2개의 상이한 누공으로부터의 영상이 제시되고, 모든 조사된 누공을 나타낸다 (n=7). 우측 컬럼의 사진은 좌측 컬럼의 사진 (배율: 5배)의 확대도 (배율 40배)를 나타낸다.
- 도 3. IL-13은 HT29 IEC에서 SLUG 및 β6-인테그린의 mRNA 수준을 유도한다. HT29 세포를 각각 30 min 또는 24 h 동안 IL-13 (100 ng/ml)으로 처리하였다. 막대그래프는 각각의 비처리 대조군과 비교한 (A) SLUG (n=3), (B) β6-인테그린 (n=3), (C) SNAIL1 (n=3), (D) TGFβ (n=3) 및 (E) PTPN2의 mRNA 수준을 나타낸다. (F) HT29 세포를 비-특이적 또는 SLUG-특이적 siRNA 구축물로 형질감염시키고, IL-13 (100 ng/ml)으로 24 h 동안 처리하였다. 막대그래프는 각각의 비처리 대조군과 비교한 β6-인테그린의 mRNA 수준을 나타낸다. 별표는 각각의 대조군과 비교시의 유의한 차이를 나타낸다 (\*=p<0.05, \*\*=p<0.01, \*\*\*=p<0.001). #=p<0.05 vs. 대조 siRNA 세포의 24 h 처리.
- 도 4. IL-13은 HT29 세포에서 STAT6 및 ERK1/2의 인산화 및 클라우딘-2의 발현을 유도한다. 세포를 각각 30 min 또는 24 h 동안 IL-13 (100 ng/ml)으로 처리하였다. (A) 대표적인 웨스턴 블롯은 인산화된 (Tyr<sup>641</sup>) 및 총

STAT6 및 인산화된 (Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>) 및 총 ERK1/2 (n=3)의 수준을 보여준다. (B) 대표적인 웨스턴 블롯은 β-카테닌 및 로딩 대조군인 β-액틴의 단백질 수준을 보여준다. 막대그래프는 3개의 유사한 실험의 밀도 측정 분석을 나타낸다. (C) 클라우딘-2 및 로딩 대조군인 β-액틴의 단백질 수준은 대표적인 웨스턴 블롯에 의해 제시된다. 3개의 유사한 실험의 밀도 측정 분석은 아래의 막대그래프에 의해 제시된다. (D) 대표적인 웨스턴 블롯은 E-카드헤린, 오클루딘 및 로딩 대조군인 β-액틴 (n=3)의 단백질 수준을 보여준다. 별표는 각각의 대조군에 대한 유의한 차이를 보여준다 (\*=p<0.01).

도 5. IL-13은 그렇지 않지만, TGFβ의 장기 투여는 HT29 IEC 구상체 (spheroid) 모델에서 EMT를 유도하였다. HT29 세포를 "현적 (hanging drop)"으로서 7 d일 동안 파종하였다. 이어서, 세포를 비처리된 상태로 유지하거나, TGFβ (20 ng/ml) 또는 IL-13 (100 ng/ml)으로 추가로 7 d 동안 처리하였다.. 비처리된 구상체는 세포 형성에서 임의의 변경을 보이지 않는다. TGFβ 처리 구상체는 7 d 후에 거의 완전히 해체되고, 이것은 이들 세포에서 EMT의 개시를 나타낸다. 이와 대조적으로, IL-13 처리는 분명한 세포 해체를 야기하지 않고, 이것은 IL-13이 상기 세포 모델에서 EMT를 유도하지 않음을 시사한다. 각각의 영상은 조건당 3개의 유사한 실험을 나타낸다. 컬럼 2 및 4의 사진은 컬럼 1 및 3 (배율: 20배)의 확대 (배율: 40배) 사진을 나타낸다.

도 6. TGFβ는 HT29 구상체에서 IL-13 및 SNAIL1의 mRNA 수준을 유도한다. HT29 구상체를 TGFβ (20 ng/ml)로 7일까지 처리하였다. 막대그래프는 각각의 대조군과 비교한 (A) IL-13, (B) SNAIL1, (C) β6-인테그린 및 (D) SLUG의 mRNA 수준을 나타낸다 (각각 n=3). 별표는 각각의 대조군과 비교시의 유의한 차이를 나타낸다 (\*=p<0.05, \*\*=p<0.01).

도 7. IL-13은 HT29 구상체에서 SLUG 및 β6-인테그린의 mRNA 수준을 유도한다. HT29 구상체를 TGFβ (20 ng/ml)로 7일까지 처리하였다. 막대그래프는 (A) SLUG, (B) β6-인테그린 및 (C) SNAIL1의 mRNA 수준을 나타낸다 (각각 n=3). (D) 대표적인 웨스턴 블롯은 비처리된 상태로 유지되거나 또는 IL-13 (100 ng/ml) 또는 TGFβ (20 ng/ml)으로 처리된 구상체에서 E-카드헤린, 클라우딘-2 및 로딩 대조군인 β-액틴의 단백질 수준을 보여준다 (각각 n=3). 별표는 각각의 대조군과 비교시의 유의한 차이를 나타낸다 (\*=p<0.05, \*\*\*=p<0.001).

도 8. SLUG, β6-인테그린 및 MMP-13의 기저 수준은 누공 CLPF에서 상승한다. 막대그래프는 각각 비-누공성 (n=3) 또는 누공성 (n=3) CD 환자로부터 유래된 CLPF에서 (A) SLUG 및 (B) β6-인테그린의 mRNA 수준을 보여준다. 이어서, 이들 CLPF를 IL-13 (100 ng/ml)로 각각 30 min 또는 24 h 동안 처리하였다. (C) 대표적인 웨스턴 블롯은 각각 비-누공성 (n=3) 또는 누공성 (n=3) CD 환자로부터 유래된 CLPF에서 인산화된 (Tyr<sup>641</sup>) 및 총 STAT6 및 인산화된 (Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>) 및 총 ERK1/2 (n=3)의 수준을 보여준다. (D) 대표적인 웨스턴 블롯은 각각 비-누공성 (n=3) 또는 누공성 (n=3) CD 환자로부터 유래된 CLPF에서 전장 및 절단된 (활성화된) MMP-13, 및 로딩 대조군인 β-액틴의 단백질 수준을 보여준다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0016] 병리생리학적으로, CD를 특징으로 하는 경벽성 (transmural) 염증은 환자에서 누공이 형성되도록 만들고, 손상된 상처 치유가 연관되는 것으로 보인다. 상기 내용을 추가로 조사하기 위해 전임상 동물 모델이 이용가능하지 않지만, 누공성 CD는 만성 경벽성 염증에서 발생하는 이상조절된 (dysregulated) 조직 재형성 과정을 수반하는 것으로 보인다. 조직 복구 및 속발성 섬유증은 단백질 분해성/과도한 세포외 매트릭스 (ECM) 분해 효소의 활성 감소와 함께 근섬유모세포 활성의 향상에 의한 ECM 합성에 의해 발생하고, 다른 한편으로는, 염증-유도 궤양 형성, 즉, 조직 파괴는 산소 대사체, 활성화된 면역 세포, 및 상향조절된 ECM 분해 효소, 예를 들어 매트릭스 메탈로프로테이나제 (MMP) 및 세린-프로테아제에 의해 유도된다.

[0017] CD와 관련하여 IL-13의 역할에 대한 현재의 이해를 기초로 할 때 (35), IL-13은 소염 특성을 가질 수 있다. 따라서, 항 IL-13 처리는 CD 환자에서 염증 활동성의 악화를 야기할 수 있다. 따라서, CD에서 항 IL-13 요법은 통상 선택 치료법으로 고려되지 않는다.

[0018] 현재, 상피-중간엽 이행 (EMT) 관련 사례는 CD-연관 누공 내에 및 그 주위에 존재함이 입증되었다 (6). EMT는 분화된, 극성 (polarized) 상피 세포로부터 근섬유모세포 표현형을 특징으로 하는 중간엽-유사 세포로의 전환을 나타낸다. 특이적인 특성으로서, 이들 EMT 세포는 이들의 세포간 연결을 하향조절하고, 상피 마커, 예컨대 E-카드헤린 또는 시토케라틴 8 및 20, 및 중간엽 마커, 예컨대 비멘틴 또는 α-SMA를 보인다 (7-8). 기능적 수준에 대해, EMT는 배발생, 장기 발달 및 상처 치유에 필수적이지만, 조직 섬유증 및 종양 성장 및 전이에도 연관



된다 (7-9).

- [0019] 약 2/3의 CD-연관 누공은 비-상피화된 누공이고, 근섬유모세포-유사 "이행 세포" (TC)로 덮인다 (6). CD-연관 누공의 관 내 또는 주위에서, 본 발명자들은 전사 인자 SNAIL1 및 SLUG의 핵 국제화 (이것은 이들의 활성화를 나타냄), 및  $\beta 6$ -인테그린, TGF  $\beta$  및 TNF의 수준 상승을 검출하였다. 이와 대조적으로, 본 발명자들은 상피 마커, 예컨대 세포 부착 분자인 E-카드헤린의 단백질 발현의 감소를 관찰하였다 (6). TGF  $\beta$ 는 EMT의 핵심 매개체로서 잘 알려져 있고, SNAIL1 발현을 유도하고, TNF와 유사하게 시험관 내에서 EMT를 유도할 수 있다 (10-14). 흥미롭게도,  $\beta 6$ -인테그린 및 SLUG는 종양 세포의 침습적 잠재력 및 EMT의 정도와 양의 상관성이 있었다 (15-17).
- [0020] 시토카인 IL-13은 주로 면역 세포, 특히 Th<sub>2</sub> 세포에서 분비된다 (18). 이것은 2개의 상이한 수용체, 즉 IL-13 수용체 알파 1 (IL-13R  $\alpha_1$ ) 및 IL-13R  $\alpha_2$ 에 결합할 수 있고, 따라서 IL-13R  $\alpha_1$ 은 주로 신호 전달 수용체로서, IL-13R  $\alpha_2$ 는 디코이 (decoy) 수용체로서 간주된다 (19). IL-13은 과다반응성 면역계를 특징으로 하는 질환, 예컨대 기도 과다반응성, 알러지성 염증 또는 비만세포증의 발병에 관련되었다 (18). 흥미롭게도, IL-13은 또한 장기 시스템, 예컨대 폐 또는 간에서 조직 섬유증의 발병에 관련되었다 (20-21). 상기 환경에서, IL-13은 콜라겐 합성에 중요한 프롤린의 생산을 유발하거나, 또는 섬유화 촉진 (pro-fibrotic) 효과를 촉발하는 섬유모세포에 대해 직접 작용할 수 있다 (18). IL-13의 추가의 섬유증-유도 경로는 TGF  $\beta$ 의 분비 및 활성화를 수반하고, 이것은 성장 인자가 시토카인의 하류 매개체일 수 있음을 나타낸다 (22). 이와 대조적으로, 종양 성장 및 침습에서 IL-13의 역할에 대한 데이터는 상충되고, 그 이유는 IL-13이 최근에 난소암 및 췌장암의 증가된 침습성 및 전이와 연관되었지만 (23-26), 또한 종양 성장, 예를 들어 유방 또는 신장 세포 암의 성장을 분명히 억제할 수 있기 때문이다 (27-28).
- [0021] 본 발명에서, 본 발명자들은 TGF  $\beta$ 가 CD 환자로부터 유래된 1차 인간 결장 고유층 섬유모세포 (CLPF)에서 SNAIL1 및 IL-13 mRNA 발현을 유도함을 입증한다. 높은 수준의 IL-13 및 IL-13R  $\alpha_1$ 은 CD-연관 누공의 관을 덮고 있는 TC에서 검출되었다. EMT의 장 상피 세포 (IEC) 모델에서, IL-13은 SLUG 및  $\beta 6$ -인테그린 수준을 유도한 반면, 장기 TGF  $\beta$  투여는 SNAIL1 및 IL-13 mRNA 발현의 동시 상승을 유발하였다. 그러나, 매개체는 반대되는 동역학으로 그의 효과를 나타낸다. 본 발명자들의 데이터는 IL-13이 CD-연관 누공에 존재하고 침습성 세포 성장과 연관된 유전자의 발현을 유도함을 보여주고, 이것은 상기 누공의 발병에서 시토카인의 중요한 역할을 시사한다.
- [0022] 본 발명자들은 이들 발견을, IL-13이 CD에서의 누공 형성을 동반하는 조직 재형성의 유도에 관여함을 나타내고, 따라서 항 IL-13 요법이 상기 환자 군에 대한 유용한 치료가 될 것으로 해석하였다.
- [0023] IL-13 폴리펩티드는 아래 서열을 갖는다. N-말단의 34개 아미노산 잔기 (이텔릭체)는 신호 펩티드이다. 따라서, 성숙 시토카인은 112개의 아미노산 잔기를 갖는다. 항-IL-13 항체는 성숙 폴리펩티드 상의 에피토프에 결합할 것이다.
- [0024] 인터루킨 13 아미노산 서열:
- ```

1  MHPLLNPLLL ALGLMALLLT TVIALTCLGG FASPGVPVPS TALRELIEEL
   VNITQNQKAP
61  LCNGSMVWSI NLTAGMYCAA LESLINVSGC SAIEKTQRML SGFCPHKVSA
   GQFSSLHVRD
121 TKIEVAQFVK DLLLHLKCLF REGRFN (서열 43)

```
- [0025]
- [0026] 본 발명에서 사용되는 항체
- [0027] 원칙적으로 IL-13의 활성을 억제하거나 중화하는 임의의 항-IL-13 항체가 본 발명에 사용될 수 있다. 상기 항체는 당업계에서 공지되어 있고, 예를 들어 W02005/007699, US6468528, W003007685, W003034984, US20030143199, US2004028650, US20040242841, US2004023337, US20040248260, US20050054055, US20050065327, W02006/124451, W02006/003407, W02005/062967, W02006/085938, W02006/055638, W02007/036745, W02007/080174 또는 W02007/085815를 참조한다.
- [0028] 바람직한 실시양태에서, 항체는 W02007/045477에 추가로 설명된 01951/G12 (서열 31 및 33)이다.
- [0029] 한 실시양태에서, 본 발명에서 사용되는 항체는 낮은 pM 범위로 IL-13에 대한 친화도를 갖고, 약 10 nM의 IC50

으로 IL-13 유도 신호전달을 억제한다. 낮은 pM 범위는, 본 발명자들에 의해 100 pM 이하, 바람직하게는 50 pM 이하, 바람직하게는 10 pM 이하, 보다 바람직하게는 1 pM 이하를 의미한다.

[0030] IL-13의 활성의 억제 또는 중화는 예를 들어 W02007/045477에 개시된 바와 같이 인간 폐 섬유모세포로부터 에오타신 방출을 사용하여 염증성 매개체 방출의 억제를 측정함으로써 평가될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 항 IL-13 항체는 10 nM, 5 nM, 2.5 nM, 1.0 nM, 0.5 nM, 또는 그 미만의 IC<sub>50</sub>으로 인간 폐 섬유모세포로부터의 IL-13 유도 에오타신 방출을 억제한다.

[0031] 바람직한 실시양태에서, 본 발명에서 사용되는 항체는 하나 이상의 다음 CDR을 포함한다. 표 3a 및 4a에 나열된 CDR은 카바트 (Kabat) 정의에 따라 결정되었다 (문헌 [E. Kabat et al, 1991, Sequences of Proteins of immunological Interest, 5<sup>th</sup> edition, public health Service, HHH, Bethesda, MD]).

[0032] <표 3>

| 항체        | HCDR1    | 서열 번호<br>HCDR1 | HCDR2    | 서열 번호<br>HCDR2 | HCDR3     | 서열 번호<br>HCDR3 |
|-----------|----------|----------------|----------|----------------|-----------|----------------|
| 01471/G6  | GFTFSNYG | 1              | IWYDGSN3 |                | VKGS GDIP | 4              |
| 03161/H2  | GFTFSNYG | 1              | IWYDGSN3 |                | VKGS GDIP | 4              |
| 01951/G12 | GFTFSSYG | 2              | IWYDGSN3 |                | ARLWFGDLD | 5              |
| 01771/E10 | GFTFSSYG | 2              | IWYDGSN3 |                | ARLWFGDLD | 5              |

[0033]

[0034] <표 3a>

| 항체        | HCDR1  | 서열 번호<br>HCDR1 | HCDR2              | 서열 번호<br>HCDR2 | HCDR3         | 서열 번호<br>HCDR3 |
|-----------|--------|----------------|--------------------|----------------|---------------|----------------|
| 01471/G6  | NYGMH6 |                | IHWYDGSNKYYADSVKG8 |                | GSGDIPFDY     | 9              |
| 03161/H2  | NYGMH6 |                | IHWYDGSNKYYADSVKG8 |                | GSGDIPFDY     | 9              |
| 01951/G12 | SYGMH7 |                | IHWYDGSNKYYADSVKG8 |                | LWFGDLDAFDI10 | 10             |
| 01771/E10 | SYGMH7 |                | IHWYDGSNKYYADSVKG8 |                | LWFGDLDAFDI10 | 10             |

[0035]

[0036] <표 4>

| 항체        | LCDR1  | 서열 번호<br>LCDR1 | LCDR2 | 서열 번호<br>LCDR2 | LCDR3     | 서열 번호<br>LCDR3 |
|-----------|--------|----------------|-------|----------------|-----------|----------------|
| 01471/G6  | QSVSSY | 11             | DA    | 12             | HQRSHWPPI | 13             |
| 03161/H2  | QSVSSY | 11             | DA    | 12             | HQRSHWPPI | 13             |
| 01951/G12 | QSVSSY | 11             | DA    | 12             | QQRSSWPPV | 14             |
| 01771/E10 | QSVSSY | 11             | DA    | 12             | HQRSSWPPI | 15             |

[0037]

[0038] <표 4a>

| 항체        | LCDR1       | 서열 번호<br>LCDR1 | LCDR2   | 서열 번호<br>LCDR2 | LCDR3       | 서열 번호<br>LCDR3 |
|-----------|-------------|----------------|---------|----------------|-------------|----------------|
| 01471/G6  | RASQSVSSYLA | 16             | DASNRAT | 19             | HQRSHWPPIFT | 20             |
| 03161/H2  | RASQSVSSYLA | 16             | DASNRAT | 19             | HQRSHWPPIFT | 20             |
| 01951/G12 | RAGQSVSSYLV | 17             | DASNRAT | 19             | QQRSSWPPVYT | 21             |
| 01771/E10 | RASQSVSSYLA | 18             | DASNRAT | 19             | HQRSSWPPIFT | 22             |

[0039]

[0040] 프레임워크 영역을 비롯한 상기 표의 항체의 서열을 아래에 제시한다. 예로서 항체 01951/G12의 가변 영역 (볼드체)을 포함하는 전체 IgG1 항체 경쇄 및 중쇄 불변 영역을 또한 아래에 제시한다.

[0041] 01471/G6 항체 서열

[0042] (i) HC 가변 영역

[0043] 01471/G6의 HC 가변 아미노산 서열은 서열 23에 제시되고, 서열 24에 제시된 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩된다.

```

E V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L
gaagtgacagctgggtggagctctgggggagggcgtgggtccagcctgggaggtccctgagactc 60

S C A A S G F T F S N Y G M H W V R Q A
tccctgtgcagcgtctggattcaccttcagtaactatggcatgcactgggtccgccaggct 120

P G K G L E W V A I I W Y D G S N K Y Y
ccaggcaaggggctggagtgggggcaattatcaggtatgatggagtaataaataactat 180

A D S V K G R F F I S R D N S K N T L Y
gcagactccgtgaagggccgattcaccatctccagagacaattccaagaacacgcctgat 240

L Q M N S L R A E D F A V Y Y C V K G S
ctgcaaatgaacagctctgagagccagggacacggctgtgtattactgtgtgaaaggatct 300

G D I P F D Y W G Q G T L V T (서열 23)
ggggatattccctttgactactggggccaggggaacctgggtcacc 345 (서열 24)
    
```

[0044]

[0045] (ii) LC 가변 영역

[0046] 01471/G6의 LC 가변 아미노산 서열은 서열 25에 제시되고, 서열 26에 제시된 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩된다.

```

E I V L T Q S P A T L S S S P G E R A T
gaaattggtgtgacgcagctctccagccaccctgtcttcgtctccaggggaaagagccacc 60

L S C R A S Q S V S S Y L A W Y Q Q K P
ctctcctgcagggccagtcagagtggttagcagctacttagcctgggtaccaacagaaacct 120

G Q A P R L L I Y D A S N R A T G I P A
ggccaggtcccaggtccctcctcctatgatgatcccaacagggccactggcatcccagcc 180

R F S G S G S G T D F T L T I S S L E F
aggttcagtgggcagtgggctctgggacagacttcactctccaccatcagcagccttagagcct 240

E D F A V Y Y C H Q R S R W P P I F T F
gaaatatttgaggtctattactgtccatcagcgtagccactggcctcccataatcacttcc 300

G P G T (서열 25)
ggccctgggacc 312 (서열 26)
    
```

[0047]

[0048] 03161/H2 항체

[0049] (i) HC 가변 영역

[0050] 03161/H2의 HC 가변 아미노산 서열은 서열 27에 제시되고, 서열 28에 제시된 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩된다.



```

E V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L
gaagtgcaagctggtgggagctctgggggagggcgtgggtccagcctgggaggtccctgagactc 60

S C A A S G F T F S N Y G M H W V R Q A
tccctgtgcagcgtctggattccaccttcagtaactatgggcatgcactgggtccggcaggtc 120

P G K G L E W V A I I W Y D G S N K Y Y
ccaggcaaggggctgggagtggtggcaatttatatggtatgatggaggaataaataactatc 180

A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y
gcagactccgtgaagggccgattcaccatctccagagacaattcccaagaacacgctgtat 240

L Q M N S L R A E D T A V Y Y C V R G S
ctggcaaatgaacagctctgagagccgaggacacggctgtgtattactgtgtgaaaggatct 300

G D I P F D Y W G Q G T L V F (서열 27)
ggggatattccctttgactactggggccaggggaacctggtcacc 345> (서열 28)

```

[0051]

[0052]

(ii) LC 가변 영역

[0053]

03161/H2의 LC 가변 아미노산 서열은 서열 29에 제시되고, 서열 30에 제시된 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩된다.

```

E I V L T Q S P A T L S S S P G E R A T
gaaattgtgtgaagcagtcocccagccaccctgtctctcgtctccaggggaaagagccacc 60

L S C R A S Q S V S S Y L A W Y Q Q K P
ctctcctgcagggccagtcagagtggttagcagctacttagcctggtagcccaacagaaacct 120

G Q A P R L L I Y D A S N R A T G T P A
ggccaggtcccaggtccctcactatgatgcatccaacagggccactggcaccocagcc 180

R F S G S G S G T D F T L T I S S L E P
aggttcagtgggcagtggtctgggacagacttcaactctcaccatcagcagccttagagcct 240

E D F A V Y Y C H Q R S H W P P I F T F
gaagattttgcagctctattactgtcatcagcgtagccactggcctcccatatccactttc 300

G P G T (서열 29)
ggccctgggacc 312 (서열 30)

```

[0054]

[0055]

01951/G12 항체 서열

[0056]

(i) HC 가변 영역

[0057]

01951/G12의 HC 가변 아미노산 서열은 서열 31에 제시되고, 서열 32에 제시된 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩된다.

```

E V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L
gaagtgcagctgggtggagctctggggaggcgtgggtccagcctgggaggtccctgagactc 60

S C A A S G F T P S S Y G M H W V R Q A
tccgtgtcagcgtctggattccacttcagtagctatggcatgcaactgggtccgccaggtc 120

P G K G L E W V A I I W Y D G S N K Y Y
ccaggcaagggctggagtggtggcaattatatgggtatgatggaagtaataaactat 180

A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y
gggactccgtgaagggccgattccaccatctccagagacaattccaagaacagctgcat 240

L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R L W
ctgcaaatgaacagccctgagagccgaggacacggctgtgtattactgtgcgaggtatgg 300

F G D L D A F D I W C Q G T M V T (서열 31)
ttccgggacttagatgcttttgatctctggggccaagggacaatggtcacc 351 (서열
32)

```

[0058]

[0059]

(ii) LC 가변 영역

[0060]

01951/G12의 LC 가변 아미노산 서열은 서열 33에 제시되고, 서열 34에 제시된 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩된다.

```

E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A I
gaaattgtgttgcagcagctccagccaccctgtctttgtctccaggggaagagccatc 60

L S C R A G Q S V S S Y L V W Y Q Q K P
cctctctgcagggccggtcagagtggttagcagttacttagtctggtaaccaacagaaacct 120

G Q A P R L L I Y D A S N R A T G I P A
ggccaggtcccaggccctcctcctcagatgcatccaacagggccactggcatcccagcc 180

R F S G S G S G T D F T L T I S S L E P
aggttcagtggtgggtctgggacagacttcaotctcccatcagcagcctagagcct 240

E D F A V Y Y C Q Q R S S W P P V Y T F
gaagattttgcagtttattactgtcagcagccagcagcctggcctccgggtgtacactttt 300

G Q G T (서열 33)
ggccaggggacc 312 (서열 34)

```

[0061]

[0062]

01771/E10 항체 서열

[0063]

(i) HC 가변 영역

[0064]

01771/E10의 HC 가변 아미노산 서열은 서열 35에 제시되고, 서열 36에 제시된 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩된다.

Q V Q L V Q S G G G V V Q P G R S L R L  
cagggtcagctgggtgcagtcctggggggggcgtggtccagcctgggagggtccctgagactc 60

S C A A S G F T F S S Y G M H W V E Q A  
tcctgtgcggcgtctggattccaccttcagtagctatggcatgcactgggtccggccaggtc 120

F G K G L E W V A I I W Y D G S N K Y Y  
ccaggcaaggggctggagtggtggcaatttatatgggtatgatggaagtaataaatactat 180

A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y  
ggcgactccgtgaagggccgattccaccctctccagagacaattccaaagaacagctatat 240

L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R L W  
ctacaaatgaacagcctggagaccgaggacacggctgtgtattactgtgagagctatgg 300

F G D L D A F D I W G Q G T M V T (서열 35)  
ttcggggacttagatgcttttgatatctggggccaagggacaatggctacc 351 (서열 36)

[0065]

[0066] (ii) LC 가변 영역

[0067] 01771/E10의 LC 가변 아미노산 서열은 서열 37에 제시되고, 서열 38에 제시된 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩된다.

E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A F  
gaaattgtgttgacgcagtcctccagccaccctgtctttgtctccaggggaaagagccacc 60

L S C R A S Q S V S S Y L A W Y Q Q K P  
ctctcctgcagggccagtcagaggttttagcagctacttagcctgggtaccacagaaacct 120

G Q A P R L L I Y D A S N R A T G I P A  
ggccaggtctccaggtctcccatctatgatgcacccagggccactgggatccagcc 180

R F S G S G S G T D F T L T I S S L E P  
aggttcagtgccagtggtctgggacagacttcactctccacatcagcagcctagagcct 240

E D F A V Y Y C H Q R S S W P P I F T F  
gaagattttggggttttactgtcatcagcgaagcagctggcccccgatattcacttcc 300

G P G T (서열 37)  
ggccctgggacc 312 (서열 38)

[0068]

[0069] 항체 01951/G12의 가변 영역 (폼드체)을 포함하는 전체 항체 IgG1 경쇄 서열

[0070] LC 아미노산 서열은 서열 39에 제시되고, 서열 40의 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩된다.

```

M S V L T Q V L A L L L L W L T G
1  ATGAGTGTGC TCACTCAGGT CCTGGCCTTG CTGCTGCTGT GGCTTACAGG

F R C E I V L T Q S P A T L S L S
51  TACGCCTTGT GAAATTGTGT TGACGCAGTC TCCAGCCACC CTGTCTTTGT

P G E R A I L S C R A G Q S V S
101  CTCCAGGGGA AAGAGCCATC CTCTCCTGCA GGGCCGGTCA GAGTGTTAGC

S Y L V W Y Q Q K P G Q A P R L L
151  AGTTACTTAG TCTGGTACCA ACAGAAACCT GGCCAGGCTC CCAGGCTCCT

I Y D A S N R A T G I P A R F S G
201  CATCTATGAT GCATCCAACA GGGCCACTGG CATCCAGCC AGGTTTAGTG

S G S G T D F T L T I S S L E P
251  GCAGTGGGTC TGGGACAGAC TTCACTCTCA CCATCAGCAG CCTAGAGCCT

E D F A V Y Y C Q Q R S S W P P V
301  GAAGATTTTG CAGTTTATTA CTGTCAGCAG CGCAGCAGCT GGCCCTCGGT

Y T F G Q G T K L E I K R T V A A
351  GTACACTTPT GGCCAGGGGA CCAAGCTTGA AATCAAACGA ACTGTGGCTG

P S V F I F P P S D E Q L K S G
401  CACCATCTGT CTTTCATCTTC CCGCCATCTG ATGAGCAGTT GAAATCTGGA

T A S V V C L L N N F Y P R E A K
451  ACTGCTCTTG TTGTGTGCTT GCTGAATAAC TTCTATCCCA GAGAGGCCAA

V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S
501  AGTACAGTGG AAGGTGGATA ACGCCCTCCA ATCGGTTAAC TCCAGGAGA

V T E Q D S K D S T Y S L S S T
551  GTGTACAGA GCAGGACAGC AAGGACAGCA CCFACAGCCT CAGCAGCACC

L T L S K A D Y E K H K V Y A C E
601  CTGACCTTGA GCAAAGCAGA CTACGAGAAA CACAAAGTCT ACGCCCTGGA

V T H Q G L S S P V T K S F N R G
651  AGTCACCCAT CAGGGCCCTGA GCTCGCCCTT CACAAAGAGC TTC AACAGGG

E C * (서열 39)
701  GAGAGTGTTA G (서열 40)

```

[0071]

[0072] 항체 01951/G12의 가변 영역 (봄드체)을 포함하는 전체 항체 IgG1 중쇄 서열

[0073] HC 아미노산 서열은 서열 41에 제시되고, 서열 42의 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩된다.

```

M A W V W F L P F L M A A A Q S V
1  ATGGCTTGGG TGTGGACCTT GCCATTCCTG ATGGCAGCTG CCCAAAGTGT

Q A E V Q L V E S G G G V V Q P G
51  CCAGGCAGAA GTGCAGCTGG TGGAGTCTGG GGGAGGCGTG GTCCAGCCTG

R S L R L S C A A S G F T F S S
101  GGGGTCCCT GAGACTCTCC TGTGCAGCGT CTGGATTCAC CTTCAGTAGC

Y G M H W V R Q A P G K G L E W V
151  TATGGCATGC ACTGGGTCGG CCAGGCTCCA GGCAGGGGC TGGAGTGGGT

A I I W Y D G S N K Y Y A D S V K
201  GGCAATTATA TGGTATGATG GAAGTAATAA ATACTATGCG GACTCCGTGA

G R F T I S R D N S K N T L Y L
251  AGGGCCGATT CACCATCTCC AGAGACAATT CCAAGAACAC GCTGTATCTG

Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R
301  CAATGAACA GCCTGAGAGC CGAGGACACG GCTGTGTATT ACTGTGCGAG

L W F G D L D A F D I W G Q G T M
351  GCTATGGTTC GGGGACTTAG ATGCCTTTGA TATCTGGGGC CAAGGGACAA

V T V S S A S T K G P S V F P L
401  TGGTCACCGT CTCTCAGCC TCCACCAAGG GCCCATCGGT CTTCCCCCTG

A P S S K S T S G G T A A L G C L
451  GCACCCCTCT CCAAGAGCAC CTCTGGGGGC ACAGCGGGCC TGGGTGCCT

V K D Y F P E P V T V S W N S G A
501  GGTCAAGGAC TACTTCCCG AACCGGTGAC GGTGTCTGG AACTCAGGCG

L T S G V N T F P A V L Q S S G
551  CCGTACCAG CGGCGTGCAC ACCTTCCCGG CTGTCCACAA GTCCCTAGGA
    
```

[0074]

L Y S L S S V V T V P S S S L G T  
 691 CFCCTACTCC TCAGCAGCGT CCFGACCGTG CCCCCAGCA GCFTGGGCAC  
  
 Q T Y I C N V N H K P S N T K V D  
 651 CCAGACCTAC ATCTGCAACG TGAATCACAA GCCCAGCAAC ACCAAGGTGG  
  
 K R V E P K S C D K T H T C P P  
 701 ACAAGAGAGT TGAGCCCAAA TCFGTGACA AACTCACAC ATGCCACCG  
  
 C F A P E L L G G P S V F L F P P  
 751 TGCCCAGCAC CTGAACCTCT GGGGGGACCG TCAGTCTTC TCFTCCCCCC  
  
 K P K D T L M I S R T P E V T C V  
 801 AAAACCCAAG GACACCTCA TGATCTCCCG GACCCCTGAG GTCACATGG  
  
 V V D V S H E D P E V K F N W Y  
 851 TGGTGGTGGG CCFGAGCCAC GAAGACCCCG AGGTCAAGTT CAACTGGTAC  
  
 V D G V E V H N A K T K P R E E Q  
 901 GTGGACGGCG TGGAGGTCCA TAATGCCAAG ACAANGCCGC GGGAGGAGCA  
  
 Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D  
 951 GTACAACAGC ACGTACCGTG TGGTCAGCGT CCTCACCGTC CTGCACCAGG  
  
 W L N G K E Y K C K V S N K A L  
 1001 ACTGGCTGAA TGGCAAGGAG TACAAGTGCA AGCTCTCCAA CAAAGCCCTC  
  
 P A P I E K T I S K A K G Q P R E  
 1051 CCAGCCCCCA TCGAGAAAAC CATCTCCAAA GCCAAAGGBC AGCCCGGAGA  
  
 P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q  
 1101 ACCACAGGTS TACACCCCTGC CCCCATCCCG GAGAGGAGATG ACCAAGAACC  
  
 V S L T C L V K G F Y P S D I A  
 1151 AGCTCAGCCT GACCTGCCCTG GTCAAAGGCT TCTATCCAG CGACATCGCC  
  
 V E W E S N G Q P E N N Y K T T P  
 1201 GTGGAGTGGG AGAGCAATGG GCAGCCGGAG AACAACTACA AGACCAGGCC  
  
 P V L D S D G S F P L Y S K L T V  
 1251 TCCCCTGCTG GACTCCGACG GCTCCCTCTT CCTCTATAGC AAGCTCACCG  
  
 D K S R W Q Q G N V F S C S V M  
 1301 TGGACAAGAG CAGGTGGCAG CAAGGGAACG TCTTCTCATG CTCCCTGATG  
  
 H E A L H N E Y T Q K S L S L S P  
 1351 CATGAGGCTC TGCACAACCA CTACACGGCAG AAGAGCCCTCT CCTGTGCCCC  
  
 G K \* (서열 41)  
 1401 GGGTAAATGA (서열 42)

[0075]

[0076]

[0077]

[0078]

하나 이상의 VH 및/또는 VL CDR 영역 서열을 본 발명에서 유용한 모노클로날 항체에 대해 본원에서 제시된 CDR 서열로부터의 구조상 유사한 서열로 치환함으로써 신규한 VH 및 VL 서열이 생성될 수 있음을 당업자는 쉽게 알 수 있을 것이다.

본원에서 사용되는 용어 "항체"는 상기 설명된 바와 같은 에피토프, 예를 들어 IL-13 상에서 발견되는 에피토프를 특이적으로 결합하고 인식하는 면역글로불린 유전자 또는 그의 단편으로부터의 프레임워크 영역을 포함하는 폴리펩티드를 의미한다. 따라서, 용어 항체는 단일쇄 전체 항체를 비롯한 전체 항체 (예컨대 모노클로날, 키메라, 인간화 및 인간 항체), 및 그의 항원 결합 단편을 포함한다. 용어 "항체"는 가변 영역을 단독으로, 또는



항체 분자의 힌지 영역, CH<sub>1</sub>, CH<sub>2</sub>, 및 CH<sub>3</sub> 도메인으로 이루어지는 폴리펩티드 요소 중의 전부 또는 일부와 조합하여 포함할 수 있는 단일쇄 항체를 비롯한 항원 결합 항체 단편을 포함한다. 또한, 상기 정의에는 가변 영역 및 힌지 영역, CH<sub>1</sub>, CH<sub>2</sub>, 및 CH<sub>3</sub> 도메인의 임의의 조합물이 포함된다. 항체 단편은 예를 들어 Fab, Fab' 및 F(ab')<sub>2</sub>, Fd, 단일쇄 Fv (scFv), 단일쇄 항체, 디술포드-연결된 Fv (sdFv) 및 V<sub>L</sub> 또는 V<sub>H</sub> 도메인을 포함하는 단편을 포함하고 이로 제한되지 않는다. 그 예는 다음을 포함한다: (i) V<sub>L</sub>, V<sub>H</sub>, C<sub>L</sub> 및 CH<sub>1</sub> 도메인으로 이루어지는 1가 단편인 Fab 단편; (ii) 힌지 영역에서 디술포드 브릿지에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인 F(ab')<sub>2</sub> 단편; (iii) V<sub>H</sub> 및 CH<sub>1</sub> 도메인으로 이루어지는 Fd 단편; (iv) 항체의 단일 아암 (arm)의 V<sub>L</sub> 및 V<sub>H</sub> 도메인으로 이루어지는 Fv 단편, (v) V<sub>H</sub> 도메인으로 이루어지는 dAb 단편 (문헌 [Ward et al., Nature 341: 544-546. 1989]; [Muyldermans et al., TIBS 24: 230-235, 2001]); 및 (vi) 단리된 상보성 결정 영역 (CDR). 용어 "항체"는 단일 도메인 항체, 맥시바디 (maxibody), 미니바디 (minibody), 인트라바디 (intrabody), 디아바디 (diabody), 트리아바디 (triabody), 테트라바디 (tetrabody), v-NAR 및 bis-scFv를 포함한다 (예를 들어, 문헌 [Hollinger & Hudson, Nature Biotechnology. 23, 9, 1126-1136 (2005)] 참조). 항체의 항원 결합 부분은 폴리펩티드, 예컨대 피브로넥틴 타입 III (Fn3)을 기재로 한 스캐폴드 내에 이식될 수 있다 (피브로넥틴 폴리펩티드 모노바디 (monobody)가 기재된 미국 특허 번호 6,703,199 참조). 항원 결합 부분은 상보성 경쇄 폴리펩티드와 함께 한 쌍의 항원 결합 영역을 형성하는, 한 쌍의 직렬 (tandem) Fv 세그먼트 (VH-CH1-VH-CH1)를 포함하는 단일쇄 분자 내에 포함될 수 있다 (문헌 [Zapata et al., Protein Eng. 8(10):1057-1062 (1995)]; 및 미국 특허 번호 5,641,870).

- [0079] 바람직하게는, 본 발명에서 사용되는 항체는 IL-13에 특이적으로 결합한다. 바람직하게는, 본 발명에서 사용되는 항체는 IL-13 이외의 항원과 교차반응하지 않는다.
- [0080] 본원에서 사용되는 바와 같이, "IL-13에 특이적으로 결합하는" 항체는  $1 \times 10^{-8}$  M 또는 그 미만,  $1 \times 10^{-9}$  M 또는 그 미만, 또는  $1 \times 10^{-10}$  M 또는 그 미만의 K<sub>D</sub>로 IL-13에 결합하는 항체를 의미하고자 의도된다. "IL-13 이외의 항원과 교차-반응하는" 항체는  $0.5 \times 10^{-8}$  M 또는 그 미만,  $5 \times 10^{-9}$  M 또는 그 미만, 또는  $2 \times 10^{-9}$  M 또는 그 미만의 K<sub>D</sub>로 항원에 결합하는 항체를 의미하고자 의도된다.
- [0081] 다른 실시양태에서, 본 발명에서 사용되는 항체는 상기 언급된 하나 이상의 항체를 교차-차단하는 것이다. "교차-차단하다"는 본 발명자들에 의해 IL-13에 대한 또 다른 항체의 결합을 저해하는 항체를 의미한다. 상기 저해는 예를 들어 Biacore 또는 ELISA를 사용하는 경쟁 검정을 사용하여 검출할 수 있다. 상기 경쟁 검정은 WO2008/133722에 기재되어 있다.
- [0082] 치료의 모니터링 방법
- [0083] 항-IL-13 항체를 사용한 CD 환자의 누공 치료가 성공했는지를 모니터링하는 방법이 본 발명의 범위 내에 포함된다. 가장 정확한 것은 아니지만 가장 간단한 방법은 치료되는 대상체가 증상의 개선을 인지했는지의 여부일 것이다.
- [0084] 다른 방법은 다양한 바이오마커, 예컨대 TGF-β, 페리오스틴, 에오타신-1, 프로콜라겐 타입 I C-말단 프로펩티드 (PICP) 및 콜라겐 타입 III의 N-말단 프로-펩티드 (PIIINP), IL-4의 발현, 및 STAT6의 인산화 정도를 검출하는 것을 포함한다.
- [0085] 상기 방법은 치료되는 대상체에서 선택된 바이오마커의 발현 수준을 평가하고 상기 발현 수준을 대조 수준 (예컨대 치료 전의 대상체에서의 발현 수준 또는 비처리된 대상체에서의 수준)과 비교하는 것을 포함하고, 여기서 상기 대조 수준과 상이한 수준은 치료된 대상체가 치료에 반응함을 나타낸다.
- [0086] 이 방법은 다음 단계를 포함할 수 있다:
- [0087] a) 환자에서 누공 형성을 표시하는 바이오마커의 발현을 측정하는 단계;
- [0088] b) 환자를 항-IL-13 항체로 치료하는 단계;
- [0089] c) 치료 후에 환자에서 상기 바이오마커의 발현을 측정하는 단계;
- [0090] d) 치료전 발현 수준에 비해 치료 후에 바이오마커 발현의 변화를 검출하고, 여기서 상기 발현의 변화는 항-IL-

13 항체 치료에 대한 반응을 나타내는 것인 단계.

- [0091] 상기 측정 단계 (a) 및 (c)는 환자로부터 얻어진 조직 샘플에 대해 수행할 수 있다. 분석되는 조직 샘플은 혈액, 소변, 타액 또는 조직 생검으로부터의 다른 생검조직일 수 있다.
- [0092] 별법으로서, 단계 (d)는 치료 전후의 바이오마커 발현을 대조 바이오마커 발현 수준과 비교하는 것을 포함할 수 있고, 여기서 대조 수준과의 차이는 항-IL-13 항체를 사용한 치료에 대한 반응을 나타낸다. 상기 대조 수준은 CD가 없는 환자, 위약으로 처리한 환자, 또는 통상적인 항-누공 의약으로 처리한 환자로부터의 수준일 수 있다.
- [0093] 측정될 수 있는 바이오마커의 예는 TGF- $\beta$ , 페리오스틴, 에오타신-1, PICP 및 PIIINP, IL-4, 및 STAT6의 인산화 정도를 포함하고 이로 제한되지 않는다.
- [0094] 제약 조성물
- [0095] 본 발명에서 사용되는 항체는 일반적으로 제약상 허용되는 담체와 함께 제제화되는, 하나의 모노클로날 항체 또는 모노클로날 항체의 조합물을 함유하는 조성물, 예를 들어, 제약 조성물로서 제제화된다. 예를 들어, 본 발명에서 사용되는 제약 조성물은 IL-13의 상이한 에피토프에 결합하거나 상보 활성을 갖는 항체의 조합물을 포함할 수 있다.
- [0096] 또한, 본 발명에서 사용되는 제약 조성물은 조합 요법으로, 즉, 다른 작용제와 조합되어 투여될 수 있다. 예를 들어, 조합 요법은 소염제와 조합된 항-IL-13 항체를 포함할 수 있다. 상기 조합물은 동시에 또는 순차적으로 투여될 수 있다. 순차적으로 투여될 경우, 각각의 작용제의 투여 사이의 시간은 1주 이하 (예를 들어 1일 이하, 12시간 이하, 6시간 이하, 1시간 이하, 30분 이하)일 수 있다. 조성물은 바람직하게는 생리학적 pH에서 제제화된다.
- [0097] 본원에서 사용되는 "제약상 허용되는 담체"는 생리학상 적합한 임의의 및 모든 용매, 분산 매질, 코팅, 항균제 및 항진균제, 등장성 및 흡수 지연제 등을 포함한다. 담체는 정맥내, 근육내, 피하, 비경구, 척수 또는 표피 투여 (예를 들어, 주사 또는 주입에 의해)에 적합하여야 한다. 투여 경로에 따라, 활성 화합물, 즉, 항체, 면역접합체, 또는 이중특이적 분자는 화합물을 불활성화할 수 있는 산 및 다른 천연 조건의 작용으로부터 화합물을 보호하기 위해 물질 내에 코팅될 수 있다.
- [0098] 상기 제약 조성물은 또한 제약상 허용되는 항산화제를 포함할 수 있다. 제약상 허용되는 항산화제의 예는 수용성 항산화제, 예컨대 아스코르브산, 시스테인 염산염, 중황산나트륨, 메타중아황산나트륨, 아황산나트륨 등; 지용성 항산화제, 예컨대 아스코르빌 팔미테이트, 부틸화 히드록시아니솔 (BHA), 부틸화 히드록시톨루엔 (BHT), 레시틴, 프로필 갈레이트, 알파-토코페롤 등; 및 금속 킬레이팅제, 예컨대 시트르산, 에틸렌디아민 테트라아세트산 (EDTA), 소르비톨, 타르타르산, 인산 등을 포함한다.
- [0099] 이들 조성물은 또한 아주반트, 예컨대 보존제, 습윤제, 유화제 및 분산제를 함유할 수 있다. 미생물 존재의 방지는 상기한 바와 같은 멸균 절차에 의해, 및 다양한 항균제 및 항진균제, 예를 들어, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀 소르브산 등의 포함에 의해 보장될 수 있다. 등장화제, 예컨대 당, 염화나트륨 등을 조성물 내로 포함시키는 것이 또한 바람직할 수 있다. 추가로, 주사가 가능한 제약 형태의 장기간 흡수는 흡수 지연제, 예컨대, 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴의 포함에 의해 유도될 수 있다.
- [0100] 제약상 허용되는 담체는 멸균 주사가 가능 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균 수용액 또는 수분산액 및 멸균 분말을 포함한다. 제약상 활성 물질에 대한 상기 매질 및 작용제의 사용은 당업계에 공지되어 있다. 임의의 통상적인 매질 또는 작용제가 활성 화합물과 비상용성인 경우를 제외하고, 본 발명의 제약 조성물에서 그의 사용이 고려된다. 보충 활성 화합물이 또한 조성물에 포함될 수 있다.
- [0101] 치료 조성물은 일반적으로 멸균성이고 제조 및 저장 조건 하에 안정해야 한다. 조성물은 용액, 마이크로에멀전, 리포솜, 또는 높은 약물 농도에 적합한 다른 규칙적인 (ordered) 구조로서 제제화될 수 있다. 담체는 예를 들어, 물, 에탄올, 폴리올 (예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 및 이들의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 적절한 유동성은 예를 들어 코팅, 예컨대 레시틴의 사용에 의해, 분산액의 경우에 요구되는 입자 크기의 유지에 의해 및 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 많은 경우에, 등장화제, 예를 들어, 당, 다가알콜, 예컨대 만니톨, 소르비톨 또는 염화나트륨을 조성물 내에 포함시킬 수 있다. 주사가 가능한 조성물의 장기간 흡수는 흡수 지연제, 예컨대 모노스테아레이트 염 및 젤라틴을 조성물에 포함시킴으로써 유도될 수 있다.
- [0102] 멸균 주사가 가능 용액은 활성 화합물을 요구되는 양으로, 필요한 경우 상기 열거된 성분의 하나 또는 조합물과 함

게 적합한 용매 내에 포함시킨 후, 멸균여과함으로써 제조할 수 있다. 일반적으로, 분산액은 기본적인 분산 매질 및 상기 열거된 것 중의 요구되는 다른 성분을 함유하는 멸균 비히클에 활성 화합물을 포함시킴으로써 제조한다. 멸균 주사가능 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우에, 제조 방법은 활성 성분 + 그의 앞서 멸균-여과된 용액으로부터의 임의의 추가의 목적하는 성분의 분말을 생성하는 진공 건조 및 동결-건조 (동결건조)이다.

[0103] 단일 투여 형태를 생성하기 위해 담체 물질과 조합될 수 있는 활성 성분의 양은 치료되는 대상체, 및 특정 투여 방식에 따라 상이할 것이다. 단일 투여 형태를 생성하기 위해 담체 물질과 조합될 수 있는 활성 성분의 양은 일반적으로 치료 효과를 생성하는 조성물의 양일 것이다. 일반적으로, 100% 기준으로, 상기 양은 제약상 허용되는 담체와 조합되어 약 0.01% 내지 약 99%의 활성 성분, 약 0.1% 내지 약 70%, 또는 약 1% 내지 약 30%의 활성 성분일 것이다.

[0104] 투여 요법은 최적의 목적하는 치료 (예를 들어, 치료 반응)를 제공하도록 조정된다. 예를 들어, 단일 볼러스 (bolus)가 투여될 수 있거나, 몇 개의 분할 용량이 시간 경과에 걸쳐 투여될 수 있거나, 용량은 치료 상황의 응급성에 따라 비례하여 감소 또는 증가될 수 있다. 투여 용이성 및 투여량의 균일성을 위해 비경구 조성물을 투여 단위 형태로 제제화하는 것이 특히 유리하다. 본원에서 사용되는 투여 단위 형태는 치료할 대상체에게 단일 투여량으로 적합한 물리적으로 구분되는 단위를 의미하고, 각각의 단위는 요구되는 제약상 담체와 함께 목적하는 치료 효과를 생성하도록 계산된 소정량의 활성 화합물을 함유한다. 본 발명의 투여 단위 형태의 세부 내용은 활성 화합물의 특유한 특성 및 달성되는 특정 치료 효과, 및 개체의 감수성 치료를 위한 상기 활성 화합물의 배합 기술에 고유한 제한에 의해 좌우되고 직접적으로 의존한다.

[0105] 항체의 투여를 위해, 투여량은 약 0.0001 내지 약 100 mg/kg (피투여자 체중), 보다 대체로는 약 0.01 내지 약 5 mg/kg (피투여자 체중)이다. 예를 들어 투여량은 약 0.3 mg/kg (체중), 약 1 mg/kg (체중), 약 3 mg/kg (체중), 약 5 mg/kg (체중), 약 10 mg/kg (체중), 약 20 mg/kg (체중), 약 30 mg/kg (체중) 또는 약 1 - 약 30 mg/kg 또는 약 1 - 약 10 mg kg의 범위 내일 수 있다. 예시적인 치료 요법은 매주 약 1회, 2주마다 약 1회, 3주마다 약 1회, 4주마다 약 1회, 매달 약 1회, 3개월마다 약 1회, 3 내지 6개월마다 약 1회, 6개월마다 약 1회 또는 매년 약 1회의 투여를 수반한다. 본 발명의 항-IL-13 항체의 투여 요법은 약 1 mg/kg (체중) 또는 약 3 mg/kg (체중)의 정맥내 투여를 포함하고, 항체는 다음 투여 스케줄 중의 하나를 사용하여 투여된다: 6회 투여에 대해 약 4주마다, 이어서 약 3개월마다; 약 3주마다; 약 3 mg/kg (체중) 1회, 이어서 3주마다 약 1 mg/kg (체중).

[0106] 일부 방법에서, 상이한 결합 특이성을 갖는 2개 이상의 모노클로날 항체를 동시에 또는 순차적으로 투여하고, 이 경우에 투여되는 각각의 항체의 투여량은 지시된 범위 내에 있다. 조합물은 항-IL4 항체와 조합한 항-IL-13 항체일 수 있다. 항체는 대체로 다수회로 투여된다. 단일 투여 사이의 간격은 예를 들어, 매주, 매월, 3개월마다, 6개월마다 또는 매년일 수 있다. 간격은 또한 환자에서 표적 항원에 대한 항체의 혈액 수준을 측정함으로써 지시될 때 불규칙할 수 있다. 일부 방법에서 투여량은 약 1 - 약 1000  $\mu$ g/ml, 및 일부 방법에서 약 25 - 약 300  $\mu$ g/ml의 혈장 항체 농도를 달성하도록 조정된다.

[0107] 별법으로, 항체를 지속 방출 제제로서 투여할 수 있고, 이 경우에 덜 빈번한 투여가 요구된다. 투여량 및 빈도는 환자에서 항체의 반감기에 따라 변한다. 일반적으로, 인간 항체가 가장 긴 반감기를 보이고, 그 다음은 인간화 항체, 키메라 항체, 및 비인간 항체 순이다. 투여량 및 투여 빈도는 치료가 예방적인지 치료적인지에 따라 변할 수 있다. 예방 용도에서, 비교적 낮은 투여량을 장시간에 걸쳐 비교적 덜 빈번한 간격으로 투여한다. 일부 환자는 그들의 나머지 생애 동안 계속 치료를 받는다. 치료 용도에서, 질환의 진행이 감소 또는 종결될 때까지 또는 환자가 질환 증상의 부분적 또는 완전한 개선을 보일 때까지 비교적 짧은 간격의 비교적 높은 투여량이 때때로 요구된다. 그 후에, 환자는 예방적 요법을 투여받을 수 있다.

[0108] 본 발명의 제약 조성물 내의 활성 성분의 실제 투여량 수준은 환자에 대한 독성이 없이 특정 환자, 조성물, 및 투여 방식에 대해 목적하는 치료 반응을 달성하기 위해 효과적인 활성 성분의 양을 얻도록 변할 수 있다. 선택된 투여량 수준은 사용되는 본 발명의 특정 조성물, 또는 그의 에스테르, 염 또는 아미드의 활성도, 투여 경로, 투여 시간, 사용되는 특정 화합물의 배출 속도, 치료의 지속 기간, 사용된 특정 조성물과 함께 사용되는 다른 약물, 화합물 및/또는 물질, 치료받는 환자의 연령, 성별, 체중, 상태, 전반적 건강 및 이전의 의료 이력, 및 의학 분야에 잘 공지된 유사한 인자를 포함한 다양한 약동학 인자에 따라 결정될 것이다.

[0109] 본 발명의 항-IL-13 항체의 "치료 유효 투여량"은 질환 증상의 중증도의 감소, 질환 증상이 없는 기간의 빈도와 지속기간의 증가, 또는 질환 이환으로 인한 손상 또는 장애의 예방을 일으킬 수 있다.

- [0110] 본 발명에 사용되는 조성물은 당업계에 공지된 다양한 방법 중 하나 이상을 이용하여 하나 이상의 투여 경로에 의해 투여할 수 있다. 숙련된 당업자라면 이해할 수 있듯이, 투여 경로 및/또는 투여 방식은 목적하는 결과에 따라 변할 것이다. 본 발명의 항체를 위한 투여 경로는 예를 들어 주사 또는 주입에 의한 정맥내, 근육내, 피부내, 복강내, 피하, 척수 또는 다른 비경구 투여 경로를 포함한다. 본원에서 사용되는 구문 "비경구 투여"는 대체로 주사에 의한, 장관 및 국소 투여 이외의 투여 방식을 의미하고, 비제한적으로 정맥내, 근육내, 동맥내, 수막내, 관절낭내, 안구내, 심장내, 피부내, 복강내, 경기관, 피하, 표피하, 관절내, 관절낭하, 거미막하, 척수내, 경막외 및 흉골내 주사 및 주입을 포함한다. 정맥내 및 피하 투여가 특히 바람직하다.
- [0111] 별법으로, 본 발명에 사용되는 항체는 비-비경구 경로로, 예컨대 국소, 표피 또는 점막 투여 경로, 예를 들어, 비강내, 경구, 질, 직장, 설하 또는 국소 투여할 수 있다.
- [0112] 활성 화합물은 임플란트 (implant), 경피 패치, 및 미세캡슐화 전달 시스템을 비롯한 제어 방출 제제와 같이, 신속한 방출에 대해 화합물을 보호할 담체를 사용하여 제조할 수 있다. 생분해성 생물적합성 중합체, 예컨대 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리무수물 (polyanhydride), 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르, 및 폴리락트산을 사용할 수 있다. 그러한 제제의 제조를 위한 많은 방법이 특허받거나 당업자에게 일반적으로 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978] 참조).
- [0113] 치료 조성물은 당업계에 공지된 의학 장치를 사용하여 투여할 수 있다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 조성물을 무침 피하 주사 장치, 예컨대 미국 특허 번호 5,399,163; 5,383,851; 5,312,335; 5,064,413; 4,941,880; 4,790,824 또는 4,596,556에 제시된 장치를 사용하여 투여할 수 있다. 본 발명에 유용한 잘 공지된 임플란트 및 모듈 (module)의 예는 의약을 제어된 속도로 분배하기 위한 이식가능 마이크로-주입 펌프를 보여주는 US4,487,603; 피부를 통해 의약을 투여하기 위한 치료 장치를 보여주는 US4,486,194; 의약을 정확한 주입 속도로 전달하기 위한 의약 주입 펌프를 보여주는 US4,447,233; 연속 약물 전달을 위한 가변 유동 이식가능 주입 기구를 보여주는 US4,447,224; 다수-챔버 구획을 갖는 삼투 약물 전달 시스템을 보여주는 US4,439,196; 및 삼투 약물 전달 시스템을 보여주는 US4,475,196을 포함한다. 이들 특허를 본원에 참조로 포함한다. 많은 다른 그러한 임플란트, 전달 시스템 및 모듈은 당업자에게 공지되어 있다.
- [0114] 또한, 본 발명은 항-IL-13 항체 또는 상기한 제약 조성물인 제1 성분, 및 지침서인 제2 성분을 포함하는 키트를 제공한다. 한 실시양태에서, 상기 지침서는 누공성 CD를 치료하기 위한 항체의 사용을 교시한다. 키트는 시린지 또는 다른 전달 장치, 아주반트, 또는 제약상 허용되는 제제화 용액 중 하나 이상을 포함하는 제3 성분을 추가로 포함할 수 있다.
- [0115] 일반론
- [0116] 용어 "포함하는"은 "포함하는"뿐만 아니라 "이루어지는"을 의미하고, 예를 들어 X를 "포함하는" 조성물은 독립적으로 X로 이루어질 수 있거나, 추가 물질, 예를 들어 X + Y를 포함할 수 있다.
- [0117] 수치값 x에 관련한 용어 "약"은 예를 들어,  $x \pm 10\%$ 를 의미한다.
- [0118] 2개의 아미노산 서열 사이의 % 서열 동일성에 대한 언급은 정렬될 때 그 백분율의 아미노산이 2개의 서열을 비교할 때 동일한 것을 의미한다. 상기 정렬 및 % 상동성 또는 서열 동일성은 당업계에 공지된 소프트웨어 프로그램, 예를 들어 문헌 [Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel et al., eds., 1987) Supplement 30]의 섹션 7.7.18에 설명된 것을 이용하여 결정할 수 있다. 바람직한 정렬은 12의 갭 개방 페널티 및 2의 갭 연장 페널티, 62의 BLOSUM 매트릭스를 갖는 어파인 (affine) 갭 탐색을 이용하는 스미쓰-워터만 (Smith-Waterman) 상동성 탐색 알고리즘에 의해 결정된다. 스미쓰-워터만 상동성 탐색 알고리즘은 문헌 [Smith & Waterman (1981) Adv. Appl. Math 2. 482-489]에 개시되어 있다.
- [0119] 실시예
- [0120] 실시예 1
- [0121] **TGFβ는 CD 누공 CLPF로부터 IL-13 분비를 유도한다.**
- [0122] 최근에 EMT-연관 전사 인자 SNAIL1이 CD-연관 누공의 누관 옆의 TC 세포에서 강하게 검출가능한 것으로 나타났다 (Scharl, in press). 따라서, 본 발명자들은 TGFβ가 CD 환자로부터 유래한 CLPF에서 SNAIL1 수준을 유도할 수 있는지의 여부를 처음 연구하였다. 비-누공성 질환이 있는 환자로부터의 CLPF에서, TGFβ 처리는 SNAIL1 mRNA 발현의 2배 증가를 유도하였고, 상기 효과는 누공성 질환이 있는 환자로부터 CLPF에서 강화되었다 (약 6배



증가; 도 1A). 이와 대조적으로, SLUG mRNA 수준은 누공성 또는 비-누공성 CLPF에서 TGF $\beta$  처리에 의해 영향을 받지 않았다 (도 1B). 비-누공 CLPF에서, TGF $\beta$ 는 IL-13의 분비를 유도하기 위해 충분하지 않았다. 그러나, 누공 CLPF는 IL-13의 명백하게 상승된 기초 분비를 특징으로 하였고 (66.2+/-14.6 pg/ml 대 11+/-10 pg/ml), 24 h 동안 TGF $\beta$ 의 첨가는 세포 상청액에서 IL-13 분비의 강하고 유의한 증가를 일으켰다 (455+/-193.6 pg/ml) (도 1C). 이어서, 본 발명자들은 CD 발병에 중요한 역할을 하는 TNF가 또한 누공 CLPF로부터 IL-13 분비를 유도할 수 있을 것인지 시험하였다. 그러나, TNF로 누공 CLPF를 처리하면 IL-13 분비를 상승시키기 위해 충분하지 않았지만, 단백질 티로신 포스파타제 비-수용체 타입 2 (PTPN2)의 단백질 발현을 유도하였다. 이와 대조적으로, IL-13 분비를 유도할 수 있는 TGF $\beta$ 는 PTPN2 단백질 수준을 유도하였다 (도 1D). PTPN2 수준 및 IL-13 분비를 자극하는 시토카인 또는 성장 인자의 능력 사이의 직접적인 상관성을 입증하기 위해, 본 발명자들은 siRNA 구축물에 의해 T<sub>84</sub> IEC에서 PTPN2를 녹-다운시켰다 (knock-down). TNF 처리는 PTPN2-적격 세포에서 IL-13 분비를 유도하기 위해 충분하지 않았지만, PTPN2-결핍 세포의 세포 상청액 내로 IL-13의 강한 분비를 일으켰다 (도 1E). 누공 섬유모세포에서 본 발명자들의 발견과 유사하게, TGF $\beta$ 를 사용한 HT29-IEC의 처리는 근소하게 감소하지만 여전히 유지되는 PTPN2 단백질 수준을 생성시켰고 (도 1F), 이것은 이들 세포로부터 TGF $\beta$ -유도된 IL-13 분비를 방지하기 위해 명백하게 충분하였다 (데이터를 제시하지 않음). 이들 데이터는 TGF $\beta$ 가 누공 CLPF로부터 IL-13 분비를 유도하고, IL-13 분비의 정도는 PTPN2 단백질 수준과 상호관련됨을 입증한다.

[0123] 실시예 2

[0124] IL-13 및 IL-13 수용체  $\alpha_1$  (IL-13R  $\alpha_1$ )은 TC 세포에서 강하게 검출가능하다.

[0125] 본 발명자들은 TGF $\beta$ 가 누공 CLPF로부터 IL-13 분비를 유도함을 입증하였으므로, 본 발명자들은 CD 환자로부터 유래한 누공 절체물로부터 조직 검체를 분석하였다. 면역조직화학에 의해 본 발명자들은 누관을 덮은 TC에서 IL-13에 대한 강한 염색을 관찰하였다 (도 2A). 추가로, 본 발명자들은 누관 바로 다음의 변형된 음와의 상피 세포에서 및 누관에 인접한 염증성 침윤물에서 IL-13 염색을 발견하였지만, 정규 결장 음와의 IEC는 IL-13 염색을 거의 제시하지 않았다 (도 2A). IL-13R  $\alpha_1$ 에 대해 유사한 염색 패턴을 관찰할 수 있었다. 시토카인 수용체는 CD 누공의 TC에서 및 누관에 인접한 음와-유사 구조를 덮고 있는 상피 유사 세포에서 강한 염색을 보였다 (도 2B). 이들 발견은 IL-13 및 IL-13R  $\alpha_1$ 가 CD-연관 누공 옆의 및 다음의 변형된 음와의 상피 세포 및 TC 세포에서 발현됨을 입증하고, CD 누공의 발병에서 IL-13의 관련성을 제안한다.

[0126] 실시예 3

[0127] IL-13은 HT29-IEC에서 SLUG 및  $\beta$ 6-인테그린 발현을 유도한다.

[0128] 이어서, 본 발명자들은 IL-13이 IEC에서 EMT-연관 효과에 관여될 수 있는지 평가하였다. HT29-IEC를 100 ng/ml IL-13으로 각각 30 min 또는 24 h 동안 처리하였다. IL-13의 투여는 24 h 처리에 의해 SLUG 및  $\beta$ 6-인테그린의 mRNA 수준을 유도하였지만 (도 3A+B), 임의의 시험된 시점에서 SNAIL1, TGF $\beta$  및 PTPN2 mRNA 발현에 대해 효과가 없었다 (도 3C-E). IL-13이  $\beta$ 6-인테그린 수준에 영향을 미칠 수 있는 방식을 연구하기 위해, 본 발명자들은 SLUG-특이적 siRNA 구축물을 사용하여 SLUG 녹-다운 연구를 수행하였고, 이것은 SLUG mRNA 수준의 명백한 감소를 일으켰다 (데이터를 제시하지 않음). 앞서와 같이, IL-13은 24 h 처리에 의해  $\beta$ 6-인테그린 mRNA 수준을 유도하였다. 상기 효과는 적어도 부분적으로, SLUG 녹-다운 세포에서 감소하였다 (도 3F). 단백질 수준에서, IL-13은 30 min 처리에 의해 신호전달 중간체인 STAT6 및 ERK1/2의 활성화를 표시하는 인산화를 유도하였다. IL-13은 또한 30 min 처리에 의해  $\beta$ -카테닌의 수준 증가를 일으켰고, 이것은 상기 경로를 통한 증가된 신호 전달을 나타내고 (본 발명자들은 이것이 통계상 유의하지 않음을 인정하지만), 24 h 처리 후에  $\beta$ -카테닌 단백질의 수준은 비자극된 대조 세포에서와 유사하였다 (도 4B). 세포간 공극 단백질인 클라우딘-2의 수준은 24 h IL-13 처리에 의해 증가하였지만 (도 4C), 세포간 부착 분자인 E-카드헤린 뿐만 아니라 밀접 연결부 분자인 오클루딘의 단백질 수준은 비처리 대조군 세포에 비교할 때 이 시점에 영향을 받지 않았다 (도 4D). 이들 데이터는 IL-13이 HT29 IEC에서 세포 침습에 관여하는 유전자의 발현을 유도하고 그에 의해 조직으로 침투하는 CD-연관 누공의 침습성에 기여할 수 있음을 나타낸다.

[0129] 실시예 4

[0130] TGF $\beta$ 는 HT29-구상체 세포 모델에서 EMT를 유도하지만 IL-13은 그렇지 않다.

[0131] 본 발명자들은 IL-13이 세포 침습과 연관된 분자의 발현을 유도하는 것을 보여주었으므로, 이어서, 본 발명자들은 IL-13이 EMT의 시험관내 모델에서 상피 세포 형성의 붕괴를 유도할 수 있을 것인지 연구하였다. 본 발명자

들은 HT29 세포를 구상체로서 7 d 동안 접종하였다. 이어서, 구상체를 비처리하여 두거나, TGFβ (20 ng/ml) 또는 IL-13 (100 ng/ml)으로 추가의 7 d 동안 처리하였다. 현미경에 의해 본 발명자들은 시간 경과에 따른 HT29-구상체의 형태학적 발달을 관찰하였다. 모든 연구된 구상체는 접종 7 d 후에 조밀한 세포 형성으로서 제시되었다. 비처리된 HT29 구상체는 심지어 14 d 후에도 유사한 외양을 보였고, 여기서 투명한 흑색 선은 세포 형성의 경계를 나타낸다. 이와 대조적으로, TGFβ 처리는 7 d의 성장 인자 처리 후에 세포 형성의 거의 완전한 해체를 일으켰고, 이것은 EMT의 개시를 표시한다. IL-13-처리된 구상체는 붕괴된 단일 세포가 검출가능하지 않으므로 EMT의 개시에 대한 명백한 형태학적 징후가 없는 것을 특징으로 한다. 그러나, 세포 형성의 가장자리는 비처리 대조군 구상체에 비해 다소 확산성으로 한정되었다 (도 5). 이들 발견은 TGFβ와는 대조적으로 IL-13이 단독으로는 IEC에서 EMT를 유도하기 위해 충분하지 않음을 제안한다.

[0132] 실시예 5

[0133] TGFβ는 HT29-구상체에서 IL-13 및 SNAIL1 mRNA 발현을 유도한다.

[0134] 이어서, 본 발명자들은 본 발명의 세포 모델에서 EMT의 유도에 기여할 수 있는 TGFβ에 의해 유도된 유전자 발현 패턴의 변경을 평가하였다. 본 발명자들은 TGFβ 처리가 IL-13 mRNA의 시간-의존적 증가를 일으켰음을 발견하였고, 이것은 7 d 처리 후에 통계적 유의성에 도달하였다 (도 6A). 그러나, 이들 구상체의 상층액 내의 IL-13의 농도는 본 발명에서 사용된 ELISA 시스템의 검출 수준 미만이었다 (데이터를 제시하지 않음). 본 발명자들은 또한 TGFβ가 이들 구상체에서 EMT-연관 전사 인자인 SNAIL1의 mRNA 발현을 증가시켰음을 발견하였고, 이것은 시간-의존적 운동학에 따르고 7 d 후에 피크에 도달한다 (도 6B). 상기 제시된 바와 같이 그 시점에 HT29 구상체는 완전히 붕괴되었고, 이것은 이들 세포에서 EMT의 개시에 대한 표시이다 (도 5). 이들 발견은 또한 누관을 덮고 있는 TC (따라서 현재 EMT를 겪고 있는)가 IL-13 (도 2A)뿐만 아니라 SNAIL1에 대한 강한 염색을 특징으로 하는 것을 보여주는, CD 환자로부터의 누공 검체에서 본 발명자들의 관찰과 상호관련되었다 (Scharl, in press). 이와 대조적으로, TGFβ 처리는 7 d 처리 후 β6-인테그린 발현의 유의한 감소를 일으켰고 (도 6C), 임의의 조사된 시점에서 SLUG mRNA에 (유의하게) 영향을 미치지 않았다 (도 6D). 이들 데이터는 TGFβ가 HT29-구상체에서 EMT-관련 전사 사례를 유도하는 것을 나타내고, 성장 인자가 CD 누관 옆의 TC 세포에서 관찰된 IL-13 발현에 책임이 있다는 추가의 암시를 제공한다.

[0135] 실시예 6

[0136] IL-13은 EMT의 시험관내 모델에서 SLUG 및 β6-인테그린 발현을 유도한다.

[0137] SLUG 및 β6-인테그린은 TC에서 및 CD 누공의 누공을 둘러싸는 세포에서 명백하게 검출가능하였다 (6) (Scharl in press). 여기서, 본 발명자들은 IL-13이 HT29 단일층에서 이들 두 유전자의 발현을 유도함을 보여주었다. 흥미롭게도, EMT를 겪는 HT29-구상체에서, TGFβ 자극은 SLUG 및 β6-인테그린의 mRNA 발현을 유도하기 위해 충분하지 않았다. 따라서, 본 발명자들은 IL-13이 EMT 세포 모델에서 그들의 mRNA 수준을 유도할 수 있는지 연구하였다. IL-13으로 HT29 구상체를 처리하면 이미 1 d 동안 인큐베이션 후에 SLUG mRNA 수준을 9배까지 유도하였다. 5 d 및 7d 후에, SLUG 발현 수준은 비처리 대조군 세포와 대등하였다 (도 7A). β6-인테그린에 대해 유사한 발견이 관찰되었다. IL-13은 1 d 인큐베이션에 의해 그의 유전자 발현을 유도하였고, mRNA 수준은 시간 경과에 따라 대조 세포에서와 동일한 수준으로 감소하였다 (도 7B). 놀랍게도, IL-13 처리는 1 d 후에 SNAIL1의 mRNA 수준을 감소시켰지만, 7 d 처리 후에 SNAIL1 mRNA 발현을 증가시켰고, 이것은 SLUG 및 β6-인테그린에 대해 관찰된 것보다 SNAIL1에 대한 상반된 IL-13-유도 발현 패턴을 나타낸다 (도 7C). 단백질 수준에서, TGFβ 및 IL-13 처리는 7 d 처리 후에 E-카드헤린 수준의 근소한 감소를 일으켰다. TGFβ 투여는 클라우딘-2 단백질에 영향을 미치지 않았지만, IL-13은 예상된 바와 같이, 이미 1 d 후에 및 또한 7 d 처리 후에 클라우딘-2 단백질 수준의 강한 증가를 일으켰다 (도 7D). 이들 데이터는 TGFβ가 IEC에서 EMT-특이적 유전자 발현 패턴을 유도한 반면, IL-13은 세포 침습과 연관된 유전자의 발현을 유도한다는 가설을 추가로 지지한다.

[0138] 실시예 7

[0139] SLUG, β6-인테그린 및 MMP-13의 수준은 CD 누공 CLPF에서 증가된다

[0140] 본 발명자들은 IEC에서 IL-13이 SLUG 및 β6-인테그린 유전자 발현에 영향을 미치는 것을 보여주었으므로, 본 발명자들은 이들 유전자의 기저 발현이 비-누공성 CD가 있는 환자로부터 단리된 CLPF에 비해 누공성 CD가 있는 환자로부터 단리된 CLPF에서 상이할 것인지 시험하였다. 본 발명자들은 SLUG mRNA 수준이 비-누공성 CD가 있는 환자로부터 CLPF보다 누공성 CD가 있는 환자로부터 유래한 CLPF에서 약 4배 더 높았음을 발견하였다 (도 8A). β6-인테그린 mRNA 수준에 대해 유사한 발견이 관찰되었다 (도 8B). 따라서, 본 발명자들은 시토키인에 대한



이들 세포의 반응성의 잠재적인 차이를 연구하기 위해 본 발명의 CLPF를 IL-13으로 처리하였다. 그러나, 연구된 시점에서, 신호전달 중간체인 STAT6 및 ERK1/2의 인산화를 자극하는 IL-13의 능력의 차이가 검출될 수 없었다. 추가로, 그들의 기준선 인산화에서 명백한 차이가 관찰될 수 없었다 (도 8C). 따라서, 본 발명자들은 전장 및 절단된 MMP-13 (콜라게나제 3)의 기준선 및 IL-13-유도 수준을 조사하였다. MMP-13의 절단된 이소형은 활성화된 단백질을 나타내고, 이것은 ECM 분해에 관여하고 유방암의 예에서 중앙 전이와 연관된다 (29). 전장 및 절단된 MMP-13의 기저 수준은 비-누공성 질환이 있는 환자로부터 CLPF보다 누공 CLPF에서 명백하게 더 높았다. 그러나, IL-13 처리는 두 MMP-13 이소형의 수준에서 임의의 명백한 변경을 일으키지 않았다 (도 8D). 이들 데이터는 누공성 질환이 있는 CD 환자로부터 유래한 CLPF가 비-누공성 질환이 있는 환자로부터 CLPF보다 세포 침습과 연관된 분자를 더 높은 수준으로 보임을 입증한다.

**[0141] 논의**

**[0142]** 본 발명자들은 IL-13이 누관을 덮고 있는 TC에서 및 CD-연관 누공에 인접한 변형된 음와의 IEC에서 분명하게 검출가능함을 입증하였다. EMT의 가장 강력한 유도인자인 TGFβ는 누공성 질환이 있는 CD 환자로부터 유래한 CLPF로부터 IL-13 분비를 유도할 수 있었다. HT29 IEC를 사용하는 EMT 세포 모델에서, TGFβ가 또한 장기 노출에 의해 IL-13 mRNA를 유도하였다. 기능적 수준에서, IL-13은 세포 침습과 연관된 유전자의 발현을 증가시켰고, 이것은 CD 누공의 발병에서 IL-13에 대한 역할을 나타낸다.

**[0143]** 본 발명자들이 이전에 보여준 바와 같이, CD-연관 누관을 덮고 있는 TC가 EMT의 개시를 강하게 지지하는 몇몇 측면을 특징으로 한다. 특히 이들은 높은 수준의 전사 활성 SNAIL1을 발현하고, E-카드헤린의 하향조절 및 상피 (시토케라틴-8 및 20)뿐만 아니라 중간엽 마커 (비멘틴)의 동반 발현을 일으킨다. 추가로, 상당한 수준의 TGFβ가 누관을 덮고 있는 TC에서 검출가능하다 (6). 누공 발병 동안 EMT의 개시에 대한 추가의 암시는 누공 CLPF가 SNAIL1 mRNA 수준을 강하게 상향조절한다는 사실이고, 이것은 누공이 없는 CD 환자로부터 유래한 CLPF에서 관찰될 수 없었다.

**[0144]** 여기서, 본 발명자들은 누관을 덮고 있는 TC 세포에서 및 누공에 인접한 변형된 음와의 상피 세포에서 IL-13 및 그의 수용체, IL-13Rα<sub>1</sub>에 대한 강한 염색을 입증하였다. IL-13은 주로 면역 세포, 특히 Th<sub>2</sub> 세포에 의해 발현되는 것으로 생각되므로 (18), 상기 관찰은 다소 예기치 않은 것이다. IL-13은 지금까지 EMT와 연관되지 않았지만, 조직 섬유증, 폐 섬유증, 간 섬유증 또는 전신 경화의 시작과 밀접하게 상호관련되었다 (20-21, 30). 본 발명자들은 인근 조직 층 내로 침습성 및 침투성 세포 성장을 특징으로 하는 세포, 예컨대 TC에서 높은 수준의 IL-13을 보여주었다. 흥미롭게도, 본 발명자들은 또한 높은 수준의 IL-13Rα<sub>1</sub>을 발견하였고, 이것은 IL-13 자체가 자가분비 방식으로 이들 세포에 대해 효과를 유발함을 제안한다.

**[0145]** 이어서, 본 발명자들은 각각 TC 또는 IEC에서 IL-13의 발현을 위한 가능한 구동력을 조사하였다. CLPF 배양액을 TGFβ로 자극함으로써, 본 발명자들은 성장 인자가 누공 CLPF로부터 IL-13의 분비를 유도하였지만, 비-누공 CLPF로부터 유도하지 않았음을 발견하였다. 추가로, 누공성 CD가 있는 환자로부터 단리된 CLPF는 또한 누공이 없는 CD 환자로부터의 세포보다 더 높은 기저 수준의 IL-13 분비를 특징으로 하였다. 웨스턴 블로팅에 의해, 본 발명자들은 TGFβ 처리된 누공 CLPF가 감소된 수준의 PTPN2를 보인다는 것을 발견하였고, 이것은 이들 세포로부터 상승된 IL-13 분비와 반대된다. CD 발병에 중추 역할을 하는 것으로 널리 나타난 TNF (31)는 누공 CLPF로부터 IL-13 분비를 추가로 상승시키기 위해 충분하지 않았지만, PTPN2 발현을 강하게 유도하였다. IL-13 분비에 관하여 PTPN2에 대한 제안된 조절 역할은 IEC를 이용하여 추가로 규정될 수 있다. 여기서, 누공 CLPF에서와 유사하게 TNF는 PTPN2-적격 세포에서 IL-13 분비를 유도하기 위해 충분하지 않았다. 그러나, PTPN2 녹-다운은 TNF가 IL-13을 유도하도록 하였다. TGFβ는 IEC에서 PTPN2 단백질 수준을 감소시켰지만, 48 h 처리 후에 이들 세포로부터 IL-13 분비를 유도하기 위해 여전히 충분하지 않았지만, 7 d 처리 후에는 충분하였다. 이것은 기능적 PTPN2의 특정 기초가 IEC에서 IL-13 분비를 방지할 수 있음을 나타낸다. 이들 관찰은, PTPN2 유전자에서 단일 뉴클레오티드 다형성이 최근에 침투성 CD 질환 과정과 연관되었으므로 (32) 특별히 중요하다. 그럼에도 불구하고, 추가의 사례는 TGFβ가 IEC로부터 IL-13의 분비, 가능하게는 TGFβ에 장기 노출 후에 SNAIL1 전사 인자의 동반 발현 또는 심지어 이들 세포에서 후생적 변형을 자극하도록 허용하는 것이 필요한 것으로 보인다 (본 발명자들은 이것이 이전에 입증되지 않았음을 인정하지만). 그러나, 대체로, 본 발명의 데이터는 PTPN2 활성이 IEC 및 CLPF에서 IL-13 분비를 제어할 수 있음을 제안하고, 기능적 측면, 유전적 PTPN2 변이체가 침투성 CD 표현형의 시작에 기여할 수 있는 방식을 밝힌다.

**[0146]** TC는 원래 EMT를 겪은 IEC를 나타낸다. 그러나, 그들의 형질전환 가능성에 추가로, 이들은 누공의 침습성 상단 부에서 발견될 수 있으므로 분명히 인접한 조직 층 내로 침투하는 상당한 능력을 보인다. 본 발명자들은 SLUG

및 β6-인테그린이 TC 또는 누관 주위의 중간엽-유사 세포에서 발현된다는 것을 이전에 발견하였다 (Scharl, in press) (6). 이들 유전자는 둘 모두 중앙 침습성 및 세포 침습과 연관되었다 (15-17). 따라서, 본 발명자들은 IEC가 EMT 과정 동안 이들 분자 모두의 발현을 상향조절할 것으로 추측하였다. 그러나, TGFβ를 사용한 HT29 구상체의 장기 처리가 상피 세포 형성의 EMT-유사 붕괴 및 SNAIL1 mRNA의 EMT-전형적 상향조절을 일으켰지만, SLUG 또는 β6-인테그린의 mRNA 발현을 유도하기 위해 충분하지 않았고, 대신 IL-13의 mRNA 수준을 증가시켰다. 본 발명자들은 TC에서 IL-13 및 IL-13Rβ<sub>1</sub>에 대한 강한 염색뿐만 아니라, 비-누공성 CD로부터의 것에 비해 누공성 CD가 있는 환자로부터 CLPF에서 상승된 수준의 SLUG 및 β6-인테그린을 발견하였으므로, 본 발명자들은 IL-13이 세포 침습과 연관된 유전자의 발현을 유도하기 위해 TC에 대해 자가분비 방식으로 작용할 수 있다고 가정하였다. 상기 가정을 시험하기 위해, 본 발명자들은 HT29 IEC를 IL-13으로 처리하였다. 본 발명자들은 시토키린이 HT29 단일층에서 및 구상체 모델에서 SLUG 및 β6-인테그린의 mRNA 수준을 유도할 수 있었음을 발견하였다. 그러나, 후자의 경우에, IL-13은 이들 세포의 EMT 표현형을 유도하기 위해 충분하지 않았고, 이들 관찰은 IL-13이 체장암에서 증가된 세포 침습과 연관됨을 보여주는 최근의 발견과 잘 일치한다 (23-26). 함께 살펴보면, 이들 관찰은 CD-연관 누공의 발병에서 IL-13에 대한 이전에 알려지지 않은 역할을 강하게 지지한다.

[0147] HT29 구상체의 TGFβ 처리는 SNAIL1 mRNA의 시간-의존적 상향조절을 일으키지만, β6-인테그린 및 SLUG의 하향조절을 일으키고, 이때 7 d 후에 모든 설명된 효과에 대한 피크에 도달한다. 반대로, IL-13은 이미 처리 1 d 후에 SLUG 및 β-인테그린 수준을 유도하였고, 그들의 발현 수준은 7 d 후에 대조 수준으로 감소하였다. 흥미롭게도, SNAIL1 mRNA 발현은 대조 세포에서보다 7 d일 IL-13 처리 후에 3배 더 높았다. 이들 관찰은 SNAIL1이 IEC에서 SLUG 및 β6-인테그린 발현의 억제인자 (repressor)로서 역할을 할 수 있음을 제안한다. 상기 발견은 TGFβ/SNAIL1-유도된 EMT가 활동성 CD 동안 존재하는 바와 같이 만성 염증 및 조직 파괴 부위에서 상처 치유 및 조직 재생의 메카니즘으로서 작용하지만 (33), CD 누공에서 관찰될 수 있는 침습 가능성을 특징으로 하지 않는다는 방식으로 이해될 수 있다. 이와 대조적으로, IL-13 (TGFβ에 대한 IEC의 장기 노출 후에 발현됨)은 EMT 세포의 침습 가능성을 자가분비 방식으로 유도한다. 섬유발생 동안 IL-13은 TGFβ의 상류에서 작용하는 반면, 세포 침습 상황에서 시토키인은 성장 인자에 의해 조절되는 것으로 보이므로, 상기 관찰은 선행 발견과 반대되는 것으로 보인다.

[0148] 요약하면, 본 발명의 데이터는 CD-연관 누공의 발병에서 TGFβ 및 IL-13에 대한 기능적 역할을 최초로 보여준다. 두 매개체 모두는 상승적인 단계별 (step-by-step) 과정으로 협동하는 것으로 보이고, 그에 의해 TGFβ는 상피 세포 형성의 붕괴를 일으킴으로써 EMT를 유도하고, IL-13은 마지막으로 EMT 세포가 보다 깊은 조직 층 내로 침투할 수 있도록 한다. 이들 발견은 TGFβ 및/또는 IL-13-유도된 효과의 이상조절이 CD-연관 누공의 발병에 중추 역할을 하는 것을 제안하고, CD 과정 동안 누공의 시작을 일으키는 상세한 메카니즘의 추가 조사의 중요성을 강조한다. 추가로, 이들 관찰은 그러한 누공의 치료를 위한 새롭고 보다 효과적인 치료 전략의 개발을 위한 새로운 길을 열 것이다.

[0149] **실시예 1-7을 위한 재료 및 방법**

[0150] 인간 IL-13 (알앤디 시스템즈 (R&D Systems, 영국 어빙든)), TGFβ (칼비오켄 (Calbiochem, 미국 캘리포니아주 샌디에고)), TNF (칼비오켄), 마우스 항-β-액틴 (시그마 (Sigma, 미국 미주리주 세인트루이스)), 마우스 항-PTPN2 (칼비오켄), 마우스 항-클라우딘-2 (인비트로젠 (Invitrogen, 미국 캘리포니아주 칼스바드)) 및 토끼 항-ERK1/2 항체 (산타크루즈 (Santa Cruz, 미국 캘리포니아주 산타크루즈))를 지명된 공급원으로부터 입수하였다. 토끼 항-포스포-ERK1/2-(Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>), 토끼 항-STAT6, 토끼 항-포스포-STAT6-(Tyr<sup>841</sup>), 토끼 항-β-카테닌, 토끼 항-E-카드헤린, 토끼 항-오클루딘 항체를 셀 시그널링 테크놀로지스 (Cell Signaling Technologies, 미국 매사추세츠주 덴버스)로부터 입수하였다. 토끼 항-MMP-13 (에브캠 (Abcam, 미국 매사추세츠주 캠브리지)) 항체는 진장 및 절단된 단백질 변이체를 모두 검출하였다. 모든 다른 시약은 분석 등급의 것이고, 상업적으로 획득하였다.

[0151] **세포 배양**

[0152] 인간 T<sub>84</sub> IEC를 10% CO<sub>2</sub>를 함유한 가습 분위기에서 10% 신생 소 혈청을 보충한 4.5% 고글루코스 둘베코 변형 이글 배지 (Dulbecco's modified Eagle's medium) (인비트로젠, 미국 캘리포니아주 칼스바드) 내에서 배양하였다. 인간 HT29 IEC는 10% CO<sub>2</sub>를 함유한 가습 분위기에서 10% 태소 혈청을 보충한 맥코이 (McCoy) 5A 배지 (JRH, 미국 캔사스주 레넥사) 내에서 배양하였다. 세포를 트립신 처리에 의해 분리시켰다. 단일층으로 성장될 때, 1x10<sup>6</sup>개의 세포를 12 mm 밀리셀 (Millicell)-HA 반-투과성 필터 지지체 (밀리포어 (Millipore, 미국

매사추세츠주 베드포드)) 상에 접종하였다. 처리 전에, 세포를 5-7시간 동안 배양하였다. 그들의 수용체 국소화에 따라, IL-13 (100 ng/ml), TNF (100 ng/ml) 및 TGFβ (50 ng/ml)를 기저측면으로 첨가하였다. 구상체에 대해, 4500-5000 HT29 세포/웰을 테라사키 (Terasaki) 플레이트 (그라이너 바이오-원 (Greiner Bio-One, 독일 프릭켄하우젠)) 내에 접종하고, 7 d 동안 성장시켰다. 이어서, IL-13 또는 TGFβ를 추가의 7 d 동안 배지 내로 첨가함으로써 세포를 자극하였다. 구상체의 형태학적 발달을 액시오캠 (AxioCam) Mrc5 (자이쓰 (Zeiss, 독일 제나))을 사용하여 자이쓰 액시오포트 (AxioPhot) 현미경 (자이쓰) 상에서 액시오비전 릴리스 (AxioVision Release) 4.7.2 소프트웨어 (자이쓰)를 이용하여 투과현미경에 의해 제8, 10, 12 및 14일에 모니터링하였다.

[0153] 환자 샘플

[0154] 면역조직화학을 위한 CD 환자로부터의 항문 주위 누공 검체를 CD가 있는 및 CD가 없는 남성 및 여성 개체로부터 전향적으로 수집하였다. 본 발명자들은 7명의 CD 환자로부터 포르말린-고정된 조직 샘플 내의 7개의 누공을 조사하였다. 누공을 수술로 절제하고, 즉시 4% 포르말린으로 옮기고, 추가의 분석까지 4°C에서 저장하였다. 1차 CLPF 배양액은 7명의 CD 환자 (평균 연령 53±5세)의 장 점막의 누공 영역으로부터 또는 비-누공성 CD가 있는 5명의 환자 (평균 연령 45±13세)의 장 점막으로부터 얻었다. 샘플은 남성 및 여성 환자로부터 수집하고, CLPF 배양액을 수술 검체로부터 수집하였다. 검체 수집 전에 고지에 의한 서면 동의서를 받았고, 연구는 지역 윤리 위원회의 승인을 받았다.

[0155] 인간 CLPF의 단리 및 배양

[0156] 절차는 이전에 설명된 바와 같이 수행하였다 (34). 생검을 CLPF의 단리를 위해 즉시 사용되는 한편, 수술 검체로부터의 점막을 초기에 1 mm 조각으로 절단하고, 10% 태소 혈청 (FCS; 깁코 (Gibco), 독일 칼스루흐)를 함유하는 돌베코 변형 이글 고글루코스 배지 (DMEM; PAA, 독일 쾰베)로 이루어진 섬유모세포 배지 내에서 세척하고, 10% FCS, 페니실린 (100 IU/ml), 스트렙토마이신 (100 µg/ml), 시프로플록사신 (8 µg/ml), 겐타마이신 (50 µg/ml) 및 암포테리신 B (1 µg/ml)를 함유하는 DMEM과 함께 25 cm<sup>2</sup> 배양 플라스크 (코스타 (Costar, 독일 보텐하임)) 내에서 배양하였다. 조직을 세정하고, Ca<sup>2+</sup> 및 Mg<sup>2+</sup> (PAA), 1 mg/ml 콜라게나제 I (시그마, 미국 미주리주 세인트루이스), 0.3 mg/ml DNase I (보링거 (Boehringer, 독일 만하임)) 및 2 mg/ml 히알루로니다제 (시그마)를 함유하는 인산염 완충 염수 (PBS, 깁코) 내에서 30 min 동안 37°C에서 소화시켰다. 단리 후에 세포를 세정하였다. 비-부착성 세포의 제거는 복수의 배지 교환에 의해 수행하고, 남은 세포는 계대배양 3 내지 8에서 사용하였다.

[0157] 인간 CLPF의 자극

[0158] 2x10<sup>6</sup>개의 세포를 이전에 설명된 바와 같이 접종하고, 24 h 동안 37°C에서 배양하였다 (34). 배지를 제거하고, 세포를 PBS로 2회 세척하고, IL-13 (100 ng/ml) 또는 TGFβ (50 ng/ml)을 FCS가 없는 DMEM 내에 적용하였다. 대조 세포는 각각 혈청 비함유 배지 (FCS가 없는 DMEM) 내에 유지시켰다.

[0159] 면역조직화학

[0160] 면역조직화학 연구는 이전에 설명된 바와 같이 디아미노벤지딘 (DAB) 색소원을 사용하는 퍼옥시다제 기반 방법을 이용하여 포르말린-고정된, 파라핀-포매 조직 검체 상에서 수행하였다(23). 간단히 설명하면, 조직 샘플을 자일롤 및 감소하는 농도의 에탄올과 함께 인큐베이션하였다. 항원 회복은 시트레이트 완충제, pH 6.0 (DAKO, 덴마크 글로스트립)을 사용하여 30 min 동안 98°C에서 수행하였다. 내인성 퍼옥시다제를 0.9% 과산화수소와 함께 15 min 동안 실온 (RT)에서 인큐베이션에 의해 결실시키고, 3% BSA를 사용하여 1 h 동안 RT에서 차단을 수행하였다. 이어서, 항체를 습식 챔버 내에서 최적의 농도로 철야 적용하였다. 토끼 항-IL-13 (알앤디 시스템즈) 및 IL-13Rα<sub>1</sub> (에브캠) 항체는 지명된 공급원으로부터 입수하였다. 2차 항체 (엔비전(EnVision)<sup>+</sup> 시스템-HRP-표지된 중합체, DAKO)를 1 h 동안 RT에서 적용하고, 항체 결합을 액체 DAB+ 기질 색소원 시스템 (DAKO)에 의해 가시화하였다. 이어서, 샘플을 헤마톡실린으로 대비염색하고, 상승적으로 농축된 에탄올 및 자일롤 용액 내에서 인큐베이션하고, 마지막으로 탑재하였다. 현미경 평가는 액시오캠 Mrc5 (자이쓰, 독일 제나)을 사용하여 자이쓰 액시오포트 현미경 (자이쓰) 상에서 액시오비전 릴리스 4.7.2 소프트웨어 (자이쓰)를 이용하여 수행하였다.

[0161] 실시간 PCR

[0162] 세포를 RLT-완충제 (퀴아젠 (Qiagen, 미국 캘리포니아주 발렌시아)) 내에 재현탁하고, 시린지 상에서 24-게이지

바늘을 사용하여 용해시켰다. mRNA를 분쇄기를 포함한 QIA-Cube (퀴아젠)을 이용하는 알엔이지 플러스 (RNeasy Plus) 미니 키트 (퀴아젠, 미국 캘리포니아주 발렌시아)를 사용하여 단리하고, 제조자의 지시에 따라 DNase I (퀴아젠)에 의해 DNA를 제거하였다. RNA 농도는 260 및 280 nm에서 흡광도에 의해 검정하고, 단백질 함량은 나노드롭 (NanoDrop) ND1000 (써모 사이언티픽 (Thermo Scientific))을 사용하여 측정하였다. cDNA 합성은 고효능 cDNA 역전사 키트 (어플라이드 바이오시스템즈 (Applied Biosystems, 미국 캘리포니아주 포스터 시티))를 사용하여 수행하였다. 실시간 PCR TaqMan 분석 및 TaqMan 유전자 발현 마스터 믹스는 어플라이드 바이오시스템즈로부터 입수하였다. 실시간 PCR은 SDS 2.2 소프트웨어 (어플라이드 바이오시스템즈)을 이용하여 7900HT 신속 실시간 PCR 시스템 상에서 수행하였다. 삼중 측정을 수행하고, 인간  $\beta$ -액틴을 내인성 대조군으로서 사용하였다. 이어서, 결과를  $\Delta\Delta CT$ -방법에 의해 분석하였다. 실시간 PCR은 40 사이클을 포함하였다.

[0163] **전체 세포 용해물의 제조**

[0164] 전체 세포 용해물을 제조자의 지시에 따라 M-Per 포유동물 단백질 추출 시약 (피어스 바이오테크놀로지 (Pierce Biotechnology, 미국 일리노이주 록포드))를 사용하여 생성하였다. 단백질 함량은 나노드롭 ND1000 (써모 사이언티픽)을 사용하여 측정하였다.

[0165] **웨스턴 블로팅**

[0166] 각각의 용해물의 분취액을 NuPAGE® 4x LDS 샘플 완충제 (인비트로젠) 및 50 mM 디티오트레이톨 (시그마)와 혼합하고 5 min 동안 96°C에서 비등시켰다. 단백질을 SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동에 의해 분리하고, 니트로셀룰로스 막 (인비트로젠) 상으로 옮겼다. 막을 1% 차단 용액을 사용하여 차단하고, 토끼 항-SNAIL1 항체 (1:1000, 에브캠)를 철야 적용하였다. 막을 1% Tween 20을 함유하는 Tris 완충 염수 (1% TBST)로 1 h 동안 세척하고, HRP-표지된 2차 항-토끼-IgG-항체 (1:3000; 산타크루즈)를 30 min 동안 첨가하고, 막을 1 h 동안 1% TBST로 세척하였다. 마지막으로, 면역반응성 단백질을 증진된 화학발광 검출 키트 (지이 헬스케어 (GE Healthcare, 영국 리틀사폰트)를 사용하여 검출하였다.

[0167] **ELISA**

[0168] 세포 상청액을 수집하고 추가의 처리까지 -80°C에서 저장하였다. 인간 IL-13을 검출하는 ELISA 키트는 프로모 키네 (Promokine, 독일 하이델베르크)로부터 입수하였다. 검정은 반응당 50  $\mu$ l의 샘플 부피를 사용하여 제조자의 지시에 따라 수행하였다. 450 nm에서 흡광도를 젠 (Gen) 5 소프트웨어 (바이오텍 인스트루먼츠, 인크. (BioTek Instruments, Inc., 미국 버몬트주 위누스키))를 이용하여 바이오텍 시너지 (Synergy) 2 마이크로플레이트 판독기 상에서 검출하였다. 측정은 이중으로 수행하였다.

[0169] **SiRNA 형질감염**

[0170] HT29 (2x10<sup>6</sup> 개) 세포를 형질감염 5일 전에 접종하였다. 100 pmol의 3가지 상이한 어닐링된 SLUG-특이적 사일렌서 (Silencer) 예비-설계된 siRNA 올리고뉴클레오티드 (어플라이드 바이오시스템즈)를 아막사 뉴클레오펙터 (Amaxa nucleofector) 시스템 (론자 (Lonza, 미국 매릴랜드주 워커스빌))을 이용하여 HT29 세포 내로 형질감염 시켰다. 형질감염 후에, IEC는 처리 전에 48 h 동안 필터 막 상에서 계산하였다. 비-특이적 대조 siRNA (ABI) (100 pmol/형질감염)를 음성 대조군으로서 사용하였다.

[0171] **통계적 분석**

[0172] 데이터는 일련의 n 실험에 대해 평균+/-S.E.M.으로 제시한다. 통계 분석은 ANOVA에 이어 적절하게 스튜던트-뉴먼-클스 (Student-Newman-Keuls) 포스트훅 (post hoc) 검정 또는 스튜던트 (Student's) t-검정에 의해 수행하였다. P 값 < 0.05을 유의한 것으로 간주하였다.

[0173] **실시예 8**

[0174] **CD 환자에서의 누공의 치료**

[0175] 본 실시예는 특정 항체를 사용하는 CD 환자의 누공 치료가 수행될 수 있고 효과가 평가될 수 있는 방법을 보여 준다. 예를 들어, 정확한 투약 및 투여 스케줄이 사용된 특정 항체에 따라 변할 수 있지만 다른 IL-13 항체가 유사한 방식으로 사용될 수 있음은 당업자에게 명백할 것이다.

[0176] **용량/요법, 치료의 지속 기간의 근거**

[0177] 제안된 시험에서 효능은 누공이 폐쇄되도록 하는 변화를 요구할 것이다. 현재의 의견은 누관을 덮고 있는 세포



내의 IL-13의 높은 국소 발현이 조직 재형성 및 섬유증의 핵심 매개체이라고 가정한다. 따라서, 누공 조직 내의 국소 IL-13의 폐쇄 억제에 대한 효과를 달성하는 것이 필요하다. IL-13을 억제하기 위한 누공 내의 01951/G12의 필요량은 원칙적으로 01951/G12 및 IL-13 사이의 결합 평형을 설명하는 식으로부터 유래할 수 있다. 그러나, 국소 IL-13 농도는 알려져 있지 않다. 또한, 01951/G12에 대한 누공 조직 접근성이 알려져 있지 않고, 따라서 국소 01951/G12 농도는 혈장 농도로부터 예측될 수 없다. 그 결과로, 누공 조직 내로 01951/G12의 투과를 유도하기 위해 충분히 높은 용량이 사용되어야 한다. 국소 IL-13을 억제하는 최상의 기회를 위한 01951/G12를 제공하기 위해, 10 mg/kg의 01951/G12를 3주마다 투여하는 것이 제안된다.

**[0178] 유리 바이알 내의 01951/G12 150 mg 용액용 분말**

**[0179]** 01951/G12 150 mg 용액용 분말은 각각 150 mg 01951/G12를 동결건조 케이크 (cake)로서 함유하는 유리 바이알 내에 제공될 것이다. 바이알은 표지된 양의 01951/G12의 완전한 채취를 허용하도록 20% 오버필 (overfill)을 함유한다. 01951/G12 용액용 분말을 위한 제조 공정은 표준 제조 공정으로 이루어진다: 희석, 혼합/교반, 전여과 및 멸균 여과, 무균 충전 및 동결건조. 약물 제품은 2 내지 8°C에서 저장되면 약물 제품 라벨 상의 표시된 날짜까지 안정한 것으로 고려된다. 진행중인 안정성 연구 결과에 기초하여, 재시험 기간이 적절하게 조정될 것이다. 투여 직전에, 멸균 주사용수 (SWFI)를 바이알에 첨가하고, 분말을 즉시 사용을 위해 용해시켜 단일-사용 주입용 용액을 위한 농축물을 얻고, 이것은 사용 전에 희석할 필요가 있다. 후속적인 정맥내 투여를 위해, 얻어진 주입용 용액을 위한 농축물은 즉시 사용 01951/G12 주입용 용액으로 추가로 희석될 필요가 있다.

**[0180] 01951/G12 주입용 용액**

**[0181]** 1.0 mL SWFI를 사용한 01951/G12 150 mg 용액용 분말의 재구성으로 150 mg/ml 01951/G12의 농도의 주입용 용액을 위한 농축물을 1.2 ml의 총 최종 부피로 생성한다. 주입용 용액을 위한 농축물은 수크로스, 글리신 및 폴리소르베이트 80을 함유하는, 히스티딘 (pH 6.0±0.5) 완충 용액으로서 이용가능하다. 제제는 단일-용량 투여만을 위해 필요한 것이므로 보존제를 함유하지 않는다. 상기 농축물을 후속적으로 아래 제공된 사용 지시서에 따라 5% 글루코스/텍스트로스 용액을 담은 주입 백 내에 희석한다. 01951/G12은 단백질이므로, 재구성된 바이알은 약간의 반투명한 입자를 함유할 수 있다. 따라서, 주입용 용액은 0.2 마이크로미터 인-라인 (in-line) 필터 ("사용할 재료" 하의 필터 공급자 요건 참조)를 통해 주입되어야 한다.

**[0182]** · 주입용 용액을 위한 농축물을 대상체에게 직접 주사하지 않아야 하고, 대신 아래의 제조 지시를 따른다.

**[0183] 용량/부피 계산**

**[0184]** 주: 바이알은 20%의 01951/G12의 오버필을 함유한다. 아래 설명된 바와 같은 용량/부피 계산은 그를 엄수해야 한다.

**[0185]** 대상체에 투여를 위한 용량은 기준선 방문에서 측정된 개별 대상체의 체중으로부터 계산될 것이다.

**[0186]** 10 mg/kg의 용량 수준을 투여할 수 있다.

**[0187]** · 용량 계산:

**[0188]** · 용량 (mg) = 환자 체중 (kg) x 용량 수준 (mg/kg).

**[0189]** · 부피 계산:

**[0190]** 필요한 주입용 용액을 위한 01951/G12 농축물의 부피를 얻기 위해, 계산된 용량을 주입용 용액을 위한 농축물 농도 (즉, 150 mg/mL)로 나누어야 한다.

**[0191] 예:**

**[0192]** 대상체 체중: 65 kg

**[0193]** 용량 수준: 10 mg/kg

**[0194]** 계산된 용량: 650 mg

**[0195]** 계산된 부피: 650 mg / 150 mg/mL = 4.3 mL

**[0196]** 바이알의 계산된 수: 4.3/1.2 = 용량당 4개

**[0197] 사용할 재료:**

- [0198] 정맥내 필터 세트를 포함한 주입 세트는 제조자가 제공하는 지시에 따라 제조해야 한다 (제품 참조 번호는 국가 특이적일 수 있으므로 제공하지 않는다).
- [0199] · 주입 백:
- [0200] · 박스터 (Baxter) 바이아플렉스 (Viaflex) 5% 텍스트로스 주사 250 mL
- [0201] · 비. 브라운 (B. Braun) 에코플렉 플러스 (Ecoflac plus) 5% 글루코스, 250 mL
- [0202] · 주입 라인:
- [0203] · 메일 루어 락 (Male Luer Lock) 어댑터가 있는 박스터 용액 세트 101" (2.6 m)
- [0204] · 비. 브라운 오리지날 인푸소맷 (Original Infusomat) 튜브, 표준형 (250 cm)
- [0205] · 아라리스 (Alaris) 펌프 모듈 투여 세트: 0.2 마이크로미터 (저 단백질 결합) 필터 및 1개의 주사 포트 (port) (285 cm)가 있는 저 흡착 세트
- [0206] · 인-라인 필터 (박스터 또는 비. 브라운 주입 라인을 사용하는 경우 부착되어야 함):
- [0207] · 폴 포시다인 (Pall Posidyne)® ELD 0.2  $\mu$ m 정맥내 필터 세트
- [0208] · 계산된 용량을 분배하기 위해 용액 바이알을 위한 충분한 01951/G12 150 mg 분말 (상기 용량 하의 설명 참조).
- [0209] · 동결건조물의 재구성을 수행하기 위한 (1.0 mL를 측정하기 위한) 1 mL 눈금이 있는 일회용 시린지.
- [0210] · 희석을 수행하기 위한 적절한 부피의 시린지.
- [0211] · 재구성 및 재구성된 용액의 채취를 위해 적합한 크기의 바늘 (예를 들어, 21 G x 2").
- [0212] · 멸균 주사용수 (SWFI).
- [0213] **제조**
- [0214] · 01951/G12의 동결건조 케이크를 함유하는 바이알 내로 1.0 mL의 SWFI를 느리게 주사함으로써 각각의 바이알을 재구성한다. 희석제의 흐름은 동결건조 케이크로 직접 향해야 한다. 이어서, 바이알을 약 45° 각도로 기울이고, 약 1분 동안 손가락끝 사이에서 부드럽게 회전시켰다.
- [0215] · 그때, 바이알을 상기 설명한 바와 같이 때때로 회전시키면서 (3 - 5회/15분, 각각 20 - 60초) 최소 10분 동안 실온에서 벤치 (bench) 상에 정지시켜 바이알을 인큐베이팅한다. 용액의 기포발생은 드물지 않음을 주목한다. 바이알을 진탕하거나 뒤집지 않는다.
- [0216] · 바이알을 대략 5분 동안 건드리지 않고 정지시킨다. 생성되는 용액은 본질적으로 가시적인 입자가 없고, 오팔색처럼 투명하고, 무색이어야 한다.
- [0217] · 체중 및 용량 수준 (상기 용량/부피 계산 하의 설명 참조)에 따라 각각의 개별 대상체에 대해 사용할 주입용 용액을 위한 01951/G12 농축물의 부피를 계산한다.
- [0218] · 주입 백으로부터 상기 부피를 취하여 폐기한다.
- [0219] · 바이알로부터 주입용 용액을 위한 01951/G12 농축물의 계산된 부피를 적합한 시린지 내에 취한다.
- [0220] · 주입용 용액을 위한 01951/G12 농축물을 주입 백 내로 느리게 주사하고, 백을 부드럽게 교반함으로써 혼합한다. 기포발생을 피하기 위해 진탕하지 않는다.
- [0221] **투여**
- [0222] 01951/G12는 상기 명시된 재료 (주입 백의 제조 참조)를 이용하여 약 2 ml/min (총 투여 시간: 대략 120분)의 유속으로 주입액으로서 투여되어야 한다. 01951/G12 주입은 중력 투여 방식에 의해 또는 주입 펌프 (즉, 박스터 주입 라인을 사용하는 경우 코리그 (Colleague) CXE 부피식 주입 펌프; 비. 브라운 인푸소맷 주입 라인을 사용하는 경우 인푸소맷® fmS 부피식 주입 펌프; 아라리스 펌프 모듈 주입 라인을 사용하는 경우 아라리스 제미니 (Gemini) 주입 펌프)를 사용하여 수행할 수 있다.
- [0223] **누공 활동성의 임상 평가**



- [0224] 누공 폐쇄는 조사자가 임상적으로 평가할 것이다. 누공 활동성의 임상 평가는 피부 누공 개구부(들)의 경화, 색상 및 면적의 추정치 설명과 함께 누공(들)의 \*위치 및 외양의 평가 및 문서화를 포함한다;
- [0225] \* 누공 가장자리에 부드러운 압력을 가한 후 고름 누공 분비물의 양.
- [0226] 추가로, 선행 방문에 비해 누공 활동성이 증가하거나, 변하지 않거나, 감소하는지 평가할 수 있다.
- [0227] **사진문서**
- [0228] 사진문서는 본 연구 동안 누공 치유의 문서화를 허용하도록 이용될 것이다.
- [0229] **MRI 평가**
- [0230] MRI는 넓은 시야를 가지며 뛰어난 연조직 식별을 제공하고, 방사선 위험이 없기 때문에 골반을 연구하기 위한 유용한 기술이다. 본 연구에서, 골반 MRI는 시간 경과에 따른 항문 주위 누공의 복잡성 및 거동을 평가하기 위해 사용될 것이다. MRI 영상은 문헌 [Van Assche, et al 2003]에 설명된 바와 같이 누관 주위의 활동성 염증 및 해부학적 변화를 모두 반영하는 점수를 생성하도록 분석될 것이다.
- [0231] **건강 관련 삶의 질 (SIBDQ)**
- [0232] 본 연구에 짧은 염증성 장 질병 설문지 (SIBDQ)를 포함한 목적은 누공성 크론병이 있는 대상체에서 질환-특이적 건강 관련 삶의 질을 평가하기 위한 것이다. SIBDQ는 임상 시험 및 연구에서 광범위하게 사용되는 타당하고 예민한 신뢰성있는 척도이다. SIBDQ는 10개 항목을 포함하고, 이는 장 증상, 전신 증상, 감정적 기능, 및 사회적 기능을 포함한 4개 부척도로 묶인다. 각각의 항목은 1 (최악) 내지 7 (최상) 범위의 7-점 라이커트 (Likert) 척도 상에서 채점하였다.
- [0233] **내시경 생검 절차**
- [0234] 누관으로부터의 생검을 스크리닝 동안 및 01951/G12의 최초 적용 1주 후 (D8±2일)에 내시경에 의해 취할 것이다. 목표는 그들의 관장 개구부를 통해 누관의 내막으로부터 생검을 얻는 것이다. 관장 누공 개구부가 접근 불가능한 경우에, 조사자는 진행 방법에 대해 의뢰자의 사례별 상호 동의 및 조언을 구할 것이다. 그러한 경우에, 예를 들어, 점막 생검을 내부 누공 개구부의 바로 부근으로부터 얻는 것을 생각할 수 있다.
- [0235] 내시경 기술의 선택은 조사자의 재량에 달려 있고, 대부분의 환자는 생검 절차를 위해 적절하게 진통-진정되어야 할 것이다. 시각적 제어 하에, 조사자는 누관의 벽으로부터 1 내지 2개의 표준 생검을 취할 것이다. 1개의 생검은 즉시 RNA 보존 배지에 넣을 것이고, 다른 생검은 10% 완충 포르말린 용액을 담은 튜브 내에 넣고 조직학 검사를 위해 처리할 것이다. 절차는 별개의 안내서에 추가로 상세히 설명할 것이다.
- [0236] 누관의 벽의 형태학적 변화를 평가하기 위해 병리학자가 조직학을 위해 처리된 샘플을 검사할 것이고, 남은 파라핀 블록은 추가의 조사 (면역조직화학 및/또는 계내 혼성화)를 위해 저장할 것이다.
- [0237] 유전자 발현 프로파일을 위해 의도된 샘플은 RNA 마이크로어레이 분석을 위해 처리할 것이다.
- [0238] **TGF-β, 페리오스틴, 예오타신-1, PICP 및 PIIINP, IL-4를 포함하고 이로 제한되지 않는 가용형 바이오마커**
- [0239] **근거**
- [0240] 다른 섬유증 메커니즘에 관하여 또는 IL-13 경로의 하류 바이오마커를 평가하기 위해 혈청 및 혈장 샘플을 수집할 것이다. 최종 바이오마커 패널은 TGF-β, 페리오스틴, 예오타신-1, PICP, PIIINP 및 IL-4를 포함할 것이고 이로 제한되지 않는다. IL-13 수용체와 같은 추가의 바이오마커를 평가할 수 있는 것은 관련 검정의 이용가능성에 따라 좌우된다,
- [0241] 바이오마커 및 임상 반응 사이의 잠재적인 관계가 탐구될 것이다.
- [0242] 표적 집단의 보다 우수한 정의를 위해 특정 수준에서 임의의 특이적 바이오마커 (또는 그들의 조합)가 다른 것보다 치료에 대한 임상 반응의 더 중요한 예측자인지 여부의 의문점이 조사될 것이다. 잠재적인 추가 조사를 위해 혈장을 위한 추가의 혈액을 취한다 (시점당 4 mL).
- [0243] **TGF-β, 페리오스틴, 예오타신-1, PICP 및 PIIINP에 대한 샘플 수집 절차**
- [0244] \* 혈청
- [0245] 9 ml 혈청을 보장하기 위해 단일 14 ml 혈액 샘플을 취할 것이다.

- [0246] 모든 혈액 샘플은 직접적 정맥천자 또는 전완 정맥 내에 삽입된 유치 캐놀라 (indwelling cannula)에 의해 취하고, 멸균 튜브 내로 수집할 것이다. 혈액 수집 후에, 혈액 샘플을 실온에서 30 min 동안 응고시킨다. 이어서, 튜브를 얼음 상에 놓아야 한다. 이어서, 샘플을 즉시 4℃에서 10 min 동안 2000 x g에서 원심분리해야 한다. 원심분리 후에, 상청액을 새로운 멸균 폴리프로필렌 튜브에 옮기고, 뒤집어서 부드럽게 혼합한다.
- [0247] 혈청-샘플을 250  $\mu$ l로 0.5 ml 폴리프로필렌 냉동바이알 (사르스테트 (Sarstedt) No. 72.730.006 또는 동등물) 내에 분취하고, 정맥천자 45분 이내에 적어도 -20℃ (약 -70℃가 바람직한 온도이지만, 샘플은 동일하게 처리되어야 한다)에서 즉시 동결시킨다. 수송은 수집과 동일한 날에 드라이 아이스 상에서 수행해야 한다. 중앙 실험실에 도착 시 및 분석의 위치에서, 샘플은 약 -70℃에서 저장되어야 한다.
- [0248] 응고를 위한 것을 제외하고는, 처리 동안 샘플을 실온에 놓는 것은 피해야 한다 (단지 수분 동안이더라도). 처리 동안 샘플을 얼음 (2-4℃) 상에 놓는 것은 총 45분을 초과하지 않아야 한다. 샘플은 실험 매뉴얼에 명시된 바와 같이 수송되어야 한다.
- [0249] \* 혈장
- [0250] 2 mL의 혈장을 보장하기 위해 단일 4 ml 정맥 혈액 샘플을 EDTA 튜브 내에 수집할 것이다.
- [0251] 각각의 튜브의 혈액을 취한 직후에, 튜브 내용물 (예를 들어, 항응고제)의 혼합을 보장하기 위해 수차례 부드럽게 뒤집어야 한다. 고무 스톱퍼와 샘플의 장기 접촉을 피한다. 튜브를 원심분리까지 얼음으로 둘러싼 시험관 랙 내에 직립으로 놓는다. 30분 내에, 샘플을 3 내지 5℃에서 10분 동안 대략 2500 g (또는 투명한 혈장층을 달성하기 위해 충분한 설정)에서 원심분리한다. 원심분리 직후에, 상청액 혈장을 250  $\mu$ l 분취액으로 0.5 ml 폴리프로필렌 냉동바이알 (사르스테트 No. 72.730.006 또는 동등물)에 옮기고, 정맥천자 45분 이내에 적어도 -20℃ (-70℃가 바람직한 온도이지만, 샘플은 동일하게 처리되어야 한다)에서 즉시 동결시킨다. 수송은 수집과 동일한 날에 드라이 아이스 상에서 수행해야 한다. 중앙 실험실에 도착 시 및 분석의 위치에서, 샘플은 -70℃에서 저장되어야 한다.
- [0252] **대변 칼프로텍틴 및 락토페린 수준**
- [0253] 대변 칼프로텍틴 및 락토페린 수준은 크론병 활동성의 평가 및 추적조사를 위한 널리 사용되는 바이오마커이고, 내시경 소견과 상호관련되고, 비침습성 염증성 질환 마커를 제공할 것이다.
- [0254] **샘플 수집 절차**
- [0255] 각각의 예정된 샘플링 시점에 대해, 2개의 대변 샘플 (각각 약 5 g)을 2개의 30 mL 대변 수집 튜브 내로 수집할 것이고, 이것을 즉시 -18℃ 내지 -20℃에서 저장하였다. 샘플은 다음 이용가능한 수송물과 함께 중앙 실험실로 드라이 아이스 상에서 수송될 수 있다.
- [0256] **샘플 분석 방법**
- [0257] ELISA에 의한 비-침습성 염증성 질환 마커로서 대변 칼프로텍틴 및 락토페린의 수준 변화는 임상 효능에 대한 그들의 관계에 관하여 탐구될 것이다.
- [0258] **임상 연구의 예비 평가**
- [0259] 상기 설명된 연구 처리에 대한 생물학적 반응의 예비 평가는 누공이 있는 환자가 01951/G12 IL-13 항체를 사용한 처리에 반응하였음을 보여주었다. 환자에서 전체 누공 활동성은 감소하였고, 관찰된 구체적인 개선은 통증 감소 및 누공으로부터 점액고름 분비의 중단을 포함하였다. 결론은 IL-13 항체가 누공 활동성을 감소시키는, 긍정적인 임상 효과를 가졌다는 것이다.
- [0260] 본 발명은 단지 예에 의해 설명되고, 본 발명의 범위 및 취지 내에 유지되면서 변형이 이루어질 수 있음이 이해될 것이다.

[0261] 참고문헌

1. Solomon, M.J. 1996. Fistulae and abscesses in symptomatic perianal Crohn's disease. *Int J Colorectal Dis* 11:222-226.
2. Michelassi, F., Stella, M., Balestracci, T., Giuliante, F., Marogna, P., and Block, G.E. 1993. Incidence, diagnosis, and treatment of enteric and colorectal fistulae in patients with Crohn's disease. *Ann Surg* 218:660-666.
3. Schwartz, D.A., Loftus, E.V., Jr., Tremaine, W.J., Panaccione, R., Harmsen, W.S., Zinsmeister, A.R., and Sandborn, W.J. 2002. The natural history of fistulizing Crohn's disease in Olmsted County, Minnesota. *Gastroenterology* 122:875-880.
4. Bourikas, L.A., and Koutroubakis, I.E. 2010. Anti-TNF and fistulizing perianal Crohn's disease: use in clinical practice. *Curr Drug Targets* 11:187-197.
5. Judge, T.A., and Lichtenstein, G.R. 2004. Treatment of fistulizing Crohn's disease. *Gastroenterol Clin North Am* 33:421-454, xi-xii.
6. Bataille, F., Rohrmeier, C., Bates, R., Weber, A., Rieder, F., Brenmoehl, J., Strauch, U., Farkas, S., Furst, A., Hofstadter, F., et al. 2008. Evidence for a role of epithelial mesenchymal transition during pathogenesis of fistulae in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 14:1514-1527.
7. Kalluri, R., and Neilson, E.G. 2003. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest* 112:1776-1784.
8. Arias, A.M. 2001. Epithelial mesenchymal interactions in cancer and development. *Cell* 105:425-431.

[0262]

9. Thiery, J.P., and Sleeman, J.P. 2006. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:131-142.
10. Zavadil, J., and Bottinger, E.P. 2005. TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* 24:5764-5774.
11. Kasai, H., Allen, J.T., Mason, R.M., Kamimura, T., and Zhang, Z. 2005. TGF-beta1 induces human alveolar epithelial to mesenchymal cell transition (EMT). *Respir Res* 6:56.
12. Margetts, P.J., Bonniaud, P., Liu, L., Hoff, C.M., Holmes, C.J., West-Mays, J.A., and Kelly, M.M. 2005. Transient overexpression of TGF-(beta)1 induces epithelial mesenchymal transition in the rodent peritoneum. *J Am Soc Nephrol* 16:425-436.
13. Bates, R.C., and Mercurio, A.M. 2003. Tumor necrosis factor-alpha stimulates the epithelial-to-mesenchymal transition of human colonic organoids. *Mol Biol Cell* 14:1790-1800.
14. Peinado, H., Quintanilla, M., and Cano, A. 2003. Transforming growth factor beta-1 induces snail transcription factor in epithelial cell lines: mechanisms for epithelial mesenchymal transitions. *J Biol Chem* 278:21113-21123.
15. Bates, R.C. 2005. Colorectal cancer progression: integrin alphavbeta6 and the epithelial-mesenchymal transition (EMT). *Cell Cycle* 4:1350-1352.
16. Bates, R.C., Bellovin, D.I., Brown, C., Maynard, E., Wu, B., Kawakatsu, H., Sheppard, D., Oetgen, P., and Mercurio, A.M. 2005. Transcriptional activation of integrin beta6 during the epithelial-mesenchymal transition defines a novel prognostic indicator of aggressive colon carcinoma. *J Clin Invest* 115:339-347.
17. Alves, C.C., Carneiro, F., Hoefler, H., and Becker, K.F. 2009. Role of the epithelial-mesenchymal transition regulator Slug in primary human cancers. *Front Biosci* 14:3035-3050.
18. Wynn, T.A. 2003. IL-13 effector functions. *Annu Rev Immunol* 21:425-456.
19. Donaldson, D.D., Whitters, M.J., Fitz, L.J., Neben, T.Y., Finnerty, H., Henderson, S.L., O'Hara, R.M., Jr., Beier, D.R., Turner, K.J., Wood, C.R., et al. 1998. The murine IL-13 receptor alpha 2: molecular cloning, characterization, and comparison with murine IL-13 receptor alpha 1. *J Immunol* 161:2317-2324.
20. Zhu, Z., Homer, R.J., Wang, Z., Chen, Q., Geba, G.P., Wang, J., Zhang, Y., and Elias, J.A. 1999. Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. *J Clin Invest* 103:779-788.
21. Chiramonte, M.G., Donaldson, D.D., Cheever, A.W., and Wynn, T.A. 1999. An IL-13 inhibitor blocks the development of hepatic fibrosis during a T-helper type 2-dominated inflammatory response. *J Clin Invest* 104:777-785.

[0263]

22. Lee, C.G., Homer, R.J., Zhu, Z., Lanone, S., Wang, X., Koteliansky, V., Shipley, J.M., Gotwals, P., Noble, P., Chen, Q., et al. 2001. Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor beta(1). *J Exp Med* 194:809-821.
23. Kornmann, M., Kleeff, J., Debinski, W., and Korc, M. 1999. Pancreatic cancer cells express interleukin-13 and -4 receptors, and their growth is inhibited by Pseudomonas exotoxin coupled to interleukin-13 and -4. *Anticancer Res* 19:125-131.
24. Fujisawa, T., Nakashima, H., Nakajima, A., Joshi, B.H., and Puri, R.K. 2010. Targeting IL-13Ralpha2 in human pancreatic ductal adenocarcinoma with combination therapy of IL-13-PE and gemcitabine. *Int J Cancer*.
25. Vallera, D.A., Stish, B.J., Shu, Y., Chen, H., Saluja, A., Buchsbaum, D.J., and Vickers, S.M. 2008. Genetically designing a more potent antipancreatic cancer agent by simultaneously co-targeting human IL-13 and EGF receptors in a mouse xenograft model. *Gut* 57:634-641.
26. Shimamura, T., Fujisawa, T., Husain, S.R., Joshi, B., and Puri, R.K. 2010. Interleukin 13 mediates signal transduction through interleukin 13 receptor alpha2 in pancreatic ductal adenocarcinoma: role of IL-13 Pseudomonas exotoxin in pancreatic cancer therapy. *Clin Cancer Res* 16:577-586.
27. Obiri, N.I., Husain, S.R., Debinski, W., and Puri, R.K. 1996. Interleukin 13 inhibits growth of human renal cell carcinoma cells independently of the p140 interleukin 4 receptor chain. *Clin Cancer Res* 2:1743-1749.
28. Serve, H., Oelmann, E., Herweg, A., Oberberg, D., Serve, S., Reufi, B., Mucke, C., Minty, A., Thiel, E., and Berdel, W.E. 1996. Inhibition of proliferation and clonal growth of human breast cancer cells by interleukin 13. *Cancer Res* 56:3583-3588.
29. Freije, J.M., Diez-Iltza, I., Balbin, M., Sanchez, L.M., Blasco, R., Tolviva, J., and Lopez-Otin, C. 1994. Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas. *J Biol Chem* 269:16766-16773.
30. Hasegawa, M., Fujimoto, M., Kikuchi, K., and Takehara, K. 1997. Elevated serum levels of interleukin 4 (IL-4), IL-10, and IL-13 in patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 24:328-332.
31. Reinecker, H.C., Steffen, M., Witthoef, T., Pflueger, I., Schreiber, S., MacDermott, R.P., and Raedler, A. 1993. Enhanced secretion of tumour necrosis factor-alpha, IL-6, and IL-1 beta by isolated lamina propria mononuclear cells from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *Clin Exp Immunol* 94:174-181.
32. Morgan, A.R., Han, D.Y., Huebner, C., Lam, W.J., Fraser, A.G., and Ferguson, L.R. 2010. PTPN2 but not PTPN22 is associated with Crohn's disease in a New Zealand population. *Tissue Antigens* 76:119-125.
33. Rieder, F., Brenmoehl, J., Leeb, S., Scholmerich, J., and Rogler, G. 2007. Wound healing and fibrosis in intestinal disease. *Gut* 56:130-139.
34. Brenmoehl, J., Miller, S.N., Hofmann, C., Vogl, D., Falk, W., Scholmerich, J., and Rogler, G. 2009. Transforming growth factor-beta 1 induces intestinal myofibroblast differentiation and modulates their migration. *World J Gastroenterol* 15:1431-1442.
35. Dharmani and Chadee 2008. Biologic therapies against inflammatory bowel disease: a dysregulated immune system and the cross talk with gastrointestinal mucosa hold the key. *Curr Mol Pharmacol* 1:195-212.
36. van Assche G, Vanbeckevoort D, Bielen D, et al. 2003; Magnetic resonance imaging of the effects of infliximab on perianal fistulizing Chrons disease. *Am J Gastroenterology* 98:332-9

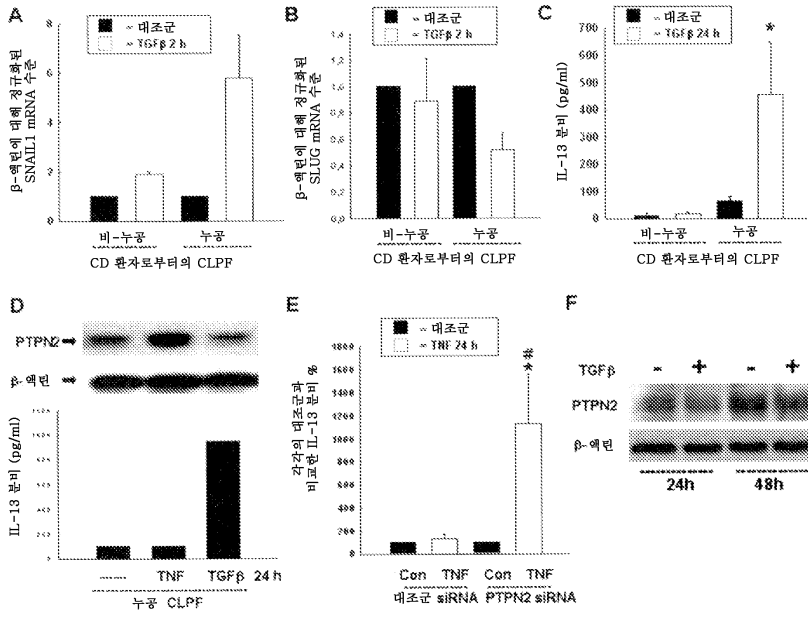
[0264]

[0265]

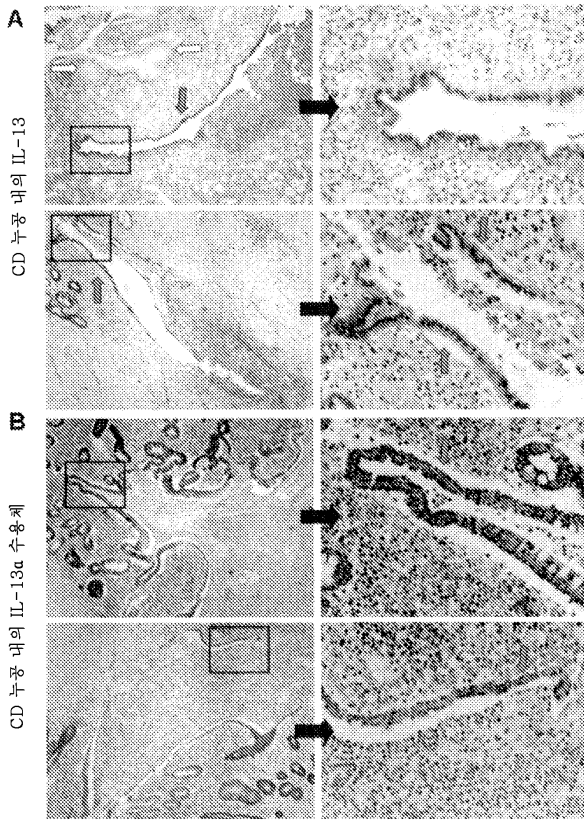


도면

도면1

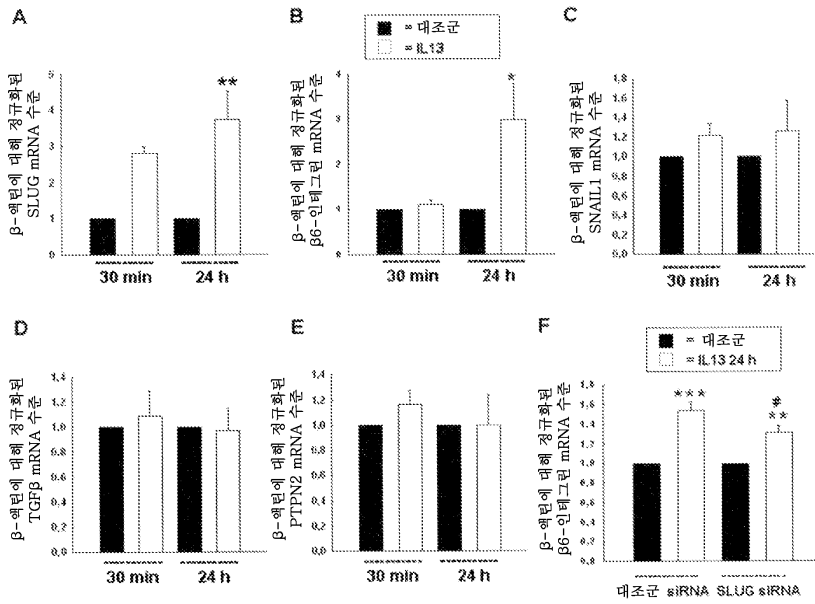


도면2

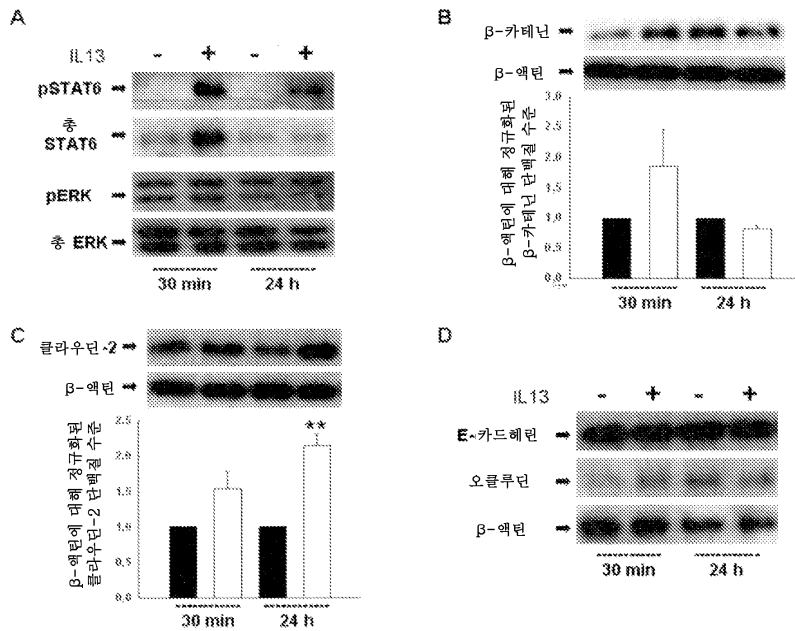




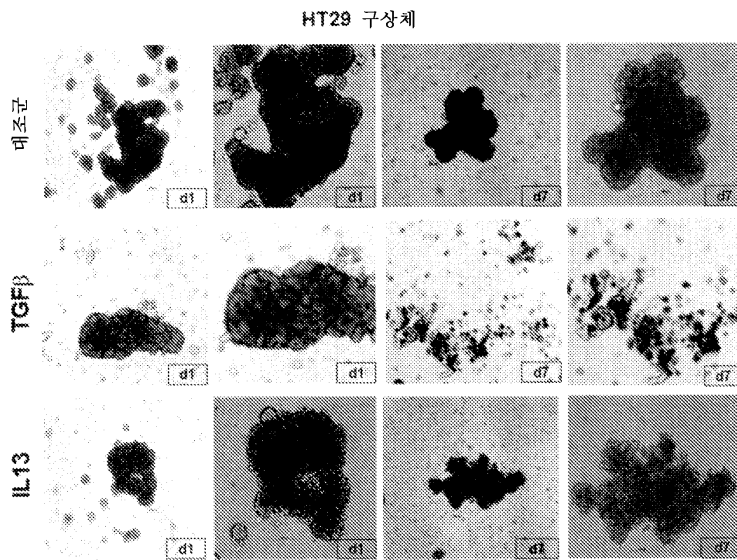
도면3



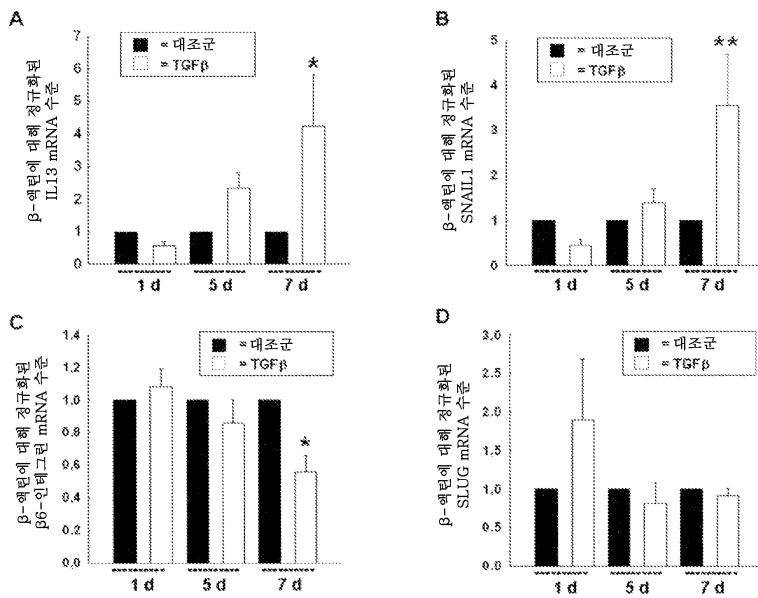
도면4



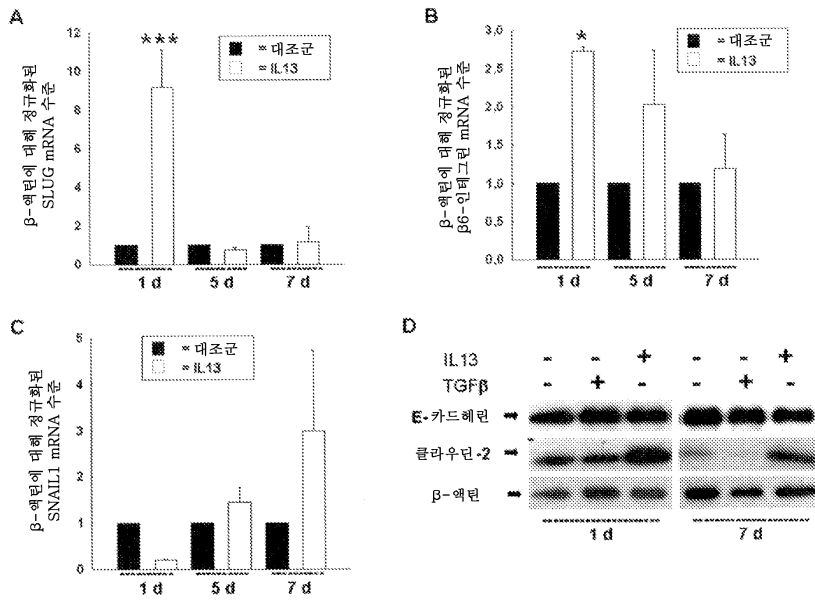
도면5



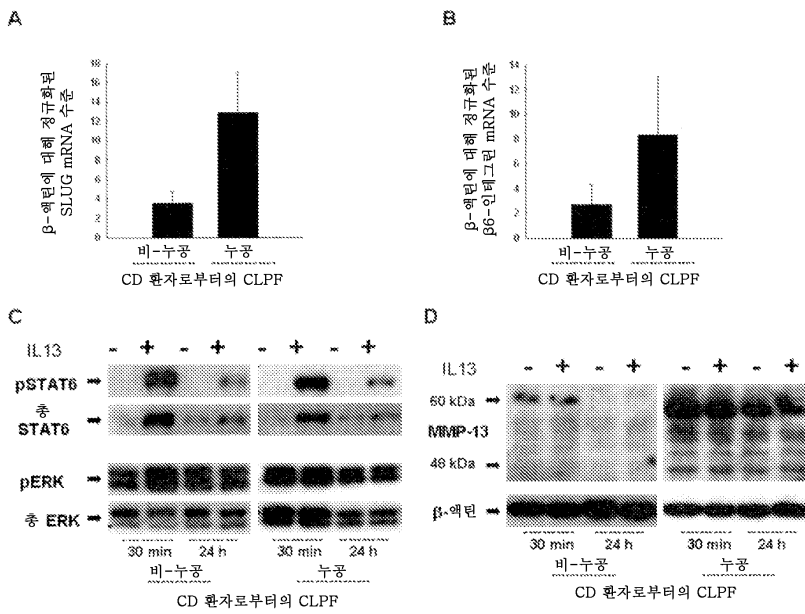
도면6



도면7



도면8



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Novartis AG
- Ruehl, Anne
- Rogler, Gerhard
- Scharl, Michael

- <120> Treatment of fistulizing Crohn's disease

<130> 54559  
<140> PCT/IB/2012/050699  
<141> 2012-02-15  
<150> US61/443829  
<151> 2011-02-17  
<160> 42  
<170> PatentIn version 3.3  
<210> 1  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 1  
Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Gly  
1                    5  
<210> 2  
<211> 8  
<212> PRT  
<  
213> Homo sapiens  
<400> 2  
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly  
1                    5  
<210> 3  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 3  
Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn  
1                    5  
<210> 4  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 4  
Val Lys Gly Ser Gly Asp Ile Pro  
1                    5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Ala Arg Leu Trp Phe Gly Asp Leu Asp

1                    5

<

210> 6

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Asn Tyr Gly Met His

1                    5

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Ser Tyr Gly Met His

1                    5

<210> 8

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Ile Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1                    5                    10                    15

Gly

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Gly Ser Gly Asp Ile Pro Phe Asp Tyr

1 5

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Leu Trp Phe Gly Asp Leu Asp Ala Phe Asp Ile

1 5 10

<210> 11

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Gln Ser Val Ser Ser Tyr

1 5

<210> 12

<211> 2

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Asp Ala

1

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

His Gln Arg Ser His Trp Pro Pro Ile

1 5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Gln Gln Arg Ser Ser Trp Pro Pro Val

1                    5

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

His Gln Arg Ser Ser Trp Pro Pro Ile

1                    5

<210> 16

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala

1                    5                    10

<210> 17

<211>

> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Arg Ala Gly Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Val

1                    5                    10

<210> 18

<400> 18

000

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr

1 5

<210> 20

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

His Gln Arg Ser His Trp Pro Pro Ile Phe Thr

1 5 10

<210> 21

<211> 11

<212> PRT

<213>

> Homo sapiens

<400> 21

Gln Gln Arg Ser Ser Trp Pro Pro Val Tyr Thr

1 5 10

<210> 22

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

His Gln Arg Ser Ser Trp Pro Pro Ile Phe Thr

1 5 10

<210> 23

<211> 115

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr

20

25

30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val







<213> Homo sapiens

<220><221> CDS

<222> (1)..(312)

<400> 26

gaa att gtg ttg acg cag tct cca gcc acc ctg tct tcg tct cca ggg 48

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

1 5 10 15

gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agc agc tac 96

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

20 25 30

tta gcc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc atc 144

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gcc agg ttc agt ggc 192

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60

agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc agc cta gag cct 240

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

65 70 75 80

gaa gat ttt gca gtc tat tac tgt cat cag cgt agc cac tgg cct ccc 288

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Arg Ser His Trp Pro Pro

85 90 95

ata ttc act ttc ggc cct ggg acc 312

Ile Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr

100

<210> 27

<211> 115

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400>

> 27

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1                    5                    10                    15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr  
                   20                    25                    30  
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
                   35                    40                    45  
 Ala Ile Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
                   50                    55                    60

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

Leu Val Thr

115

<210> 28

<211> 345

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> CDS

<222> (1)..(345)

<400> 28

gaa gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg 48

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1                    5                    10                    15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcg tct gga ttc acc ttc agt aac tat 96

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr

20                    25                    30

ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg 144

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35                    40                    45

gca att ata tgg tat gat gga agt aat aaa tac tat gca gac tcc gtg 192

Ala Ile Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat 240  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 ctg caa atg aac agt ctg aga gcc gag gac acg gct gtg tat tac tgt 288  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 gtg aaa gga tct ggg gat att ccc ttt gac tac tgg ggc cag gga acc 336  
 Val Lys Gly Ser Gly Asp Ile Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110  
 ctg gtc acc 345  
 Leu Val Thr  
 115  
 <210> 29  
 <211> 104  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 29  
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Ser Ser Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Arg Ser His Trp Pro Pro  
 85 90 95



Ile Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr

100

<210> 30

<211> 312

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> CDS

<222> (1)..(312)

<400> 30

gaa att gtg ttg acg cag tcc cca gcc acc ctg tct tcg tct cca ggg 48

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

1 5 10 15

gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agc agc tac 96

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

20

25

30

tta gcc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc atc 144

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35

40

45

tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc acc cca gcc agg ttc agt ggc 192

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

50

55

60

agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc agc cta gag cct 240

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

65

70

75

80

gaa gat ttt gca gtc tat tac tgt cat cag cgt agc cac tgg cct ccc 288

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Arg Ser His Trp Pro Pro

85

90

95

ata ttc act ttc ggc cct ggg acc 312

Ile Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr

100

<210> 31

<211> 117

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1                    5                    10                    15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

                  20                    25                    30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

                  35                    40                    45

Ala Ile Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

                  50                    55                    60

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

65                    70                    75                    80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

                  85                    90                    95

Ala Arg Leu Trp Phe Gly Asp Leu Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln

                  100                    105                    110

Gly Thr Met Val Thr

                  115

<210> 32

<211> 351

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> CDS

<222> (1)..(351)

<400> 32

gaa gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg                    48

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1                    5                    10                    15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcg tct gga ttc acc ttc agt agc tat                    96

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

                  20                    25                    30

ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg 144  
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
           35                  40                  45  
 gca att ata tgg tat gat gga agt aat aaa tac tat gcg gac tcc gtg 192  
 Ala Ile Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
           50                  55                  60  
 aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat 240  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65                  70                  75                  80  
 ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg tat tac tgt 288  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
                   85                  90                  95  
  
 gcg agg cta tgg ttc ggg gac tta gat gct ttt gat atc tgg ggc caa 336  
 Ala Arg Leu Trp Phe Gly Asp Leu Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln  
                   100                  105                  110  
 ggg aca atg gtc acc 351  
 Gly Thr Met Val Thr  
           115  
 <210> 33  
 <211> 104  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400  
 > 33  
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1                  5                  10                  15  
 Glu Arg Ala Ile Leu Ser Cys Arg Ala Gly Gln Ser Val Ser Ser Tyr  
           20                  25                  30  
 Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile  
           35                  40                  45  
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
           50                  55                  60



Val Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr

100

<210> 35

<211> 117

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400

> 35

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Ile Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Leu Trp Phe Gly Asp Leu Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Met Val Thr

115

<210> 36

<211> 351

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221

> CDS

<222> (1)..(351)

<400> 36

cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg

48

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg





Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Arg Ser Ser Trp Pro Pro  
 85 90 95

Ile Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr  
 100

<210> 38  
 <211> 312  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <220><221> CDS  
 <222> (1)..(312)  
 <400> 38

gaa att gtg ttg acg cag tct cca gcc acc ctg tct ttg tct cca ggg 48

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

gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agc agc tac 96

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr  
 20 25 30

tta gcc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc atc 144

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile  
 35 40 45

tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gcc agg ttc agt ggc 192

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc agc cta gag cct 240

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro  
 65 70 75 80

gaa gat ttt gcg gtt tat tac tgt cat cag cgt agc agc tgg ccc ccg 288  
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Arg Ser Ser Trp Pro Pro  
 85 90 95

ata ttc act ttc ggc cct ggg acc 312

Ile Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr  
 100

<210> 39  
 <211> 236  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 39

Met Ser Val Leu Thr Gln Val Leu Ala Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr  
 1 5 10 15  
 Gly Thr Arg Cys Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser  
 20 25 30  
 Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Ile Leu Ser Cys Arg Ala Gly Gln Ser  
 35 40 45  
 Val Ser Ser Tyr Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro  
 50 55 60  
 Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala  
 65 70 75 80  
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
 85 90 95  
 Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser  
 100 105 110  
 Ser Trp Pro Pro Val Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile  
 115 120 125  
 Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp  
 130 135 140  
 Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn  
 145 150 155 160

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu

165 170 175

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp

180 185 190

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr

195 200 205

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser

210 215 220

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

225 230 235

<210> 40

<211> 711

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> CDS

<222> (1)..(711)

<400> 40

atg agt gtg ctc act cag gtc ctg gcg ttg ctg ctg ctg tgg ctt aca 48

Met Ser Val Leu Thr Gln Val Leu Ala Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr

1 5 10 15

ggt acg cgt tgt gaa att gtg ttg acg cag tct cca gcc acc ctg tct 96

Gly Thr Arg Cys Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser

20 25 30

ttg tct cca ggg gaa aga gcc atc ctc tcc tgc agg gcc ggt cag agt 144

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Ile Leu Ser Cys Arg Ala Gly Gln Ser

35 40 45

ggt agc agt tac tta gtc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc 192

Val Ser Ser Tyr Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro

50 55 60

agg ctc ctc atc tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gcc 240

Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala





<210> 41

<211> 469

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Pro Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser

1                    5                    10                    15  
Val Gln Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln

                  20                    25                    30  
Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe

                  35                    40                    45  
Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

                  50                    55                    60  
Glu Trp Val Ala Ile Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala

65                    70                    75                    80  
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn

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

                  100                    105                    110  
Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Trp Phe Gly Asp Leu Asp Ala Phe Asp Ile

                  115                    120                    125  
Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly

                  130                    135                    140  
Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly

145                    150                    155                    160  
Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val

                  165                    170                    175  
Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe

                  180                    185                    190  
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val

                  195                    200                    205

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val  
 210 215 220  
 Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys  
 225 230 235 240  
 Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu  
 245 250 255  
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr  
 260 265 270  
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val  
 275 280 285  
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val  
 290 295 300  
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser  
 305 310 315 320  
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu  
 325 330 335  
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala  
 340 345 350  
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro  
 355 360 365  
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln  
 370 375 380  
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala  
 385 390 395 400  
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr  
 405 410 415  
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu  
 420 425 430  
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
 435 440 445  
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser



Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Trp Phe Gly Asp Leu Asp Ala Phe Asp Ile  
 115 120 125  
 tgg ggc caa ggg aca atg gtc acc gtc tcc tca gcc tcc acc aag ggc 432  
  
 Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly  
 130 135 140  
 cca tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct ggg ggc 480  
 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly  
 145 150 155 160  
 aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg 528  
 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val  
  
 165 170 175  
 acg gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc 576  
 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe  
 180 185 190  
 ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc gtc gtg 624  
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val  
 195 200 205  
  
 acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg 672  
 Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val  
 210 215 220  
 aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aga gtt gag ccc aaa 720  
 Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys  
 225 230 235 240  
 tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc 768  
  
 Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu  
 245 250 255  
 ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc 816  
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr  
 260 265 270  
 etc atg atc tcc egg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg 864

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val

275 280 285

agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg 912

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val

290 295 300

gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc 960

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser

305 310 315 320

acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg 1008

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu

325 330 335

aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc 1056

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

340 345 350

ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca 1104

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro

355 360 365

cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag aac cag 1152

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln

370 375 380

gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc 1200

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala

385 390 395 400

gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg 1248

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr

405 410 415

cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tat agc aag ctc 1296

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

420 425 430

acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc 1344  
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
 435 440 445  
 gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc 1392  
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
 450 455 460  
 ctg tcc ccg ggt aaa tga 1410

Leu Ser Pro Gly Lys  
 465