

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-502314
(P2005-502314A)

(43) 公表日 平成17年1月27日(2005.1.27)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B O 2 4
A 6 1 K 35/76	A 6 1 K 35/76	4 B O 6 4
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 48/00	4 B O 6 5
A 6 1 K 48/00	A 6 1 P 11/06	4 C O 8 4
A 6 1 P 11/06	A 6 1 P 43/00	1 2 1 4 C O 8 7
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 124 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-570736 (P2002-570736)
 (86) (22) 出願日 平成14年3月1日 (2002.3.1)
 (85) 翻訳文提出日 平成15年9月1日 (2003.9.1)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2002/000900
 (87) 国際公開番号 W02002/070711
 (87) 国際公開日 平成14年9月12日 (2002.9.12)
 (31) 優先権主張番号 0105360.2
 (32) 優先日 平成13年3月3日 (2001.3.3)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(71) 出願人 397009934
 グラクソ グループ リミテッド
 GLAXO GROUP LIMITED
 イギリス ミドルセックス ユービー6
 Oエヌエヌ グリーンフォード パークレ
 ー アベニュー グラクソ ウェルカム
 ハウス (番地なし)
 Glaxo Wellcome Hous
 e, Berkeley Avenue G
 reenford, Middlesex
 UB6 ONN, Great Brita
 in
 (74) 代理人 100091096
 弁理士 平木 祐輔

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ワクチン

(57) 【要約】

本発明は自己抗原に対する免疫感作のために有用な単離されたポリペプチドに関する。特に本発明は、in vivoで投与した場合に自己抗体を生じさせることのできる自己タンパク質に関する。本発明はとりわけ、ヒトにおいてヒトサイトカインを免疫原性にするに関する。本発明はさらに、そのような化合物を含む医薬組成物および医療におけるその使用、ならびにその調製方法に関する。

```

60  GAGCCGCTCCGAAAGTCTGTCTCTCCCTCTGACCCCTAGGGAGCTCATGAGGAGCCG
1  C P V P R S A V S L P L T L E E L I E E L
61  GPCACACACACACAGACCAGACTCCCTCTGCAACGSCAGACGGTGAAGAAATGAGAC
61  V N I T Q D Q T P L C N G S K V W S V D
121  CPGCCCGCTGGCGGTACTCTGACGCTGGAATGCCCTGACCAACTCTCCAAATGCAAT
121  T A A G C Y C A A L E S L T N I S N C N
181  GCDATCGAGAGACCCAGAGGATGCTGGCGGACTCTGTATACCGCAAGSCUCCUACIACG
181  A T R K T Q R M L G G L C N R K A P T T
241  GCTCCGCGUUCUUGATACCAAAATGAGTCCGCCAGTTTGTAAAGGACCTGCTCCGC
241  V S S L P D T K L S V A Q F V K D T L S
361  TACACAAAGCACTGTTTCGCGCCAGCGCCCTTCTAA
361  Y T K Q L F R H G D P A
    
```

```

-23  --- 0
MGLTSQLPPIKFFLACGNFVHG
1  ----- 24
HKCDGHLRELIQHLNVEVGEKTL
25  ----- 48
CTELCVIDCFPAASXNCCRELVCR
49  ----- 72
ASRYLRIPLYLQHFQTRCCGATAK
73  ----- 96
NSSVLMELORLPRAPRCLGIANRC
97  ----- 120
FVXDAFQSLKDFEBSLESINQME
121  ----- 126
YSKCSS
    
```

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

あるヒトタンパク質に対して30%以上100%未満同一である単離されたタンパク質であって、そのポリペプチドが、

(a)類似の非ヒトタンパク質に特徴的な少なくとも1つの変異を含んでおり、

(b)ヒトの体内で抗体を生起させることができ、

(c)該ヒトタンパク質と構造的に十分に類似していて、該抗体が該ヒトタンパク質と該ポリペプチドの両方に結合するものであり、

そして該タンパク質は抗体ではない、上記タンパク質。

【請求項 2】

哺乳動物の自己抗原由来のB細胞エピトープおよび第2の哺乳動物種の類似したタンパク質の配列を生じさせる変異を有するタンパク質であって、B細胞エピトープの起源となった動物種において、B細胞エピトープが誘導された天然タンパク質を認識する免疫応答を引き出すことができる、上記タンパク質。

10

【請求項 3】

自己タンパク質のB細胞エピトープが第2の哺乳動物種由来の類似タンパク質のフレームワーク中に置換によってグラフトされているタンパク質であって、B細胞エピトープの起源となった動物種において、B細胞エピトープが誘導された天然タンパク質を認識する免疫応答を引き出すことができる、上記タンパク質。

【請求項 4】

表面に露出していない領域に導入された保存された表面領域を含んでなり、前記変異が類似したタンパク質の配列を生じさせ、それによって前記タンパク質が、自己タンパク質の起源となった該動物種において、自己タンパク質に対する免疫応答を引き出すことができるようになる、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

20

【請求項 5】

前記免疫応答が中和抗体応答である、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 6】

前記ヒトタンパク質、またはB細胞エピトープがサイトカイン由来のものである、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 7】

4-ヘリカルサイトカインである、請求項 6 に記載のサイトカイン。

30

【請求項 8】

IL-4またはIL-13である、請求項 7 に記載のサイトカイン。

【請求項 9】

下記の1以上の置換またはその保存的置換を含む置換を有する変異型ヒトIL-13。

R	K	30位
V	S	37位
Y	F	63位
A	V	65位
E	D	68位
E	Y	80位
K	R	81位
M	I	85位
G	H	87位
Q	H	113位
V	I	115位
D	K	117位

40

【請求項 10】

複数の請求項 9 で示した置換を有する、請求項 9 に記載の変異型ヒトIL-13。

【請求項 11】

50

下記の 1 以上の配列：

L K E L I E E L S N

F C V A L D S L

A I Y R T Q R I L H G

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

または 1 以上の保存的置換を含んでなる該配列の改変体を有する、請求項 9 または 10 に記載の変異型ヒト IL-13。

【請求項 12】

図 9 に示す変異型ヒト IL-13。

【請求項 13】

請求項 1 ~ 12 に記載のタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

【請求項 14】

DNA であり、プロモーターと機能的に連結されている、請求項 13 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 15】

請求項 13 または 14 に記載のポリヌクレオチドを含有するベクター。

【請求項 16】

請求項 13 もしくは 14 に記載のポリヌクレオチド、または請求項 15 に記載のベクターにより形質転換された宿主。

【請求項 17】

請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載のタンパク質、ポリヌクレオチド、ベクターを、製薬上許容される担体または賦形剤と共に含んでなる医薬組成物。

【請求項 18】

さらにアジュバントをも含んでなる、請求項 17 に記載の医薬組成物。

【請求項 19】

請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載のタンパク質および免疫刺激性オリゴヌクレオチドを含んでなる、請求項 18 に記載の医薬組成物。

【請求項 20】

免疫刺激性オリゴヌクレオチドが次の群：

オリゴ1(配列番号1)：TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT (CpG 1826)

オリゴ2(配列番号2)：TCT CCC AGC GTG CGC CAT (CpG 1758)

オリゴ3(配列番号3)：ACC GAT GAC GTC GCC GGT GAC GGC ACC ACG

オリゴ4(配列番号4)：TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT (CpG 2006)

オリゴ5(配列番号5)：TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT (CpG 1668)

から選択されたものである、請求項 19 に記載の医薬組成物。

【請求項 21】

医療において使用するための、請求項 1 ~ 20 のいずれか 1 項に記載のタンパク質、ポリヌクレオチド、ベクター、宿主、または組成物。

【請求項 22】

IL-13 が媒介する疾患の治療用医薬の製造における、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載のタンパク質の使用。

【請求項 23】

喘息治療用である、請求項 22 に記載の使用。

【請求項 24】

請求項 17 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の組成物の安全かつ有効な量を、それを必要とする患者に投与することを含んでなる、IL-13 が媒介する疾患の治療または予防方法。

【請求項 25】

請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載のタンパク質の調製方法であって、

1. 抗体応答が望まれる自己(典型的にはヒト)タンパク質の 1 以上の領域を同定すること

；

10

20

30

40

50

2. 該自己タンパク質のアミノ酸配列を同定すること；

3. 類似のタンパク質のアミノ酸配列を同定すること；

ステップ1で同定された標的領域（そのアミノ酸配列はステップ2で同定された配列から得られる）の少なくとも1つ、およびステップ3で同定された配列からの十分なアミノ酸を含んでなるキメラ分子を組換えDNA技法により構築することを含んでなり、その結果として得られるタンパク質が自己タンパク質と類似した形状へと折りたたまれることが可能となり、それによって該変異タンパク質が自己タンパク質を認識する免疫応答を引き出すことができるようになる、上記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は、自己抗原に対する免疫感作のために有用な単離されたポリペプチドに関する。特に本発明は、*in vivo*で投与した場合に自己抗体を生起させることのできる自己タンパク質に関する。本発明はとりわけ、ヒトにおいてヒトサイトカインを免疫原性にするのに関する。本発明はさらに、そのような化合物を含む医薬組成物および医療におけるそれらの使用、ならびにそれらの調製方法に関する。

【背景技術】

【0002】

喘息は慢性の肺疾患で、気道下部の炎症が原因であり、再発性の呼吸障害を特徴とする。患者の気道は敏感になっており、症状のない時ですら常にある程度腫脹または炎症を起こしている。炎症によって気道の狭窄が起こり、肺を出入りする気流を低減させ、呼吸が困難となり、喘鳴、胸部圧迫感、および咳が出るようになる。喘息はアレルゲン（例えば、塵埃、花粉、カビ）に対する過敏症、刺激物（例えば、喫煙、香水、強い異臭）、呼吸器感染、運動、および乾燥した気候が引き金となる。それらの引き金は気道を刺激し、気道の内壁は腫脹してより炎症が強くなり、粘液は気道を塞ぎ、気道周囲の筋肉は緊張して呼吸が困難でストレスの強いものとなり、喘息の症状が出現する。

20

【0003】

COPD（慢性閉塞性肺疾患）とは呼吸管の疾患を包括的に示す用語で、喘息と似た症状を呈し、同じ薬物で治療される。COPDは慢性かつ進行性であり、気道の障害は大部分が非可逆的であることを特徴とする。この疾患の経過への個人の寄与は不明であるが、喫煙は90%の症例で原因となっていると考えられている。症状としては、咳、慢性気管支炎、息切れ、および呼吸器感染が含まれる。この疾患は究極的には重篤な能力障害と死に至る。

30

【0004】

モノクローナル抗体には生産、投与および耐性に関連する種々の問題点があるので、ワクチン接種によって適切な特異性を有する内因性抗体を生成させるために患者自身の免疫系を働かせようとする方法がますます関心を集めている。しかし、哺乳動物はその血清中に存在する自己タンパク質に対して高力価の抗体を通常は産生しないが、それはそのような抗体の産生を防止するホメオスタシスの機作が免疫系に働いているからである。このような免疫寛容の機作の重要性は、重症筋無力症のような疾患で説明することができ、これらの疾患では、骨格筋のニコチン様アセチルコリン受容体に対する自己抗体が脱力および疲労を生じさせる（Drachman, 1994, N. Engl. J. Med. 330:1797-1810）。従って、自己抗体が媒介する病態を引き起こすことなく抗体寛容機作を迂回することのできるワクチンアプローチの必要性がある。

40

【0005】

許容しがたい自己免疫性の毒性を誘発することなく、B細胞の免疫寛容を起こさせないことを目的として多数の技法がデザインされてきた。しかし、それらの全てに大きな欠点がある。

【0006】

ある技法は、自己タンパク質（またはそれに由来するペプチド）を高度の免疫原性を有する担体タンパク質、例えばキーホールリンペットのヘモシアニンなどと化学的に架橋させる

50

ことを含んでいる(「抗体：実験室マニュアル」"Antibodies:A laboratory manual", Harlow, E.とLane, D. 1988, Cold Spring Harbor Press)。このアプローチは、免疫原性の低い標的(例えば低分子量の化合物など)に対する抗体を生成させるために広く用いられているハプテン-担体系の変法である。しかし、化学結合させるプロセスは有益な可能性のあるエピトープを破壊して、抗体応答の多くが担体蛋白に対するものとなりうる。さらにこのアプローチはタンパク質を用いたワクチン接種にのみ適応可能であり、核酸を免疫原とするものには用いることができない。

【0007】

担体タンパク質を用いる技法の変法としては、担体タンパク質(例えば、B型肝炎ウイルスのコア抗原)と自己タンパク質の双方を含んでいる融合タンパク質をコードする遺伝子を構築することが含まれる(「免疫原性ペプチドの担体としてのB型肝炎ウイルスのコア抗原」"The core antigen of hepatitis B virus as a carrier for immunogenic peptides", Biological Chemistry, 380(3):277-83, 1999)。この融合遺伝子は核酸ワクチンの一部として直接的に投与することができる。あるいはまた、*in vitro*で適切な宿主細胞中で発現させ、その遺伝子産物を精製し、アジュバントを用いて、またはアジュバントを用いずに、従来形のワクチンとして送達させることができる。しかし、大きな担体タンパク質を自己タンパク質と融合させることは自己タンパク質のコンフォメーションを束縛するか、またはゆがめ、天然分子と交差反応性の抗体を産生させる効率を低減させうる。また、旧来の架橋させた担体系と同様に、抗体応答の多くはその融合体の担体部分に対するものとなる。担体に対する抗体応答は、その後に行われるワクチンのブースター投与の有効性を限定するか、またはアレルギー性もしくはアナフィラキシー性の反応が起こる機会を増やしてしまう。

【0008】

より洗練されたアプローチがDalumと共同研究者らによって報告されており、その方法は、単一のクラスII MHC制限エピトープを標的分子中に挿入するものである。彼らはこの方法を用いてユビキチン(Dalumら, 1996, J. Immunol. 157:4796-4804; Dalumら, 1997, Mol. Immunol. 34:1113-1120)およびサイトカインTNF(Dalumら, 1999, Nature Biotech. 17:666-669)に対する抗体を引き出すことを実証した。その結果、全てのT細胞ヘルプは、この単一のエピトープまたは接合配列から生じなければならない。このアプローチは、ワクチンがそのためにデザインされた適切なMHCクラスIIハプロタイプを有している被験者、または接合エピトープと結合することのできるクラスII分子を幸いにして有している被験者においてはうまく働くが、正常な交雑集団、例えばヒトに典型的な集団などでは、その集団の大部分の人々でそのワクチンが働かないだろう。さらに、挿入されたエピトープが典型的には、卵アルブミンまたはリゾチームなどの全く関連のないタンパク質からのものであるので、追加した配列が標的タンパク質の折り畳みのある程度妨害する可能性があり、それによって標的タンパク質が完全な天然のコンフォメーションを取ることを妨げられる。

【0009】

上述した全てとは対照的に、本発明は、多数の、可能性のあるT細胞エピトープを提供するが、標的分子を天然型に近いコンフォメーションに保持する。これらの性質のため、本発明のワクチンは、複雑な交雑集団、例えばヒト患者からなる集団などで効果的な免疫原となる。これらの性質は、自己タンパク質に変異を与えて、その位置で、類似のタンパク質に見出される配列を生じさせることにより達成される。

【0010】

いくつかの最近の論文は、アレルギー性喘息の卵白アルブミンモデルにおける病態を駆動する際のTh2サイトカインIL-13の決定的に重要な役割を明らかにしている(Wills-Karpら, 1998; Grunigら, 1998)。この研究では、卵白アルブミンにあらかじめ感作させたマウスに、IL-13と結合してそれを中和する可溶性IL-13レセプターを注射した。治療群ではアセチルコリンチャレンジに対する気道の過剰応答性は完全に除かれた。組織学的分析から、処置マウスは対照で認められた杯細胞化生を逆行させたことが明らかとなった。補足的実

10

20

30

40

50

験では、肺のIL-13レベルが、トランスジェニックマウスでは過剰発現によって、野生型マウスでは気管内へのタンパク質の定着によって、上昇した。どちらの場合でも、気道の過剰反応性、好酸球の浸潤、および粘液産生の増加が認められた(Zhuら, 1999)。これらのデータは、IL-13活性が十分に確認されたモデルにおいてアレルギー性喘息の主要な臨床的および病理学的特徴のいくつかを作り出すのに必要でかつ十分なものであることを示している。

【0011】

従って、IL-13に対する中和応答を引き出すことのできるワクチンは、ヒトのアレルギー性喘息を治療するための有用な治療薬となりうるものである。そのようなワクチンはまた、ある種の蠕虫感染関連疾患(Brombacher, 2000)、および慢性閉塞性肺疾患などのIL-13 10
産生が線維症に関連している疾患(Chiaramonteら, 1999)の治療にも応用されるであろう。本発明はこのような要求に応えようとするものである。

【0012】

従って、本発明の概念および原理はIL-13に関して示してはいるが、それらは第2の動物種中に類似のタンパク質があるどのような哺乳動物の自己タンパク質に対しても適用することができる。

【発明の開示】

【0013】

本発明は、あるヒトタンパク質に対して30%以上100%未満同一である単離されたポリペプチドを提供し、そのポリペプチドは 20

- (a)類似の非ヒトタンパク質に特徴的な少なくとも1つの変異を含んでおり、
- (b)ヒトの体内で抗体を誘導することができ、
- (c)該ヒトタンパク質と構造的に十分に類似していて、誘導された抗体が該ヒトタンパク質と該ポリペプチドの両方に結合し、かつ
- (d)抗体ではない。

【0014】

従って、本発明は、一実施形態において、哺乳動物の自己抗原由来のB細胞エピトープおよび第2の哺乳動物種由来の類似タンパク質の配列を生じさせる変異を有するタンパク質を提供し、そのタンパク質は、B細胞エピトープが由来したもとの動物種において、そのB細胞エピトープが誘導されたもとの天然タンパク質を認識する免疫応答を引き出すことができるものである。 30

【0015】

好ましくは、その類似タンパク質の配列は、5個より多い、より好ましくは8個より多い連続したアミノ酸からなる。従って、本発明のタンパク質は、その類似配列と少なくとも5個、好ましくは少なくとも8個の連続したアミノ酸について同一である。別の実施形態においては、第2の哺乳動物種由来の類似タンパク質のフレームワーク中に置換によってグラフトされた自己タンパク質のB細胞エピトープを有するタンパク質が提供され、その結果、そのタンパク質は、該B細胞エピトープが由来したもとの動物種において、そのB細胞エピトープが誘導されたもとの天然タンパク質を認識する免疫応答を引き出すことができるようになる。 40

【0016】

本発明のタンパク質が抗体ではないことは理解されるであろう。生じた免疫応答は好ましくは抗体を産生する応答であり、最も好ましくは中和抗体を産生する応答である。

【0017】

通常、変異は、表面に露出させた領域が保存されるように、分子の表面に露出していない領域中に導入することが好ましい。表面に露出されている領域は免疫系に接近可能であり、その結果B細胞エピトープを含むことが多い。従って、本発明は、自己タンパク質の表面に露出している保存された領域、および表面に露出していない、変異が導入された領域を含んでなり、その変異は類似のタンパク質の配列を生じさせ、その結果、該タンパク質は自己タンパク質が由来したもとの動物種においてその自己タンパク質に対する免疫応答 50

を引き出すことができるようになる。

【0018】

自己タンパク質は好ましくはヒトタンパク質であるが、自己免疫応答をそれに対して引き出すことを所望するいかなる哺乳動物のタンパク質であってもよい。そのような免疫応答は好ましくは天然のタンパク質および本発明の免疫原に対して特異的なものである。その免疫応答は他の自己タンパク質に対する交差反応性または中和能が最小限となっている。

【0019】

自己抗原は、好ましくはサイトカインであり、より好ましくは4ヘリカルサイトカインであり、さらにより好ましくはIL-4またはIL-13であり、最も好ましくはIL-13である。従って、本発明の好ましい実施形態においては、マウスIL-13バックボーン中にヒトIL-13由来のB細胞エピートープを含んでなるキメラタンパク質を提供する。そのような構築物はヒトの体内で特異的な抗IL-13抗体応答を引き出すことができる。そのような構築物を図9に示してある(配列番号21および22)。同様に、ヒトIL表面領域とマウスフレームワークを含んでなるIL-4構築物は図13に示してある(配列番号25)。

10

【0020】

本発明はまた、次のものも提供する：

- 本発明のポリヌクレオチドを含んでなり、本発明のポリペプチドを発現することのできる発現ベクター；
- 本発明の発現ベクターを含んでなる宿主細胞；
- 本発明のポリペプチドを産生させる方法であって、本発明の宿主細胞を該ポリペプチドの発現に適した条件下で維持し、該ポリペプチドを単離することを含む上記方法；
- 本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチド、および製薬上許容される担体を含んでなるワクチン組成物。

20

【0021】

別の形態においては、本発明は本発明のポリペプチドをデザインおよび調製するための方法を提供し、その方法は次のステップを含んでなる：

1. 抗体応答が望まれる自己タンパク質(典型的にはヒトタンパク質)の1以上の領域を同定すること；
2. 該自己タンパク質のアミノ酸配列を同定すること；
3. 類似のタンパク質のアミノ酸配列を同定すること；

30

ステップ1で同定された標的領域(そのアミノ酸配列はステップ2で同定された配列から得られる)の少なくとも1つ、およびステップ3で同定された配列からの十分な数のアミノ酸を含んでなるキメラ分子を組換えDNA技法により構築し、その結果として得られるタンパク質が自己タンパク質と類似した形状へと折りたたまれることが可能となり、それによって該変異タンパク質が自己タンパク質を認識する免疫応答を引き出すことができるようになる。

【0022】

図面の説明

GST= グルタチオンS-トランスフェラーゼ、rmIL-13= 組換えマウスIL-13、rhIL-13= 組換えヒトIL-13、cIL-13= キメラIL-13

40

図1. マウスキメラIL-13ワクチン構築物の配列。下線を付したアミノ酸略号はヒトIL-13配列を示し、下線を付していないアミノ酸略号はマウスIL-13由来のものである。

図2. 4~20% Tris-グリシン SDS-PAGEゲル(Novex)によるGST-cIL-13の分析。クーマシーブルーで全タンパク質を染色したもの。

図3. GST-cIL-13のウエスタンブロット分析。

図4. cIL-13およびGST-cIL-13と抗mIL-13ポリクローナル抗体、抗hIL-13ポリクローナル抗体、および抗GSTポリクローナル抗体との相互作用のELISA分析。

図5. cIL-13およびGST-cIL-13とmIL-13レセプター、mIL-13R₁、およびmIL-13R₂との相互作用のELISA分析。

図6. A549溶解物の抗ホスホSTAT6ウエスタンブロット。

50

図7 . GST-cIL-13(マウスF5)またはcIL-13(マウスE5)を用いた免疫感作によって誘導された抗体応答。

図8 . A549溶解物の抗ホスホSTAT6ウエスタンブロット分析。

図9 . ヒトに用いるためのキメラIL-13ワクチン。下線を付したアミノ酸略号はマウスIL-13に存在するものであり、下線を付していない略号はヒトIL-13由来のものである。

図10 . cIL-13を種々のアジュバントと組み合わせて投与した後の抗マウスIL-13抗体のプロファイル。

図11 . cIL-13投与後のマウス血清中和能。

図12 . マウス免疫原として使用するための代替cIL-13。

図13 . ヒト抗IL-4ワクチン中で用いるためのキメラIL-4。

10

【0023】

発明の詳細な説明

本明細書全体および添付の特許請求の範囲を通じて、文脈によって他の意味で読むことを要求しない限りは、「含んでなる」"comprise"および「含む」"include"、またはそれらの変形したものである"comprising"、"comprises"、"including"、"includes"、その他のものは、包括的に解釈すべきもの、すなわち、これらの用語の使用は、個々に特別に列挙していない整数または要素を包含しうることを意味しているものである。

【0024】

本明細書に記載したとおり、本発明は単離されたポリペプチドおよび単離されたポリヌクレオチドに関する。本発明の文脈では「単離された」という用語は、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドが、少なくともある程度は精製されたものであるか、または例えば組換え法もしくは機械的合成法によって合成的に調製されたものであって、その天然の状態にはないことを意味している。従って、「単離された」という用語は、該ポリペプチドもしくはポリヌクレオチドが他の生物学的もしくは非生物学的物質（例えば、細胞、細胞もしくは細胞断片の懸濁液、タンパク質、ペプチド、発現ベクター、有機もしくは無機溶剤、またはその他の物質）と適宜に組み合わされて存在している可能性を含むものであるが、該ポリヌクレオチドが天然で見られるような状態にあることは除外するものである。

20

【0025】

本発明の利点は、本発明のポリペプチドが、抗体応答が所望されている自己（例えばヒト）タンパク質の領域を、類似のタンパク質に特徴的な領域とともに含んでいる点にあり、その類似タンパク質は、優れたT細胞ヘルプを提供するためにヒトタンパク質とは十分に異なっているが、進化によって最適化されてヒトタンパク質と高度に類似した形状へ折りたたまれているものである。このことによって、その自己抗原を認識する抗体の誘導が可能となる。典型的には、誘導された免疫応答には中和抗体応答を生起させることが含まれる。

30

【0026】

本発明のヒトタンパク質はヒトゲノムによりコードされる完全長のタンパク質、またはヒトゲノムによりコードされる完全長のタンパク質のドメインもしくはサブユニットとすることができる。自己抗原の機能性ドメインもしくはレセプター結合ドメインに対する中和抗体を生じさせることを所望する場合には、これらの領域のみを含んでいるキメラ抗原を調製することができる。従って、このようなドメインの露出されている領域、またはそのようなドメインのB細胞エピトープは保存され、類似タンパク質の変異がB細胞エピトープではないドメインもしくは表面に露出されていないドメイン中に導入される。

40

【0027】

「タンパク質」という用語は、例えば、ニューロペプチドなどのペプチドと呼ばれることのある、より短いアミノ酸残基の配列を含むことを意図している。ヒトタンパク質は典型的には、グリコシル化、タンパク加水分解による切断、リン酸化、および他の当業者にはよく知られたものなどの翻訳後修飾を受ける。ヒトタンパク質は好ましくはサイトカイン、ホルモン、増殖因子、もしくは細胞外タンパク質で、より好ましくは4-ヘリカルサイトカイン、最も好ましくはIL-13である。サイトカインとしては、例えば、IL-1、IL-2、IL-

50

3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-20、IL-21、IL-25、TNF、TGF、GMCSF、MCSF、およびOSMが含まれる。4-ヘリカルサイトカインとしては、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-13、GMCSF、およびMCSFが含まれる。ホルモンとしては、例えば、黄体形成ホルモン(LH)、卵胞刺激ホルモン(FSH)、絨毛性性腺刺激ホルモン(CG)、VGF、成長ホルモン放出ホルモン、アグーティ、アグーティ関連タンパク質、およびニューロペプチドYが含まれる。増殖因子としては、例えば、VEGFが含まれる。細胞外タンパク質としては例えば、APPまたはB-アミロイドが含まれる。

【0028】

類似タンパク質とは、自己タンパク質、例えばヒトタンパク質に対してオルソログス(orthologous)またはパラログス(paralogous)なもので、オルソログスなタンパク質は系統図によって種々の生物体に共通の祖先までたどることができ、従って、種々の生物体中で類似の保存された機能を示すものと考えられる。このようにオルソログスな遺伝子とは、単一の祖先の遺伝子を起源とした、配列が非常に類似した遺伝子を意味し、従って種々の動物種中で同等な遺伝子であり、共通の祖先から進化してきたものである。特に、ヒトにおいては、オルソログスなタンパク質はヒト以外の哺乳動物でのものと構造的に同等な分子である。パラログスなタンパク質とは、ある生物体内に複製イベントによって2以上のコピー数で存在するタンパク質であり(Venter, Science; 1336, vol 291; 2001)、すなわち、遺伝子複製によって多様化した相同な配列(共通の進化の祖先を持つ)である。好ましくは、類似タンパク質はオルソログである。オルソログタンパク質は典型的には、ヒトタンパク質と同じ名称を持ち、典型的には同じ機能を果たし、例えばマウスIL-13はヒトIL-13のオルソログ体である。類似タンパク質は典型的には哺乳動物または鳥類のものであり、例えば、ウシ、ヒツジ、マウスなどのげっ歯類、ブタ、サル、ネコ、イヌ、またはヒトのものである。好ましくは類似タンパク質はマウスのものである。このように本発明の文脈では、マウスIL-13がヒトIL-13に対して類似の(およびオルソログスな)タンパク質である。同様に、サルIL-4はヒトIL-4に対して類似の(およびオルソログスな)タンパク質である。

【0029】

本発明のポリペプチドは好ましくは、類似タンパク質に特徴的な変異を2、3、4、5、6、7、8、9、10、11カ所、またはそれ以上含んでなる。より好ましくは該ポリペプチドは少なくとも3カ所の変異を含んでなる。各変異は同一のまたは異なる類似タンパク質の特徴を示すことができる。従って第1の変異はマウス類似体に特徴的で、第2の変異がサル類似体に特徴的なものとすることができる。1つの構成によれば、該ポリペプチドは少なくとも3カ所の変異を含んでなり、各変異は異なる類似体の特徴を示す。しかし、好ましくは、各変異は同じ類似体の特徴を示すものである。1つの変異は該タンパク質のアミノ酸配列の1カ所の変化であり、そのようなものとしては例えば、欠失、挿入、および置換が含まれる。好ましくは、その変異は置換である。2個以上のアミノ酸がそれぞれ表面に露出されていない領域で置換されていることが好ましい。

【0030】

類似タンパク質に特徴的な変異は、ヒトタンパク質の配列が、そのヒトタンパク質を変異させた後では、類似タンパク質の配列に対して同一性の点でより近いものとなるような変異である。例えば、ヒト配列がProProArgValであってマウス類似体の配列がProProTyrValである場合には、該類似タンパク質に特徴的な変異はArgをTyrに置換することである。好ましくは、該変異は、生理学的条件下に水溶液中で折りたたまれた天然の活性タンパク質の表面に存在する残基になされた変異ではない。それらの表面残基、特にループ構造を形成している残基はB細胞エピトープであることが多く、それらの領域の全てが保存されていることが好ましい。このように導入された変異は自己タンパク質の免疫寛容を破壊する機能を有し、かつ変異させていないタンパク質が由来したもとの動物種中で免疫原性があるものである。

【0031】

一つの実施形態においては、本発明のポリペプチドは、あるヒトタンパク質に対して、好

ましくはそのヒトタンパク質の全長にわたって、30%以上100%未満の同一性である。好ましくは該ポリペプチドは少なくとも40%、例えば少なくとも50%、そのヒトタンパク質と同一である。より好ましくは、該ポリペプチドは少なくとも60%、例えば少なくとも70%、そのヒトタンパク質と同一である。最も好ましくは、該ポリペプチドは少なくとも85%、例えば少なくとも90%、そのヒトタンパク質と同一である。そのようなタンパク質はそのヒトタンパク質を認識する免疫応答をヒト体内で生起させることができる。

【0032】

例えば、UWGCG PackageはBESTFITプログラムを提供し、それは相同性を計算するために用いることができる(例えば、そのデフォルト設定で用いる)(Devereuxら(1984), *Nucleic Acids Research* 12, p387-395)。PILEUPおよびBLASTアルゴリズムは相同性を計算するため、または配列をラインアップするために用いることができ(典型的には、それらのデフォルト設定で)、それらについては例えば、Altschul(1993), *J. Mol. Evol.* 36:290-300; Altschulら(1990), *J. Mol. Biol.* 215:403-10に述べられている。

10

【0033】

BLAST分析を行うためのソフトウェアはNational Centre for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)経由で一般に利用できるようになっている。このアルゴリズムではまず最初に、あるワードをデータベース配列中の同じ長さのワードとアラインメントさせたときに正の値の閾値スコアTとマッチする、またはそれを満足する問合せ(query)配列中のWの長さの短いワードを同定することによって高いスコアリングの配列ペア(HSP)を同定することを含む。Tとは隣接するワードスコア閾値を意味する(Altschulら, 1990)。これらの当初の隣接ワードヒットは、それらを含んでいるHSPを見出す目的での検索を開始するためのシーズとして働く。ワードヒットは各配列に沿って両方向に累積アラインメントスコアが増加しうる限り伸長される。両方向へのワードヒットの伸長は次の場合に停止される: 累積アラインメントスコアがその最大到達可能値からある量Xだけ落ちた場合; 累積スコアが1つ以上の負スコアリング残基アラインメントの蓄積によってゼロ以下となった場合; またはどちらかの配列がその末端に達した場合。BLASTアルゴリズムのパラメーターW、T、およびXはアラインメントの感度およびスピードを定める。BLASTプログラムは、このプログラムがポリヌクレオチドについて用いられる場合には、デフォルトとしてワード長(W)を11、BLOSUM62スコアリングマトリクス(HenikoffおよびHenikoff(1992), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:10915-10919)アラインメント(B)を50、期待値(E)を10、M=5、N=4、および二つの鎖の比較を用いる。

20

30

【0034】

BLASTアルゴリズムは2つの配列間の類似性についての統計学的解析を行う; 例えば、KarlinおよびAltschul(1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:5873-5877を参照されたい。BLASTアルゴリズムによって提供される類似性の尺度の1つは、smallest sum probability(P(N))であり、それは2つのヌクレオチド配列またはアミノ酸配列間のマッチが偶然に起こる確率を示すものである。例えば、ある配列は、その第1の配列と第2の配列を比較して、もしもそのsmallest sum probabilityが約1未満、好ましくは約0.1未満、より好ましくは約0.01未満、最も好ましくは約0.001未満であれば、別のもう1つの配列と類似であるとみなされる。

40

【0035】

本発明のポリペプチドの成功を収めたデザインは、例えば、適切な宿主細胞中で発現させたとき、該ポリペプチドが自己タンパク質と十分に類似したコンフォメーションをとり、天然の自己タンパク質と交差反応する抗体を生成することを証明することで確かめられる。このことは免疫学的技法、例えばELISAでのモノクローナルまたはポリクローナル抗体の結合、または円偏光二色性などの物理化学的方法、またはX線結晶解析などの結晶学的技法、またはコンピュータモデリング、または当業者にはよく知られた多数のその他のアプローチを用いて示すことができる。

【0036】

さらに、成功を収めたデザインの確認は、その結果得られたポリペプチドを適切なワクチ

50

ン接種計画にて自己に投与し、該タンパク質と結合することのできる抗体が誘導されることを観察することによって、行うことができる。このような結合はELISA技法により組換えまたは精製天然タンパク質を用いて、または感受性のある細胞または組織でのそのタンパク質の影響を調べるバイオアッセイによって評価することができる。特に好ましい評価法は、インタクトな宿主中でのそのタンパク質の活性と原因的に関連する現象を観察すること、また、本発明の方法によって誘導される抗体の存在がその現象をモジュレートするかを調べることである。こうして、本発明のタンパク質は、天然のタンパク質が由来したもとの動物中の体内で、天然の抗原に対する抗体を生じさせることができるであろう。

【0037】

本発明のポリペプチドはさらに、所望の性質を付加するため(例えば、精製を容易にするか、または免疫原性を増大させる配列タグを付加するなど)、あるいは望ましくない性質(例えば、レセプターでの望ましくないアゴニスト活性など)または膜貫通ドメインを除去するために、変異、例えばアミノ酸の置換、挿入もしくは欠失によって修飾することができる。特に、本発明は、ポリヒスチジンタグなどの精製を容易にする融合パートナー、または発現を増強させるGST発現パートナーを特定の意図している。

10

【0038】

好ましい実施形態においては、マウスIL-13に特徴的な下記の変異の1以上またはその保存的置換を有するヒトIL-13を提供する。下記の番号付けは、IL-13がそのシグナル配列とともに大腸菌中で発現されたIL-13に基づくものである。

R	K	30位
V	S	37位
Y	F	63位
A	V	65位
E	D	68位
E	Y	80位
K	R	81位
M	I	85位
G	H	87位
Q	H	113位
V	I	115位
D	K	117位

20

30

【0039】

より好ましくは、ヒトIL-13は少なくとも2カ所、好ましくは3、4、5、6、もしくはそれ以上のカ所の変異、またはそれらの保存的置換を含んでなる。12カ所の変異が全て存在することが好ましい。

【0040】

「保存的置換」とは、あるアミノ酸がそれと類似の性質を有する別のアミノ酸と置換されても、ペプチド化学の当業者であれば予期しうるような、そのペプチドの二次構造およびヒドロパシク(hydrophobic)な性質が実質的に変化しないようなものである。

【0041】

例えば、特定のアミノ酸は、抗体の抗原結合領域または基質分子の結合部位などの構造との相互作用的結合能の認めうる低下を伴うことなく、タンパク質構造中の別のアミノ酸と置換することができる。あるタンパク質の生物学的機能活性を定めるものはそのタンパク質の相互作用的能力および性質であるので、あるタンパク質の配列中(もちろん、そのタンパク質のもとなつたDNAコード配列中)で特定のアミノ酸配列の置換を行うことができ、それを行っても同様の性質をもつタンパク質を得ることができる。従って、開示した組成物のペプチド配列、またはそのペプチドをコードする対応DNA配列中に、それらの組成物の生物学的有用性または活性の認めうる低下を伴うことなく、種々の変化を導入することができる。

40

【0042】

50

そのような変化を起こさせるには、アミノ酸のハイドロパシク・インデックスを考慮しなければならない。タンパク質に相互作用的生物学的機能を与えることにおいてアミノ酸のハイドロパシク・インデックスが重要であることは、当業界で一般的に理解されている (KyteおよびDoolittle, 1982, これは本明細書中に参考として組み入れる)。アミノ酸の相対的なハイドロパシク特性は、得られるタンパク質の二次構造に寄与し、ひいてはそのタンパク質と他の分子、例えば酵素、基質、レセプター、DNA、抗体、抗原などとの相互作用を規定することとなる。各アミノ酸には、その疎水性および電荷特性に基づいてハイドロパシク・インデックスが指定されている (KyteおよびDoolittle, 1982)。それらの値は次のとおりである：イソロイシン (+ 4.5)；バリン (+ 4.2)；ロイシン (+ 3.8)；フェニルアラニン (+ 2.8)；システイン/シスチン (+ 2.5)；メチオニン (+ 1.9)；アラニン (+ 1.8)；グリシン (- 0.4)；トレオニン (- 0.7)；セリン (- 0.8)；トリプトファン (- 0.9)；チロシン (- 1.3)；プロリン (- 1.6)；ヒスチジン (- 3.2)；グルタミン酸 (- 3.5)；グルタミン (- 3.5)；アスパラギン酸 (- 3.5)；アスパラギン (- 3.5)；リジン (- 3.9)；およびアルギニン (- 4.5)。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 3 】

特定のアミノ酸を、それと類似したハイドロパシク・インデックスまたはスコアを有する他のアミノ酸と置換し、置換を行っても依然として類似の生物活性を有するタンパク質がもたらされること、すなわち依然として生物学的な機能が等価のタンパク質が得られることは、当業界では公知である。そのような変化を起こさせるには、ハイドロパシク・インデックスが ± 2 以内であるようなアミノ酸で置換することが好ましく、 ± 1 以内が特に好ましく、 ± 0.5 以内のものはさらに好ましい。類似のアミノ酸による置換は親水性に基づいて効果的に行いすることも当業界では公知である。米国特許第 4,554,101号 (その全体を本明細書中に参考として組み入れる) は、タンパク質の最大の局所的平均親水性 (それは隣接するアミノ酸の親水性によって支配される) がそのタンパク質の生物学的性質と相関することを述べている。

【 0 0 4 4 】

米国特許第 4,554,101号に詳細に述べられているように、アミノ酸残基には次のような親水性値が割り当てられている：アルギニン (+ 3.0)；リジン (+ 3.0)；アスパラギン酸 (+ 3.0 \pm 1)；グルタミン酸 (+ 3.0 \pm 1)；セリン (+ 0.3)；アスパラギン (+ 0.2)；グルタミン (+ 0.2)；グリシン (0)；トレオニン (- 0.4)；プロリン (- 0.5 \pm 1)；アラニン (- 0.5)；ヒスチジン (- 0.5)；システイン (- 1.0)；メチオニン (- 1.3)；バリン (- 1.5)；ロイシン (- 1.8)；イソロイシン (- 1.8)；チロシン (- 2.3)；フェニルアラニン (- 2.5)；トリプトファン (- 3.4)。あるアミノ酸を類似の親水性値を有する別のアミノ酸と置換し、置換を行っても依然として生物学的に等価な、特に免疫学的に等価なタンパク質が得られることは、理解されている。そのような変化を起こさせるに際しては、親水性値が ± 2 以内であるようなアミノ酸で置換することが好ましく、 ± 1 以内が特に好ましく、 ± 0.5 以内のものはさらに好ましい。

【 0 0 4 5 】

上述したとおり、アミノ酸の置換は、通常はアミノ酸の側鎖置換基の相対的な類似性、例えば、疎水性、親水性、電荷、大きさなどに基づくものである。これらの種々の特性を考慮に入れた置換の代表的なものは当業者によく知られており、そのようなものとしては：アルギニンとリジン；グルタミン酸とアスパラギン酸；セリンとトレオニン；グルタミンとアスパラギン；ならびにバリン、ロイシン、およびイソロイシンの間の置換が含まれる。これらは好ましい保存的置換である。

【 0 0 4 6 】

アミノ酸の置換はさらに、残基の極性、電荷、溶解性、疎水性、親水性、および/または両親媒性の類似性に基づいて行うことができる。例としては、負に荷電したアミノ酸としてはアスパラギン酸およびグルタミン酸が含まれ；正に荷電したアミノ酸としてはリジンおよびアルギニンが含まれ；荷電されていない極性ヘッド基を有し類似の親水性値を持つアミノ酸としてはロイシン、イソロイシン、およびバリン；グリシンとアラニン；アスパ

ラギンとグルタミン；ならびに、セリン、トレオニン、フェニルアラニン、およびチロシンが挙げられる。保存的变化を示すことのできるアミノ酸の他のグループとしては：(1) ala、pro、gly、glu、asp、gln、asn、ser、thr；(2) cys、ser、tyr、thr；(3) val、ile、leu、met、ala、phe；(4) lys、arg、his；および(5) phe、tyr、trp、hisが含まれる。

【0047】

好ましい実施形態においては、本発明の変異させたIL-13は下記の配列の1以上または保存的置換を含むそれらの改変体を含んでなる：

L K E L I E E L S N； (配列番号1)

F C V A L D S L； (配列番号2)

A I Y R T Q R I L H G； (配列番号3)

K I E V A H F I T K L L； (配列番号4)

10

【0048】

本発明のポリペプチドは本発明のポリヌクレオチドによってコードされる。当業者であれば遺伝暗号を適用することによって該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの配列を容易に決定することができよう。ひとたび必要な核酸配列が決定されれば、所望の配列を有するポリヌクレオチドを実施例に記載のとおり産生させることができる。当業者であれば、必要なパラメーター、例えばプライマーおよびPCR条件など、どのようなものについても、容易に適合させることができよう。また、当業者であれば遺伝暗号の縮重により、本発明の1つのタンパク質をコードするポリヌクレオチドが2以上可能であることは理解されよう。

20

【0049】

本発明のポリヌクレオチドは典型的にはRNA、例えばmRNA、またはDNA、例えばゲノムDNA、cDNA、もしくは合成DNAである。好ましくは、そのポリヌクレオチドはDNAである。特に好ましくは、それはcDNAである。

【0050】

本発明はさらに発現ベクターを提供し、それは核酸構築物であり、本発明のポリヌクレオチドを含んでなるものである。さらに、該核酸構築物は、適切なイニシエーター、プロモーター、エンハンサー、およびその他のエレメント、例えばポリアデニル化シグナルなどを含んでなり、それらは、哺乳動物細胞中でのタンパク質の発現を可能とするために必要であり、正しい方向で位置づけられている。

30

【0051】

プロモーターは真核生物のプロモーター、例えばCD68プロモーター、Gal1、Gal10、もしくはNMT1プロモーター、原核生物のプロモーター、例えば、Tac、Trc、もしくはLac、またはウイルスのプロモーター、例えば、サイトメガロウイルスプロモーター、SV40プロモーター、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーター、もしくはRSウイルスLTRプロモーターとすることができる。好ましくは該プロモーターはウイルスのプロモーターである。特に好ましいのは、該プロモーターがサイトメガロウイルスの前初期プロモーターで、任意にHCMV IE遺伝子由来のエキソン1を含んでなるものである。

【0052】

転写調節エレメントは、エンハンサー、例えばB型肝炎ウイルス表面抗原3'非翻訳領域、CMVエンハンサー；イントロン、例えばCD68イントロン、もしくはCMVイントロンA、または調節領域、例えばCMV 5'非翻訳領域を含んでなるものである。

40

【0053】

該ポリヌクレオチドは好ましくは、核酸構築物中でプロモーターと機能しうる形で連結させて、該構築物を哺乳動物細胞中に挿入した場合には、該ポリヌクレオチドが発現されてコードされるポリペプチドを産生するようにする。核酸構築物の骨格はRNAでもDNAでもよく、例えばプラスミドDNA、ウイルスDNA、細菌性DNA、細菌性人工染色体DNA、酵母人工染色体DNA、合成DNAとすることができる。また、核酸構築物を人工的な核酸、例えばホスホリチオエートDNAまたはRNAとすることもできる。好ましくは、該構築物はDNAである。特

50

に好ましくは、それはプラスミドDNAである。

【0054】

本発明はさらに、本発明の発現ベクターを含んでなる宿主細胞を提供する。そのような細胞としては、一過性の、または安定した高等真核細胞系、例えば哺乳動物細胞または、例えばバキュロウイルス発現系を用いる昆虫細胞、酵母などの下等真核細胞、または細菌細胞などの原核細胞が含まれる。本発明に従ってポリペプチドをコードするベクターを挿入することによって改変することのできる細胞の例としてはとりわけ、哺乳動物のHEK293T、CHO、HeLa、NSO、COS細胞が含まれる。好ましくは、選択された細胞系は安定であるのみならず、ポリペプチドの成熟したグリコシル化が可能なものである。発現は形質転換させた卵母細胞で行うことができる。本発明のポリペプチドはヒト以外のトランスジェニック動物、好ましくはマウスの細胞中で発現させることができ、または、より大きな哺乳動物、例えばヤギ、ヒツジ、およびウシの乳汁中に発現させることができる。本発明のポリペプチドを発現しているヒト以外のトランスジェニック動物は本発明の範囲内に含まれるものである。本発明のポリペプチドはまた、アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の卵母細胞中で発現させることができる。

10

【0055】

本発明はまた、医薬組成物またはワクチン組成物をも含み、それは、治療上有効な量の本発明の核酸構築物またはポリペプチドを、任意で製薬上許容される担体と組み合わせて、好ましくはリン酸緩衝溶液 (PBS)、生理食塩水、デキストロース、水、グリセロール、エタノール、リポソーム、またはそれらの組合せなどの製薬上許容される賦形剤と組み合わせて、含んでなるものである。ワクチン組成物は、金属ビーズ、好ましくは金ビーズ上に製剤化された、治療上有効な量の本発明の核酸構築物を含んでいてもよい。本発明のワクチン組成物はまた、例えば一実施形態において、イミキモド (imiquimod)、ツカレゾル (tucarezol)、もしくはミョウバンなどのアジュバントを含んでいてもよい。

20

【0056】

タンパク質とアジュバントとを一緒に用いると、高力価の抗体応答が誘導されるので好ましい。

【0057】

好ましくは、アジュバントは本発明のものと同時に投与され、好ましい実施形態においては一緒に製剤化される。本発明で考えられているアジュバント剤としては、それらが全てではなく他のアジュバント剤を排除するものではないが、イミキモド [S-26308, R-837] などの合成イミダゾキノリン類 (Harrisonら, 「イミキモド単独または糖タンパク質ワクチンと組み合わせたものを用いた再発性HSV疾患の低減」 "Reduction of recurrent HSV disease using imiquimod alone or combined with a glycoprotein vaccine", *Vaccine* 19: 1820-1826, (2001)); およびレシキモド (resiquimod) [S-28463, R-848] (Vasilakosら, 「免疫応答改変剤R-848のアジュバント活性: CpG ODNとの比較」 "Adjuvant activities of immune response modifier R-848: Comparison with CpG ODN", *Cellular Immunology* 204: 64-74 (2000)), カルボニルおよびアミンの Schiff 塩基で、抗原提示細胞上およびT細胞表面で構成的に発現されるもの、例えばツカレゾル (Rhodes, J.ら, 「共刺激性 Schiff 塩基形成性薬物による免疫系の治療的増強」 "Therapeutic potentiation of the immune system by costimulatory Schiff-base-forming drugs", *Nature* 377:71-75 (1995)), サイトカイン、ケモカインおよび共刺激分子、Th1インデューサー (例えば、インターフェロン、IL-2、IL-12、IL-15、およびIL-18)、Th2インデューサー (例えば、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、およびIL-13)、ならびにその他のケモカインおよび共刺激遺伝子 (例えば、MCP-1、MIP-1、MIP-1、RANTES、TCA-3、CD80、CD86、およびCD40L)、その他の免疫刺激性のターゲティングリガンド (例えば、CTLA-4およびL-セレクチン)、アポトーシス刺激性タンパク質およびペプチド (例えば、Fas、(49))、合成脂質ベースのアジュバント、例えば、バクスフェクチン (vaxfectin) (Reyesら, 「Vaxfectinは抗原特異的抗体価を高め、プラスミドDNAでの免疫感作に対してTh1タイプの免疫応答を維持する」 "Vaxfectin enhances antigen specific antibody titres and maintains Th1 type immune res

30

40

50

ponses to plasmid DNA immunization", Vaccine 19:3778-3786)、スクアレン、 α -トコフェロール、ポリソルベート80、DOPCおよびコレステロール、エンドトキシン、[LPS]、(Beutler, B., 「エンドトキシン: Toll様レセプター4、および先天性免疫の求心性肢」 "Endotoxin, "Toll-like receptor 4, and the afferent limb of innate immunity", Current Opinion in Microbiology 3:23-30(2000)); CpGオリゴ-およびジ-ヌクレオチド、Sato, Y.ら, 「効果的な皮内免疫感作に必要な免疫刺激性DNA配列」 "Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal immunization" Science 273(5273): 352-354(1996), Hemmi, Hら, 「Toll様レセプターは細菌のDNAを認識する」 "A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA", Nature 408: 740-745 (2000)、ならびにTollレセプターの引き金を引いてTh1誘導サイトカイン、例えば合成マイコバクテリアリポタンパク質、マイコバクテリアタンパク質p19、ペプチドグリカン、テイコ酸、およびリピドAなどを産生させるその他のリガンドとなりうるものが含まれる。

10

20

30

40

50

【0058】

Th1タイプの応答を主に引き出す特定の好ましいアジュバントとしては、例えば、モノホスホリルリピドA、または好ましくは3-de-O-アシル化モノホスホリルリピドAなどのリピドA誘導体が含まれる。MPL(登録商標)アジュバントはCorixa Corporationから入手できる(Seattle, WA; 例えば米国特許第4,436,727号、第4,877,611号、第4,866,034号、および第4,912,094号を参照)。CpG含有オリゴヌクレオチド(その中ではCpGジヌクレオチドはメチル化されていない)も主としてTh1応答を誘導する。そのようなオリゴヌクレオチドはよく知られており、例えば、WO 96/02555、WO 99/33488、ならびに米国特許第6,008,200号および第5,856,462号に述べられている。免疫刺激性のDNA配列についても、例えば、Satoら, Science 273:352, (1996)によって報告されている。別の好ましいアジュバントとしては、Quil A、もしくはQS21やQS7を含むQuil A誘導体(Aquila Biopharmaceuticals Inc., Framingham, MA); Escin; ジギトニン; またはGypsophilaもしくはChenopodium quinoaのサポニンが含まれる。

【0059】

本発明はまた、IL-13が媒介する疾患、それに伴う何らかの症状もしくは疾患を治療もしくは防止する方法をも提供し、その方法は本発明のタンパク質、ポリヌクレオチド、ベクター、もしくは医薬組成物の有効量を投与することを含んでなるものである。医薬組成物の投与は1以上の個々の投与形態、例えば、「初回-ブースト」治療ワクチン接種法の形態を取ることができる。ある場合には「初回」ワクチン接種は、好ましくはプラスミド由来のベクター中に組み入れた形の、本発明のポリヌクレオチドの粒子媒介DNA送達を介して行われ、「ブースト」は同じポリヌクレオチド配列を含む組換えウイルスベクターの投与によるか、または該タンパク質をアジュバント中に入れたものを用いてブーストする。逆に、プライミングを上述のウイルスベクターまたはタンパク質製剤、典型的にはアジュバント中に製剤化されたタンパク質を用いて行い、ブーストには本発明のDNAワクチンを用いることができる。

【0060】

自己抗原(例えばIL-13)が媒介する疾患の治療のためには、アジュバントがTh1応答のインデューサーであることが好ましい。とりわけ、アジュバントは免疫刺激性CpGオリゴヌクレオチド、例えばWO 96/02555に開示されているものを含むものである。典型的な免疫刺激性オリゴヌクレオチドはその長さが8~100塩基のもので、一般式 X_1CpGX_2 (式中、 X_1 および X_2 はヌクレオチド塩基、CおよびGはメチル化していないものである)で表されるものである。

【0061】

本発明のアジュバントまたはワクチンに用いるのに好適なオリゴヌクレオチドは、好ましくは3個以上、より好ましくは6個以上のヌクレオチドで分離されている、2個以上のジヌクレオチドCpGモチーフを含むことが好ましい。本発明のオリゴヌクレオチドは典型的にはデオキシヌクレオチドである。好ましい実施形態においては、該オリゴヌクレオチドのヌクレオチド間結合はホスホロジチオエート、より好ましくはホスホロチオエート結合で

あるが、混合ヌクレオチド間結合を有するオリゴヌクレオチド（例えば、混合ホスホロチオエート/ホスホジエステル）を含めて、ホスホジエステルおよび他のヌクレオチド間結合も本発明の範囲内に含まれるものである。オリゴヌクレオチドを安定化させる他のヌクレオチド間結合を用いることもできる。ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドまたはホスホロジチオエートを調製する方法は、米国特許第5,666,153号、第5,278,302号、およびWO 95/26204に記載されている。

【0062】

好ましいオリゴヌクレオチドの例は下記の配列を有している。それらの配列は好ましくはホスホロチオエートで改変されたヌクレオチド間結合を含んでいる。

オリゴ1: TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT (CpG 1826) (配列番号5)

オリゴ2: TCT CCC AGC GTG CGC CAT (CpG 1758) (配列番号6)

オリゴ3: ACC GAT GAC GTC GCC GGT GAC GGC ACC ACG (配列番号7)

オリゴ4: TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT (CpG 2006) (配列番号8)

オリゴ5: TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT (CpG 1668) (配列番号9)

10

【0063】

別のCpGオリゴヌクレオチドは上述の好ましい配列を含んでなり、それらは大きな意味のない欠失または付加を有する。本発明で用いられるCpGオリゴヌクレオチドは当業界で公知の方法（例えばEP 468520）で合成することができる。都合のよいことに、そのようなオリゴヌクレオチドは自動合成機を用いて合成することができる。CpGオリゴヌクレオチドを含むアジュバント製剤は、Qiagenから「ImmunEasy」という商標名で購入することができる。

20

【0064】

本発明の組成物は予防と治療の双方に用いることができる。本発明は医薬品に使用するための本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドを提供する。本発明はさらに、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドの、アレルギー、喘息およびCOPDなどの呼吸器疾患、蠕虫感染関連疾患、肝臓の線維症または肝硬変の治療のための医薬の製造における使用を提供する。

【0065】

本発明はまた、ワクチン接種の方法をも提供し、その方法は本発明のワクチン組成物の有効量を患者に投与し、そのワクチン組成物に対する免疫応答を引き出すことを含んでなる。

30

【0066】

本発明はまた、アレルギー、呼吸器疾患、蠕虫感染関連疾患、肝臓の線維症または肝硬変などのIL-13が媒介する疾患に対する哺乳動物のワクチン接種に用いるための本明細書に記載のワクチン組成物を提供する。呼吸器疾患としては、例えば、アレルギー性喘息などの喘息、および慢性閉塞性肺疾患(COPD)が含まれる。特に、IL-13に対する中和応答を誘導しうるワクチン組成物は、ヒトでの喘息、特にアレルギー性喘息の治療のための有用な治療薬となるであろう。本発明のワクチン組成物はまた、蠕虫感染関連疾患(Brombacher, 2000 Bioessays 22:646-656)、およびIL-13産生が線維症に関連している疾患(Chiaramontera, 1999, J Clin Inv 104:777-785)、例えば慢性閉塞性肺疾患(COPD)および肝硬変の

40

【0067】

本発明のワクチン組成物は種々の方法、例えば口腔および鼻腔などの粘膜経路；肺、筋肉内、皮下、または皮内の経路を経由して投与することができる。抗原がタンパク質をベースとしたワクチンとして投与される場合には、そのワクチンは典型的にはアジュバントを用いて製剤化され、凍結乾燥したものを使用前に注射用水に再懸濁して用いることができる。そのような組成物は注射用組成物として、例えば無菌の水性分散液、好ましくは等張液として、投与することができる。典型的にはそのような組成物は筋肉内投与されるが、その他の投与経路も可能である。

【0068】

50

皮内投与の方法としては、粒子射撃法 (particle bombardment) (これはまた「遺伝子銃」としても知られており、それは米国特許第5,371,015号に記載されている)がある。タンパク質は糖を用いて製剤化して小粒子となし、または、該抗原をコードするDNAを不活性な粒子 (例えば金ビーズ) 上にコーティングして、レシピエントの表面 (例えば皮膚) からそれらを、例えば射出器具から高圧下で放出させるなどによって、突入させるために十分なスピードに加速する。(本発明の核酸ワクチン構築物でコーティングした粒子およびタンパク質糖粒子は本発明の範囲内に含まれ、そのような粒子をロードした器具も同様に含まれる。)核酸構築物、または該構築物を含有する組成物を直接的にレシピエントに投与する他の方法としては、超音波、電氣的刺激、電気穿孔法、および米国特許第5,697,901号に記載されているマイクロシーディング (microseeding) が含まれる。

10

【0069】

本発明の核酸構築物はまた、遺伝子治療で有用な特別な送達ベクターで投与することができる。遺伝子治療のアプローチは例えば、Vermeiren, Nature 1997, 389:239-242に述べられている。ウイルス系および非ウイルス系の双方を用いることができる。ウイルスをベースとした系としては、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、およびワクチニアウイルスをベースとした系が含まれる。ウイルス以外のものをベースとした系としては、核酸の直接投与及びリポソームをベースとした系が含まれる。例えば、ベクターはリポソームで被包するか、またはポリラクチドコ-グリコリド (PLG) 粒子内に入れることができる。

【0070】

本発明の核酸構築物はまた、形質転換した宿主細胞によって投与することもできる。そのような細胞としては、被験者から採取した細胞が含まれる。核酸ワクチン構築物はそのような細胞中に *in vitro* で導入することができ、その形質転換細胞はその後に被験者に戻すことができる。本発明の核酸構築物は細胞中に既に存在している核酸中に相同組換えによって組み込むことができる。所望により形質転換細胞を *in vitro* で増殖させて、その結果得られた細胞の1つ以上を本発明に用いることができる。細胞を患者の適切な部位に、公知の外科的技法または微小外科的技法 (例えば、グラフィング、マイクロインジェクション、その他) によって供給することができる。適切な細胞としては、樹状細胞が含まれる。

20

【0071】

送達されるワクチン組成物の量は、免疫しようとする哺乳動物の種および体重、治療/防護しようとする病状の性質、適用するワクチン接種プロトコル (すなわち、単回投与対反復投与)、投与経路、選択したアジュバント化合物の効力および用量の如何によって大きく変わる。これらの変動要因に基づいて、医師または獣医師は適切な投与量のレベルを容易に決定することができるが、例えばそのワクチンが核酸の場合には、投与量は0.5~5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の核酸構築物またはそれを含む組成物となる。特に、投与量は投与経路の如何によって変わる。例えば、金ビーズの皮内投与を用いる場合には、総投与量は好ましくは1 μg ~ 10ng、特に好ましくは総投与量は10 μg ~ 1ngの間である。核酸構築物が直接投与される場合には、総投与量は通常はより多くなり、例えば、50 μg ~ 1mg以上の間の量となる。上述の投与量は平均的な症例の代表的な値を示している。

30

【0072】

タンパク質ワクチンでは、各ワクチン投与でのタンパク質の量は、典型的なワクチン接種者に顕著な副作用を起こすことなく免疫防御応答を誘導する量として選択される。そのような量は、どの特定の免疫原が用いられるか、それがどのように提示されるかによって変わる。通常は、各投与は1~1000 μg のタンパク質を含んでなり、好ましくは1~500 μg 、より好ましくは1~100 μg 、最も好ましくは1~50 μg である。ある特定のワクチンについての最適な量は、ワクチン接種者における適切な免疫応答の観察を含む標準的な研究によって確かめることができる。初回のワクチン接種後に、被験者は適切な期間をおいて1または数回のブースター免疫を受けることができる。そのようなワクチン製剤は初回または追加ワクチン接種計画のいずれに適用してもよく ; 例えば経皮、皮下、もしくは筋肉内経

40

50

路で全身的に投与したり、また、例えば鼻腔内もしくは口腔経路で粘膜表面に適用することができる。

【0073】

もちろん、被験者それぞれによっては、より高いまたは低い投与量の範囲とすることが有利である場合もありうるが、そのようなものも本発明の範囲内に含まれる。

【0074】

ワクチン組成物は1回限りの投与とすることができ、または反復して、例えば、1~7回、好ましくは1~4回、約1日から約18ヶ月、好ましくは1ヶ月の間隔をあけて投与することができる。その後、任意で1~12ヶ月間の定期的な間隔をあけて、最も長くはその患者の生涯にわたって投与することができる。一実施形態においては、患者は初回-ブースト接種計画で異なる形態の抗原の投与を受けるだろう。従って例えば、ある抗原が最初はDNAをベースとしたワクチンとして投与され、次いでタンパク質-アジュバントをベースとした製剤として投与される。しかし、再度言及するが、この治療計画は投与される動物の大きさおよび動物種、投与される核酸ワクチンおよび/またはタンパク質組成物の量、投与経路、用いたアジュバント化合物の効力と用量、ならびにその他の精通した獣医師または医師であれば明白な要因の如何によって大きく変わる。

10

【0075】

下記の実施例は本発明の理論をヒトではなくマウスで説明するものであるので、タンパク質はヒトタンパク質に特徴的な変異を有するマウスのものであるが、そのタンパク質がマウスに特徴的な変異を有するヒト由来のB細胞エピトープを有するもの、またはその他の類似のタンパク質であれば、その結果はヒトへの治療に容易に外挿することができる。

20

【0076】

下記の実施例を通じて、分子生物学および細胞生物学の分野で広く知られていて実施されている種々の技法が用いられている。それらの実際的な面での詳細は多数の教科書中に見出すことができるが、そのようなものとしてはSambrookら(1989, 第2版 Cold Spring Harbor Press: New York)のものが含まれる。アミノ酸の配列または名称は一文字表記または三文字表記のいずれかで示される。用語の前に付けられた「h」はタンパク質または遺伝子がヒト由来であることを示し、「m」はマウス由来、「c」はキメラ構築物、「r」は組換えタンパク質であることを示すために用いられる。

【実施例】

30

【0077】

実施例1：マウスIL-13に対するワクチンのデザイン

IL-13は、SCOP(Murzinら, 1995, J. Mol. Biol. 247:536-540)により規定された4-ヘリカルサイトカインフォールドファミリーに属している。このフォールドスーパーファミリーの個々のメンバーは構造的に関連しているが、配列レベルではアラインメント(整列)させることが困難である。IL-13の3D構造はまだ決定されていないが、他のいくつかの4-ヘリカルサイトカインについては構造が描かれている。IL-13オルソログについてタンパク質多重配列アラインメントを作成し、また、少なくとも1つのメンバーの構造が決定されていた、この折りたたみ(フォールド)を示す他のいくつかのサイトカイン(IL-4、GM-CSF、IL-5、およびIL-2)についてもアラインメントを作成した。IL-13タンパク質多重配列アラインメントについてDSC(KingおよびSternberg, 1996, Prot. Sci. 5:2298-2310)、SIMPA96(Levin, 1997, Prot. Eng. 7:771-776)およびPred2ary(ChandoniaおよびKarplus, 1995, Prot. Sci. 4:275-285)を用いて二次構造予測を行った。個々のサイトカインのタンパク質多重配列アラインメントを、配列情報と(既知の結晶構造および二次構造予測から得られた)構造情報の双方を用いて、互いにアラインメントさせた。

40

【0078】

抗原性部位、特にB細胞エピトープは、マウスIL-13についてCameleonソフトウェア(Oxford Molecular)を用いて予測し、それらを、タンパク質多重配列アラインメントを用いてIL-4構造(Brookhavenデータベースでの登録番号1RCB)上にマップして、抗原性部位が構造的にIL-13のどこに位置しているのか調べた。この分析から、抗原性を有している可能性が

50

あり、かつレセプターの結合に関与している可能性のある露出領域が選択された。

【0079】

このモデルからキメラIL-13配列をデザインしたが、ここでは推定上の抗原性ループの配列をマウスIL-13から取得し、推定上の構造領域(主としてヘリカル領域)の配列をヒトIL-13から取得した。このデザインの目的は、中和抗体を生じさせるマウスIL-13由来の標的エピトープを同定し、それらのエピトープを、天然のタンパク質と構造上類似しているが、1個以上のCD4 Tヘルパーエピトープが確実に存在することとなるように天然の(マウス)タンパク質とは十分な配列変異を有しているフレームワーク上に提示することであった。本実施例のキメラIL-13ワクチンのために選択された核酸及びタンパク質の配列を図1に示す(配列番号19および20)。下線を付した配列はヒトのオルソログに見出される配列に対応している。図1に示す配列とするために12個のアミノ酸を置換した。遺伝暗号の縮重により、全く同一のタンパク質をコードしうる多数の核酸配列が可能であることを理解すべきである。さらに、本発明の範囲内で、非露出領域中に他のオルソログな変異を有するような、キメラIL-13ワクチンの別のデザインもありうることを理解されよう。

10

【0080】

1.2 キメラIL-13の調製

キメラIL-13(cIL-13)DNA配列は、部分的にオーバーラップしている一連のDNAオリゴヌクレオチドから合成した。これらの配列cIL-13-1からcIL-13-6を表1に示してある。それらのオリゴヌクレオチドをアニーリングし、PCRにより94 で1分、続いて94 で30秒、55 で1分、および72 で2分のサイクルを25回行ってcIL-13 DNAを生成した。その後72 で7分間処理し、その終了時には4 まで冷却した。反応産物は予期された361塩基対の大きさのバンドであり、これをT/AクローニングベクターpCR2.1 (Invitrogen, Groningen, Netherlands)中にサブクローン化してpCR2,1-cIL-13を作成した。pCR2,1-cIL-13をBamH1およびXho1で消化して得たcIL-13フラグメントをpGEX4T3 (Amersham Pharmacia, Amersham, Bucks, UK)中のBamH1とXho1部位中にサブクローン化してpGEX4T3-cIL-13/1を作成した。pGEX4T3-cIL-13/1構築物の塩基配列を決定した際に、GSTとcIL-13の配列間に39塩基対の余分なDNA配列(pCR2.1ベクター由来のもの)が存在することを見出した。これを修正するために、pGEX4T3-cIL-13/1とプライマーcIL-13FnewおよびcIL-13Rを用いてcIL-13についてのPCRを繰り返した。得られたPCR産物をpGEX4T3中にBamH1とXho1制限酵素部位を用いて再びクローン化して、発現ベクターpGEX4T3-cIL-13を作成した。この構築物の配列はジデオキシターミネーターシーケンシングで確かめた。このベクターはグルタチオン-S-トランスフェラーゼとcIL-13からなる遺伝的融合タンパク質(GST-cIL-13)をコードしている。このタンパク質の2つの部分は短いスペーサーで連結されており、そのスペーサーにはトロンビンの認識部位が含まれている。この融合タンパク質はグルタチオンセファロースアフィニティークロマトグラフィーで容易に精製することができ、その後直接的に用いるか、またはトロンピンで切断して作成した遊離のcIL-13の調製物を用いることができる。

20

30

【表1】

表 1. キメラ IL-13 を構築するために用いたオリゴヌクレオチド.

オリゴ	配列 (5'-3')
cIL-13-1R (配列番号 10)	TGTGATGTTGACCAGCTCCTCAATGAGCTCCCTAAGGG TCAGAGGGAGAGACACAGATCTTGGCACCGGCC
cIL-13-2F (配列番号 11)	AGGAGCTGGTCAACATCACACAAGACCAGACTCCCCT GTGCAACGGCAGCATGGTATGGAGTGTGGACCTGGC
cIL-13-3R (配列番号 12)	GCAATTGGAGATGTTGGTCAGGGATTCCAGGGCTGCA CAGTACCCGCCAGCGGCCAGGTCCACACTCCATAC
cIL-13-4F (配列番号 13)	TGACCAACATCTCCAATTGCAATGCCATCGAGAAGACC CAGAGGATGCTGGGCGGACTCTGTAACCGCAAGGC
cIL-13-5R (配列番号 14)	AAACTGGGCCACCTCGATTTTGGTATCGGGGAGGCTG GAGACCGTAGTGGGGGCCCTTGCGGTTACAGAGTCC
cIL-13-6F (配列番号 15)	AAATCGAGGTGGCCCAGTTTGTAAAGGACCTGCTCAG CTACACAAAGCAACTGTTTCGCCACGGCCCCTTC
cIL-13F (配列番号 16)	CGCGGATTCGGGCGGTTGCCAAGATCTG
cIL-13R (配列番号 17)	CTCCGCTCGAGTCGACTTAGAAGGGGCCGTGGCGAAA
cIL-13Fnew (配列番号 18)	CGCGGATCCGGGCGGTTGCCAAGATCTG

10

20

30

【 0 0 8 1 】

pGEX4T3-cIL-13発現ベクターを用いて大腸菌(E.coli)BLR株(Novagen, Cambridge Bioscience, Cambridge, UKから供給されたもの)を形質転換した。GST-cIL-13の発現は、対数増殖期に0.5mMのIPTGを培養物に添加して37℃で4時間おくことによって誘導した。次いでその大腸菌を遠心して回収し、それからGST-cIL-13を、類似のGST-ヒトIL-13融合タンパク質の精製法として既に報告されている方法(McKenzieら, 1993, Proc. Natn. Acad. Sci. 90:3735-3739)で精製した。

40

【 0 0 8 2 】

cIL-13の特性決定

精製したGST-cIL-13のサンプルをSDS-PAGE電気泳動で分析した。図2は、精製した調製物にGST-cIL-13について予期された大きさのタンパク質が含まれていることを示している。下方のバンドは、融合タンパク質の調製の際に部分的に切断されて生成した少量のGSTを示している。

【 0 0 8 3 】

精製タンパク質がGST-cIL-13であることを確認するために、サンプルをSDS-PAGEで分離し

50

、PVDF膜上にプロットし、ウエスタンブロッティングでIL-13とGSTの免疫反応性の存在を分析した。cIL-13はヒトおよびマウスのIL-13の双方からの配列を含んでいるので、ヒトIL-13またはマウスIL-13に特異的な抗血清によって認識されると予想された。プロットを0.05% Tween 20含有TBS(50mM 塩酸trizma、138mM 塩化ナトリウム、2.7mM 塩化カリウム、pH8.0) (TBST)中の3%ウシ血清アルブミン(BSA)で4 にて1晩ブロックし、一次抗体と共に室温(RT)で1時間振盪しつつインキュベートし、次いでTBSTで4回洗った。二次抗体を添加して室温で1時間振盪した後、4回洗い、SuperSignal化学発光試薬 (Pierce, Rockford, Illinois, USA)により検出した。

【0084】

図3(説明は下記のとおり)は、この分析の結果であり、この精製タンパク質が、ヒトIL-13、マウスIL-13およびGSTに対する抗体により認識されることを示しており、予期していた構造であることが確認された。

【0085】

レーン	サンプル	一次抗体
1	GST-clL-13	抗 mIL-13
2	rhIL-13	抗 mIL-13
3	rmIL-13	抗 mIL-13
4	マーカー	-
5	GST-clL-13	抗 hIL-13
6	rhIL-13	抗 hIL-13
7	rmIL-13	抗 hIL-13
8	マーカー	-
9	GST-clL-13	抗 GST
10	rhIL-13	抗 GST
11	rmIL-13	抗 GST
12	GST	抗 GST

【0086】

この実験で用いた一次抗体は次のとおりであった：抗hIL-13(カタログ番号AF-213-NA, R&D Systems, Abingdon, Oxford, UK)、1 μ g/mLで使用；抗mIL-13(カタログ番号AF-213-NA, R&D Systems)、1 μ g/mLで使用；および抗GST(カタログ番号27-4590D, Pharmacia)、1/200で使用。この実験で用いた二次抗体は次のとおりであった：HRPをコンジュゲートさせた抗ヤギIgG(カタログ番号A-5420, Sigma-Aldrich Company Ltd, Poole, Dorset, UK)、1/40,000で使用。

【0087】

タンパク質サンプルは、GST-clL-13(実施例2に記載のとおり調製したもの)、組換えヒトIL-13(rhIL-13)(カタログ番号CH1-013, Cambridge Bioscience, Cambridge, UK)、組換えマウスIL-13(rmIL-13)(カタログ番号413-ML-025, R&D Systems)、ならびにGST(空のpGEX4 T3ベクターでトランスフェクトされた大腸菌から、報告(Sambrookら, 1989, 第2版, Cold Spring Harbor Press: New York)されているとおりに調製したもの)。

【 0 0 8 8 】

1.3 キメラIL-13のコンフォメーション

GST-cIL-13が溶液中で天然のIL-13と類似したコンフォメーションをとることを確かめるために、GST-cIL-13およびcIL-13(GST-cIL-13からトロンピン切断によって生成したもの)のサンプルをELISAで分析した。96ウエルのMaxisorpプレート(Life Technologies Ltd, Paisley, UK)に、炭酸塩-重炭酸塩バッファー中のcIL-13、GST-cIL-13、mIL-13、hIL-13、またはgstを4 で一晩コーティングした。次いでプレートを3% BSA/TBSTにより室温で1時間ブロックし、TBST中で3回洗い、一次抗体と共に室温で1時間インキュベートした後TBST中で3回洗った。二次抗体を添加して1時間置き、TBST中で3回洗い、次いでo-フェニレンジアミン二塩酸塩ペルオキシダーゼ基質(OPD, Sigma Aldrich)で30分間発現させた。この実験で使用した一次抗体と二次抗体は上述のとおりであった。図4に示すとおり、GST-cIL-13およびcIL-13はヒトIL-13およびマウスIL-13に対する抗体によって特異的に認識された。これらのデータはキメラ化プロセスがこのタンパク質のコンフォメーションを大きく変えることはないことを示している。

10

【 0 0 8 9 】

1.4 キメラIL-13のレセプターへの結合

cIL-13が既知のマウスIL-13レセプター(mIL-13R1またはmIL-13R2)と結合しうるかを調べるためにELISAを行った。96ウエルのMaxisorpプレートに、炭酸塩-重炭酸塩バッファー中の抗ヒトIgG(カタログ番号I-3382, Sigma Aldrich)を4 で一晩コーティングした。次いでプレートを3% BSA/TBSTにより室温で1時間ブロックし、TBST中で3回洗い、mIL-13R1-FcまたはmIL-13R2-Fc(それぞれカタログ番号491-IR-200および539-IR-100, R+D Systems)と共に室温で1時間インキュベートした。洗浄後、プレートをmIL-13またはcIL-13またはGST-cIL-13の希釈物と室温で1時間インキュベートし、再度洗い、ビオチン化抗mIL-13(カタログ番号BAF413, R+D Systems)とインキュベートした。さらに洗い、ストレプトアビジンをコンジュゲートさせた西洋ワサビペルオキシダーゼと共にインキュベートした後、プレートをo-フェニレンジアミン二塩酸塩ペルオキシダーゼ基質により30分間発現させた。図5に示すとおり、cIL-13とGST-cIL-13は双方ともmIL-13レセプターのいずれかと結合することができる。ここでも、これらのデータはキメラ化プロセスがこのタンパク質のコンフォメーションを大きく変えることはないことを示している。

20

【 0 0 9 0 】

1.5 キメラIL-13の生物活性

GST-cIL-13の生物活性は、このタンパク質がヒトの肺線維芽細胞系A549中でSTAT6をリン酸化する能力を調べて評価した。これらの細胞はIL-4およびIL-13の双方に応答性のヒトタイプ2 IL-4レセプターを発現している。これらの細胞をhIL-4、hIL-13、またはmIL-13で刺激すると、シグナル伝達タンパク質STAT6のリン酸化が誘導される。5 x 10⁵個のA549細胞を60mmの組織培養皿(Life Technologies)上のRPMI(Life Technologies)中にまき、70%コンフルエンスとなるまで増殖させた。次いで細胞を2~150ng/mLの間のサイトカイン、または精製cIL-13と共に37 で15分間インキュベートした。融合パートナーとしてのGSTが存在するためにサイトカインの生物活性が変わる可能性があるため、このキメラIL-13はGST-cIL-13融合タンパク質として、およびその融合タンパク質からトロンピン切断により遊離したcIL-13としてもアッセイした。対照として、rmIL-13およびGSTも試験した。次いで、細胞溶解物を調製し、ウサギ抗ホスホSTAT6ポリクローナル抗体(NEB, Hitchin, Herts, UK. カタログ番号9361S)を用いてホスホSTAT6の存在についてウエスタンブロットで分析した。ブロットを5% BSA/TBST中に一晩置いてブロックし(一次抗体がホスホ特異的であるため、BSAはSigma製のA-7906でなければならない、0.1% Tween 20)、一次抗体を1/1000で添加し室温で1時間置き、次いでTBSTで3回洗った。抗ウサギHRPコンジュゲート二次抗体(A-4914, Sigma Aldrich)を1/5000で添加して室温で1時間置き、TBSTで4回洗った後、HRP化学発光基質であるECL試薬(Amersham Pharmacia)で発現させた。この実験の結果を図6に示す。

30

40

【 0 0 9 1 】

50

各レーンには下記のタンパク質をローディングした：

レーン	下記により処理された A549 細胞の溶解物
1	50ng/ml rmIL-13 (R&D Systems)
2	10ng/ml rmIL-13 (R&D Systems)
3	2ng/ml rmIL-13 (R&D Systems)
4	50ng/ml cIL-13
5	10ng/ml cIL-13
6	2ng/ml cIL-13
7	150ng/ml GST-cIL-13
8	30ng/ml GST-cIL-13
9	6ng/ml GST-cIL-13
10	未処理
11	1 μ g/ml GST
12	0.25 μ g/ml GST
13	分子量マーカー

10

20

組換えタンパク質試薬は図 3 に記載したとおりであった。

【 0 0 9 2 】

A549細胞を50または10ng/mL(2ng/mLではない)のrmIL-13で処理するとSTAT6のリン酸化が誘導され、このことは生物活性があることを示している。A549細胞を50ng/mL(10または2ng/mLではない)のcIL-13で処理するとSTAT6のリン酸化が誘導され、このことは生物活性があることを示している。同様にして、150ng/mLのGST-cIL-13(これはモル濃度で言えば50ng/mLのcIL-13とほぼ等価である)は生物活性を有するが、30および6ng/mLでは有しない。従ってcIL-13はこのレセプターのアゴニストであるが、これらの実験条件下ではrmIL-13と比較するとその生物活性は5分の1である。

30

【 0 0 9 3 】

1.6 cIL-13による免疫感作

次いで、Balb/cマウスにおいてマウスIL-13に対する自己抗体の形成を誘導するために、cIL-13とGST-cIL-13を免疫原として用いた。6~8週齢の雌マウスに、フロイント完全アジュバント(CFA)中の約30 μ gのタンパク質を尾の基部に1回皮下注射した。その後同じ部位に3回ブースター免疫を施し、その各回は約10 μ gのタンパク質を不完全フロイントアジュバント(IFA)中に入れたものである。各処置群は5匹のマウスからなり、それらのマウスは表2のプロトコルに従って免疫した。

40

【 表 2 】

群	免疫感作
A	食塩水対照、CFA/IFA 中、皮下
B	30/10 μ g GST、CFA/IFA 中、皮下
C	免疫しなかったナイーブマウス
D	30/10 μ g GST-hIL-13、CFA/IFA 中、皮下
E	30/10 μ g cIL-13、CFA/IFA 中、皮下
F	30/10 μ g GST-cIL-13、CFA/IFA 中、皮下

10

処置日	処置内容
-12	免疫前の採血
0	初回免疫
14	1回目のブースター免疫
27	尾静脈から採血
42	尾静脈から採血
49	2回目のブースター免疫
70	尾静脈から採血
97	尾静脈から採血
99	3回目のブースター免疫
113	尾静脈から採血
140	尾静脈から採血

20

30

【0094】

血清サンプルは表2に示した時点で尾静脈の静脈穿刺によって得た。遠心して澄清化した後、マウスIL-13、ヒトIL-13、およびGSTに対する特異的IgG応答の有無についてサンプルをELISAでアッセイした。A~D群の動物は、抗マウスIL-13抗体をどの時点でも有していなかった。B、D、およびF群の動物は全てGSTに対して強いIgG応答を示した(E群の動物もGSTに対して強い応答を示したが、これはE群の動物を免疫するために用いたcIL-13サンプル中にGSTが残存していたためである)。抗マウスIL-13抗体応答はF群の動物では5匹中5匹に、E群の動物では5匹中4匹に誘導された。図7(aおよびb)は、F群のうちの1匹およびE群のうちの1匹(7b)の血清学的分析結果を示している(それぞれGST-cIL-13で免疫、およびcIL-13で免疫)。これらの結果は、GST-cIL-13またはcIL-13で免疫するとmIL-13に対する免疫寛容を壊し、マウス抗mIL-13抗体を生じることを示している。

40

【0095】

強い抗mIL-13 IgG応答を示した2匹のマウス(F1d70およびF5d97)から得た血清について、A549/ホスホSTAT6アッセイでrmIL-13の生物活性を中和する能力があるかを試験した。20ng

50

/mLまたは10ng/mLのrmIL-13(R&D Systems)を、無血清のRPMI培地中の1%血清と室温で15分間インキュベートし、その後A549細胞と共に37℃で15分間インキュベートした。細胞溶解物を調製し、ホスホSTAT6の存在を前述のとおりウエスタンブロットで分析した。陰性対照として、GST-hIL-13で免疫したBalb/cマウスから抗hIL-13血清を得て、ELISAで分析したところ、強い抗hIL-13 IgG応答が認められたが、抗mIL-13抗体は認められなかった。陽性対照として正常マウス血清を抗mIL-13中和抗体(R&D Systems, カタログ番号AF-413-NA)でスパイクして最終濃度を1µg/mLとした。

【0096】

この実験の結果は図8に示すが、この実験では次のものを試験した：

レーン	サイトカイン	抗体
1	20 ng/ml rmIL-13	正常マウス血清
2	10 ng/ml rmIL-13	正常マウス血清
3	0 ng/ml rmIL-13	正常マウス血清
4	20 ng/ml rmIL-13	血清サンプル F1d70
5	10 ng/ml rmIL-13	血清サンプル F1d70
6	0 ng/ml rmIL-13	血清サンプル F1d70
7	20 ng/ml rmIL-13	抗 hIL-13 マウス血清
8	10 ng/ml rmIL-13	抗 hIL-13 マウス血清
9	0 ng/ml rmIL-13	抗 hIL-13 マウス血清
10	分子量マーカー	-
11	0 ng/ml rmIL-13	正常マウス血清 + 抗 mIL-13
12	20 ng/ml rmIL-13	血清サンプル F5d97
13	10 ng/ml rmIL-13	血清サンプル F5d97
14	0 ng/ml rmIL-13	血清サンプル F5d97
15	20 ng/ml rmIL-13	正常マウス血清 + 抗 mIL-13
16	10 ng/ml rmIL-13	正常マウス血清 + 抗 mIL-13

【0097】

本発明のキメラIL-13免疫原による免疫感作によってマウスIL-13に対する自己抗体の産生が誘導され、その抗体はマウスIL-13の生物活性を中和することができ(レーン4、5、12、13)、その中和は外因的に添加した抗マウスIL-13抗体でのものに比肩するものである(レーン15、16)。この活性は正常マウス血清中には存在せず(レーン1、2)、またGST-hIL-13で免疫したマウスの血清中にも認められない(レーン7、8)。

【0098】

これらのデータは、IL-13依存性病態のある哺乳動物にcIL-13ワクチンを接種して内因性の中和抗体活性を誘導することにより、該病態の哺乳動物を治療するための基礎を提供するものである。

【0099】

10

20

30

40

50

1.7 代替構築物

1.7.1 6 hisをタグ付けしたcIL-13のデザイン

GST-cIL-13は細菌において産生されたタンパク質であり、不溶性であり、可溶化とin vitroでの再折りたたみを必要とする。サイズ排除クロマトグラフィーの結果は再折りたたみのプロセスでいくつかの異なる折りたたみの形態が生じることを示しており、そのことは免疫応答の一部が天然型のマウスIL-13とは結合しない無関係の抗体を生じる可能性のある形態に向けられた応答であることを示唆している。

【0100】

従って、この候補は最も強力な中和活性のある抗マウスIL-13抗体応答を引き出さないかもしれない。

10

【0101】

このため、6 his-cIL-13を哺乳動物の発現ベクター中にクローン化した。哺乳動物で発現させた6 his-cIL-13は可溶性で、in vitroでの再折りたたみを必要としない。

【0102】

1.7.2 図12(配列番号23および24)は種々の類似の変異を導入したワクチン抗原を示している。タンパク質配列の番号付けは「GPVPR」配列中のグリシン残基を残基1としたスキームに従ったものである。一重下線の配列は改変構造モデルから推定されたヘリカル領域に対応している。二重下線の太字の残基はマウス配列に変異を導入した位置を示している。

【0103】

20

- 11 マウスのLeuをVal(ラット)に変更
- 21 マウスのSerをThr(オルソロガスでないもの)に変更
- 63 マウスのTyrをPhe(オルソロガスでないもの)に変更
- 71 マウスのGlyをAla(イヌ/ブタ/ウシ)に変更
- 100 マウスのSerをThr(イヌ)に変更
- 104 マウスのGlnをAsn(オルソロガスでないもの)に変更
- 108 マウスのHisをArg(オルソロガスでないもの)に変更

【0104】

1.8 ヒトの治療への適用

図9は、ヒトでの抗ヒトIL-13抗体の産生に向けられた、可能性のある本発明に従うワクチン抗原の1つを示している。このものは、過剰または不適切なIL-13を特徴とする疾患(例えば喘息)の治療に有用であろう。マウスIL-13に対応する配列は下線を付している。この構築物はマウスIL-13と類似した12カ所のアミノ酸置換を含んでいる。それらは次のとおりである：

30

R	K	30位
V	S	37位
Y	F	63位
A	V	65位
E	D	68位
E	Y	80位
K	R	81位
M	I	85位
G	H	87位
Q	H	113位
V	I	115位
D	K	117位

40

【0105】

図13(配列番号25)はキメラIL-4をベースとしたヒト用に可能性のあるワクチンである。これはキメラなヒトIL-4ワクチンタンパク質の例である。下線を付したアミノ酸残基はヘリカル構造領域を含んでおり、マウスIL-4由来のもので、アミノ酸21が最初のヘリック

50

ス中に含まれている。下線のないアミノ酸残基はヒトIL-4由来のものである。ヘリカル領域の位置は、Zuegg, J.ら, (2001) Immunol. and Cell Biol. 79:332-339から得られたものである。

【0106】

実施例2: GST-cIL-13に対する免疫応答はマウスIL-13に特異的で、マウスIL-4とは交差反応しない

マウスIL-13はマウスIL-4と構造的に類似しているため、GST-cIL-13で免疫したマウスから得た血清(それは高力価の抗マウスIL-13自己抗体を含むことが既に示されている)を、抗マウスIL-4 ELISAおよびin vitro mIL-4中和バイオアッセイを用いて、マウスIL-4との交差反応性を分析した。

10

【0107】

2.1 抗マウスIL-4 ELISA

96ウエルのMaxisorpプレートに、炭酸塩-重炭酸塩バッファー中の抗マウスIL-4モノクローナル抗体(カタログ番号MAB404, R+D Systems)を4で一晚コーティングした。次いでプレートを3% BSA/TBSTにより室温で1時間ブロックし、TBST中で3回洗い、マウスIL-4(カタログ番号404-ML-005, R+D Systems)と共に室温で1時間インキュベートした。洗浄後、プレートをマウス血清と室温で1時間インキュベートし、再度洗浄し、HRPをコンジュゲートさせた抗マウスIgGポリクローナル抗体(カタログ番号A-9309, SIGMA)とインキュベートした。さらに洗浄した後、プレートをo-フェニレンジアミン二塩酸塩ペルオキシダーゼ基質により30分間発現させた。

20

【0108】

その血清中の抗マウスIL-4抗体のレベルはエンドポイント力価で表した。エンドポイント力価はELISAのバックグラウンドの読み取り値の2倍に等しくなる血清の希釈度と定義される。

【0109】

マウス	抗マウス IL-4 抗体 エンドポイント力価	抗マウス IL-13 抗体 エンドポイント力価
C2 (血清サンプルは125日目、4回のGST-cIL-13ワクチン投与後に採取)	1/900	1/80000

30

【0110】

この血清サンプルでは非常に低いレベルのマウスIL-4交差反応性しか検出されなかった。対照的に、この血清サンプルでは、抗マウスIL-13抗体ELISAを用いて、非常に高い抗マウスIL-13抗体エンドポイント力価が得られていた。このELISAで測定されたマウスIL-4交差反応性のレベルは、in vivoにおいてマウスIL-4中和効果をもつことが期待されるようなレベルではない。この血清サンプルをマウスIL-4中和能についてin vitroマウスIL-4バイオアッセイで調べた。

40

【0111】

2.2 in vitroでのマウスIL-4中和のバイオアッセイ

マウスIL-4はin vitroでCTLL細胞の増殖を刺激する。従って、GST-cIL-13によるワクチン接種を受けたマウスから得た血清のマウスIL-4中和能を評価するためのアッセイ法をこれらの細胞で開発した。

【0112】

マウスCTLL細胞(カタログ番号87031904, ECACC)に対する組換えマウスIL-4の生物活性を

50

中和するマウス血清の能力を測定するために、3ng/mLの組換えマウスIL-4を種々の濃度の血清と共に96ウエルの培養プレート(Invitrogen)において37℃で1時間インキュベートした。このプレインキュベーション後、CTLL細胞を添加した。種々の希釈度の血清、組換えマウスIL-4、およびCTLL細胞を含んでいるアッセイ混合物を、加湿CO₂インキュベーター中にて37℃で70時間インキュベートした。MTT基質(カタログ番号G4000, Promega)を最後の4時間のインキュベーション中に添加し、その後、反応を酸溶液で停止させて、代謝されたブルーホルマザン産物を可溶化した。各ウエル中の溶液の吸光度を96ウエルプレートリーダーで570nmの波長にて測定した。

【0113】

このアッセイでマウスIL-4中和能を測定できるのは、血清の希釈度が1/100に等しいかそれより高いもののみであることに注意されたい。血清の希釈度が1/100より低い場合はCTLL細胞において非特異的増殖効果が誘導される。

10

【0114】

この血清がマウスIL-4の生物活性を中和する能力は、ある定められた量のマウスIL-4の生物活性を50%中和するために必要な(ND₅₀)血清の希釈度として表される。必要とされる血清サンプルが希釈されればされるほど、中和能が強力であることを意味する。

【0115】

試験したマウスC2血清の最高濃度は1/100希釈であった。これは3ng/mLのマウスIL-4の生物活性を50%中和しなかったため、ND₅₀は<1/100希釈であると表される。

【0116】

20

マウス	マウス IL-4 中和能 (ND ₅₀)	マウス IL-13 中和能 (ND ₅₀)
C2 (血清サンプルは 125 日目、4 回の GST-cIL-13 ワクチン投与後に採取)	<1/100	1/5300

【0117】

試験した血清の希釈度では、この血清サンプルにおいてマウスIL-4中和能は検出されなかった。これに対して(マウスIL-13中和能を調べると)、この血清サンプルはマウスIL-13の生物活性を強力に中和した。

30

【0118】

これらのデータは、抗マウスIL-4抗体ELISAでこの血清中に非常に低いレベルのマウスIL-4交差反応性が測定されるとはいえ、それに伴うようなマウスIL-4中和能は見られないことを示している。

【0119】

2.3 マウス血清サンプルのマウスIL-13中和能を評価するための新規マウスIL-13中和バイオアッセイ

40

これまでのGST-cIL-13生物活性およびマウスIL-13中和能のデータは、A549細胞におけるSTAT6リン酸化リードアウトを用いて得たものであった。このアッセイは煩雑で、定量的データを得るにも容易に適応できない。マウスIL-13はin vitroでTF-1細胞の増殖を刺激する。従って、GST-cIL-13ワクチンを接種されたマウスから得た血清のマウスIL-13中和能を評価するためのアッセイ法をこれらの細胞で開発した。

【0120】

2.4 in vitroでのマウスIL-13中和バイオアッセイ

ヒトTF-1細胞(所内で入手)に対する組換えマウスIL-13の生物活性を中和するマウス血清の能力を測定するために、5ng/mLの組換えマウスIL-13を種々の濃度の血清と共に96ウエルの培養プレート(Invitrogen)にて37℃で1時間インキュベートした。このプレインキュ

50

ベーション後、TF-1細胞を添加した。種々の希釈度の血清、組換えマウスIL-13、およびTF-1細胞を含んでいるアッセイ混合物を加湿CO₂インキュベーター中にて37℃で70時間インキュベートした。MTT基質(カタログ番号G4000, Promega)を最後の4時間のインキュベーション中に添加し、その後、反応を酸溶液で停止させて、代謝されたブルーホルマジン産物を可溶化した。各ウエル中の溶液の吸光度を96ウエルプレートリーダーで570nmの波長にて測定した。

【0121】

このアッセイでマウスIL-13中和能を測定できるのは、血清の希釈度が1/100に等しいかそれより高いもののみであることに注意されたい。血清の希釈度が1/100より低い場合は、TF-1細胞において非特異的な増殖効果が誘導される。

10

【0122】

この血清がマウスIL-13の生物活性を中和する能力は、ある定められた量のマウスIL-13の生物活性を50%中和するために必要な(ND₅₀)血清の希釈度として表される。必要とされる血清サンプルが希釈されればされるほど、中和能が強力であることを意味する。

【0123】

GST-clL-13で免疫したマウスから得た血清のマウスIL-13中和能を上述の方法で測定した。下記に示すとおり強力な中和応答が見られた。

【0124】

マウス (血清サンプルは125日 目、4回のGST-clL-13 ワクチン投与後に採取)	マウスIL-13中和能 (ND ₅₀)
C1	1/1250
C2	1/5230
C3	1/523
C4	1/417
C5	1/1670

20

30

【0125】

2.5 「卵アルブミンチャレンジ」マウス喘息モデルで有効性を示すために必要なマウスIL-13中和のレベルの決定

喘息治療のために必要なIL-13自己ワクチンの効力の基準を定めるために、「卵アルブミンチャレンジ」マウス喘息モデルで、卵アルブミンチャレンジの間に、マウスを種々の投与量のウサギ抗マウスIL-13ポリクローナル抗体で処置した(腹腔内注射により受動的に投与した)。気道の過剰応答(AHR)、杯細胞の異形成(GCM)、および肺の炎症性細胞内容物などのモデルパラメーターをこの実験の終了時に測定した。このモデルでの有効性は、マウス血清で得られたマウスIL-13中和のレベルと相関していた。血清サンプル中のマウスIL-13中和レベルの測定には、マウスIL-13中和バイオアッセイを用いた。

40

【0126】

処置群 (受動的に投与された ウサギ抗マウス IL-13 抗体の投与量)	マウス IL-13 中和能 (ND ₅₀)
最高投与量群	1/4100
高投与量群	1/2670
中間投与量群	1/476
最低投与量群	1/207

10

最も高い3段階の投与量の抗体を投与された処置群は全て同様の反応を示した。これらの3群の全てが、このモデルで用いられた標準とされている治療法(腹腔内経路でデキサメタゾンを3 x 1.5mg/kg投与)と同等(AHRに対して)またはより良好(GCMに対して)な効力を示した。最も低い投与量の抗体を投与された群は、デキサメタゾンと「無処置」の陽性対照群との中間の効力を示した。

【0127】

従って、「中間投与量」での処置を受けた群で得られたIL-13中和のレベルは、この動物モデルにおけるIL-13自己ワクチンに必要なとされる効力の閾値を示している。効力の閾値は、喘息モデルで100%の効力を示すために必要とされる(=ED₁₀₀)マウス血清中のIL-13中和の最低レベルと定義される。したがって1x ED₁₀₀は1/476のND₅₀に等しい。

20

【0128】

定義された効力閾値の意義

「卵アルブミンチャレンジ」マウス喘息モデルで効力を示すのに必要なIL-13中和のレベルは既に上記で定義した。GST-cIL-13によりマウスC1-3およびC5で誘導されたIL-13中和のレベルは、喘息モデルで効力を示すために必要とされた効力の閾値を超えている。これらの結果を図11に示す。

【0129】

従って、GST-cIL-13ワクチンはマウス喘息モデルで効力を示すものと期待される。

30

【0130】

実施例3：種々のアジュバントと組み合わせたGST-cIL-13の免疫原性プロファイル

3.1 免疫感作プロトコル

Balb/cマウスでマウスIL-13に対する自己抗体の形成を誘導するために免疫原としてGST-cIL-13を用いた。6~8週齢の雌マウスにアジュバント中の約100μgのタンパク質を1回注射した。その後、各回アジュバント中の50μgのタンパク質で4回のブースター免疫を行った(免疫原+アジュバント製剤については下記参照)。各処置群は5匹のマウスからなるものとし、下記の表のプロトコルに従って免疫した。

【0131】

血清サンプルは表2に示した時点で尾静脈の静脈穿刺によって得た。遠心して澄清化した後、マウスIL-13に対する特異的IgG応答の有無についてサンプルをELISAでアッセイした。

40

【0132】

群	免疫感作
A	GST-clL-13、AS03 中、筋内
B	GST-clL-13、ミョウバン中、腹腔内
C	GST-clL-13、'ImmunEasy'中、筋内
D	GST-clL-13、CFA/IFA 中、皮下
E	GST-clL-13、PBS 中、皮下
F	免疫せず

10

処置日	処置
-7	免疫前の採血
0	初回免疫
21	1 回目のブースター免疫
35	尾静脈から採血
49	2 回目のブースター免疫
63	尾静脈から採血
77	3 回目のブースター免疫
92	尾静脈から採血
106	4 回目のブースター免疫
125	尾静脈から採血

20

30

【0133】

3.2 免疫原 + アジュバント製剤

乳剤アジュバントAS03の調製

Tween 80をリン酸緩衝溶液(PBS)中に溶解してPBS中に2%の溶液を調製する。2倍濃縮乳剤100mLを提供するために、5gのDL- α -トコフェロールおよび5mLのスクアレンをボルテックスして十分に混合する。90mLのPBS/Tween溶液を添加して十分に混合する。この結果得られた乳剤を、シリンジを通過させ、最終的にM110Sマイクロフルイディクス装置を用いて微小流体とする。この結果得られた油滴はその大きさが約180nmである。アジュバントをタンパク質溶液と1:1で混合し、軽くボルテックスし(中程度の速度で10秒間)、軌道振盪機上にて室温で10分間インキュベートする。注射前に軽くボルテックスし、1匹のマウスあたり全100 μ Lの懸濁液を筋肉内の2カ所の部位に投与する(すなわち、1匹のマウスあたり2 x 50 μ L、各四頭筋に1回注射)。各免疫の前に新たに調製すること。

40

【0134】

ミョウバン

SIGMAから供給されるもの(カタログ番号A-1577)。PBS中に2mg/mLのミョウバンを含む懸濁液を調製する。アジュバントをタンパク質溶液と1:1で混合し、軽くボルテックスし、徐々に振盪しつつ室温で10分間インキュベートする。注射前に軽くボルテックスし、1匹の

50

マウスあたり全100 μ Lの懸濁液を腹腔内投与する。各免疫の前に新たに調製すること。

【0135】

CpG-ImmunEasy

Quiagenから供給されるもの(カタログ番号303101)。ストック容器のアジュバントを穏やかなボルテックスにより混合し、次いでアジュバントとタンパク質を1:1で緩徐にピペティングを5回上下させて行うことによって混合する。室温で15分間インキュベートする。その混合物を緩徐にピペットで5回上下させ、1匹のマウスあたり100 μ Lの懸濁液を筋肉内の2カ所の部位に投与する(すなわち、1匹のマウスあたり2 x 50 μ L、各四頭筋に1回注射)。各免疫の前に新たに調製すること。

【0136】

CFA/IFA

SIGMAから供給されるもの(カタログ番号F-5881, F-5506)。あらかじめ混合したCFAと1:1で製剤化したものを初回免疫用に、また、IFAと1:1で製剤化したものをブースター用にする。サンプルをwhirlimixで処理してCFA/IFAとの均一で白色の懸濁液とする。使用前に少なくとも30分間氷上に保存し、投与前に十分にwhirlimixで処理する。

【0137】

3.3 抗マウスIL-13抗体応答

血清サンプル中の抗マウスIL-13抗体応答は、抗マウスIL-13抗体検出ELISAを用いてモニターした。

【0138】

96ウエルのMaxisorpプレートに、炭酸塩-重炭酸塩バッファー中の抗マウスIL-13モノクローナル抗体(カタログ番号MAB, R+D Systems)を4 μ g/mlで一晩コーティングした。次いでプレートを3% BSA/TBSTにて室温で1時間ブロックし、TBST中で3回洗い、マウスIL-13(カタログ番号413-ML-025, R+D Systems)と共に室温で1時間インキュベートした。洗浄後、プレートをマウス血清と室温で1時間インキュベートし、再度洗浄し、HRPをコンジュゲートさせた抗マウスIgGポリクローナル抗体(カタログ番号A-9309, SIGMA)とインキュベートした。さらに洗浄した後、プレートをo-フェニレンジアミン二塩酸塩ペルオキシダーゼ基質により30分間発現させた。

【0139】

その血清中の抗マウスIL-13抗体のレベルはエンドポイント力価で表した。エンドポイント力価はELISAバックグラウンド読み取り値の2倍に等しくなる血清の希釈度と定義される。

【0140】

マウス	抗マウス IL-13 抗体エンドポイント力価			
	AS03	ミョウバン	CpG	CFA/IFA
1	1/875	1/7250	1/67500	1/6750
2	1/9250	1/800	1/80000	1/975
3	1/160	1/9000	1/54000	1/6000
4	1/9000	1/6500	1/62500	1/16000
5	1/3600	1/10000	1/77500	1/31000

【0141】

図10は、125日目の種々の処置群での1/100に希釈した血清サンプルの抗マウスIL-13抗体プロファイルを示す。

【0142】

CpGアジュバントと組み合わせたGST-cIL-13で免疫した5匹のマウスは全て強い抗マウスIL-13自己抗体応答を生起した。このことは、他のアジュバントでは各群を通じて応答が一定せず、マウスによっては非常に弱い応答しか認められなかったことと対照的である。

10

20

30

40

50

【0143】

これらの結果は、CpGアジュバントが高力価の抗マウスIL-13自己抗体応答を常に生じさせることにおいて、試験した他のアジュバントと比べてはるかに有効であることを示している。

【0144】

これらの血清サンプルを *in vitro*でのIL-13中和バイオアッセイでIL-13中和活性について分析した。

【0145】

3.4 IL-13中和能

ヒトTF-1細胞(ATCCカタログ番号CRL-2003)において組換えマウスIL-13の生物活性を中和するマウス血清の能力を測定するために、5ng/mLの組換えマウスIL-13を種々の濃度の血清と96ウエルの培養プレート(Gibco BRL)にて37℃で1時間インキュベートした。このプレインキュベーション後、TF-1細胞を添加した。種々の希釈度の血清、組換えマウスIL-13、およびTF-1細胞を含んでいるアッセイ混合物を加湿CO₂インキュベーター中にて37℃で70時間インキュベートした。MTT基質(カタログ番号G4000, Promega)を最後の4時間のインキュベーション中に添加し、その後、反応を酸溶液で停止させて、代謝されたブルーホルマザン産物を可溶化した。各ウエル中の溶液の吸光度を96ウエルプレートリーダーで570nmの波長にて測定した。

10

【0146】

このアッセイでマウスIL-13中和能を測定できるのは血清の希釈度が1/100に等しいかこれより高いもののみであることに注意されたい。血清の希釈度が1/100より低い場合はTF-1細胞において非特異的な増殖効果が誘導される。

20

【0147】

マウスIL-13の生物活性を中和するこの血清の能力は、5ng/mLのマウスIL-13の生物活性を50%中和するために必要な(=ND₅₀)血清の希釈度として表される。必要とされる血清サンプルが希釈されればされるほど、中和能が強力であることを意味する。

【0148】

試験したマウスD5血清の最高濃度は1/100希釈であった。これは5ng/mLのマウスIL-13の生物活性を50%中和しなかったため、ND₅₀は<1/100希釈と表される。

【0149】

30

マウス (血清サンプルは 125日目に採取した)	マウス IL-13 中和能 (ND ₅₀)
C1	1/1250
C2	1/5230
C3	1/523
C4	1/417
C5	1/1670
D5	<1/100

40

【0150】

CpGアジュバントと組み合わせたGST-cIL-13で免疫した5匹のマウスから得た125日目の血清サンプルの全てが、*in vitro*バイオアッセイでマウスIL-13の生物活性を強力に中和することができた。これに対して、マウスD5(CFA/IFA中のGST-cIL-13で免疫)から得た125日目の血清サンプルは、試験した全ての希釈度でマウスIL-13の生物活性を中和することが

50

できなかった。

【0151】

これらの結果は、中和能を持つ抗マウスIL-13自己抗体応答を引き出すには、CpGアジュバントが、ここで試験した他のアジュバントと比較して、はるかに有効であることを示している。

【図面の簡単な説明】

【0152】

【図1】マウスキメラIL-13ワクチン構築物の配列。

【図2】4~20% Tris-グリシン SDS-PAGEゲル(Novex)によるGST-cIL-13の分析。

【図3】GST-cIL-13のウエスタンブロット分析。

10

【図4】cIL-13およびGST-cIL-13と抗mIL-13ポリクローナル抗体、抗hIL-13ポリクローナル抗体、および抗GSTポリクローナル抗体との相互作用のELISA分析。

【図5】cIL-13およびGST-cIL-13とmIL-13レセプター、mIL-13R 1、およびmIL-13R 2との相互作用のELISA分析。

【図6】A549溶解物の抗ホスホSTAT6ウエスタンブロット。

【図7】GST-cIL-13(マウスF5)またはcIL-13(マウスE5)を用いた免疫感作によって誘導された抗体応答。

【図8】A549溶解物の抗ホスホSTAT6ウエスタンブロット分析。

【図9】ヒトに用いるためのキメラIL-13ワクチン。下線を付したアミノ酸略号はマウスIL-13に存在するものであり、下線を付していない略号はヒトIL-13由来のものである。

20

【図10】cIL-13を種々のアジュバントと組み合わせて投与した後の抗マウスIL-13抗体のプロファイル。

【図11】cIL-13投与後のマウス血清中和能。

【図12】マウス免疫原として用いるための代替cIL-13。

【図13】ヒト抗IL-4ワクチン中で用いるためのキメラIL-4。

【図1】

【図3】

```

1  GGGCCGGTGCACAGATCTGTCTCTCCCTCTGACCCCTTAGGGAGCTCATTGGGGAGCTG  60
  G P V P R S V S L P L T L R E E L I E E L

61  GTCACATCACACAGACCAGACTCCCTCTGCAACGCGACGATGGTATGGAGTGTGGAC  120
  V N I T Q D Q T P L C N G S M V W S V D

121  CTGGCCGCTGGCGGTACTGTCCAGCCCTGGAAATCCCTGACCAACATCTCCAAATGGCAAT  180
  L A A G G Y C A A L E S L T N I S N C N

181  GCCATCGAGAAGACCCAGAGATGCTGGGCGGACTCTGTAAACGCAAGGCCCCCACTACG  240
  A I E K T Q R M L G S L C N R K A P T T

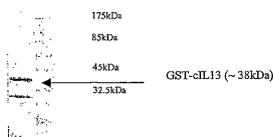
241  GTCCTCAGCCTCCCGATACCAAAATCGAGGTGGCCCAAGTTTGTAAAGGACCTGCTCAGC  300
  V S S L P D T K I E V A Q F V K D L L S

301  TACACAAAGCAACTGTTTGGCCACGGCCCTTCTAA  336
  Y T K Q L F R H G P P *

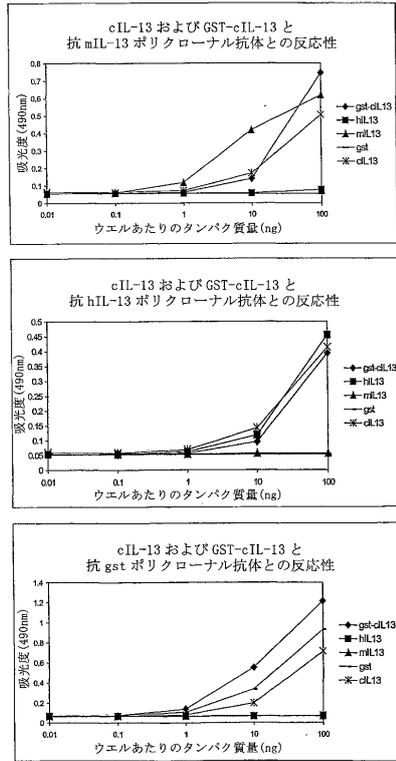
```



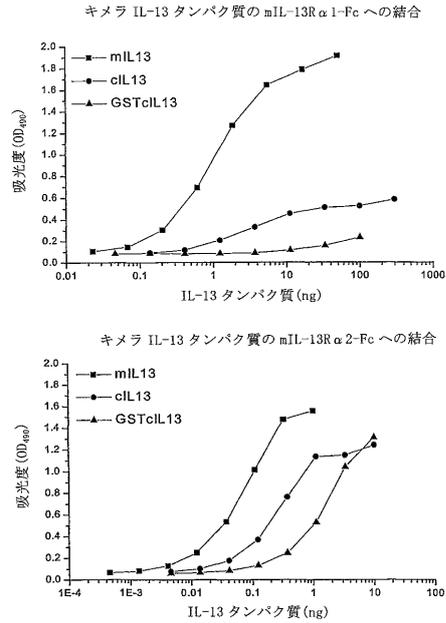
【図2】



【 図 4 】



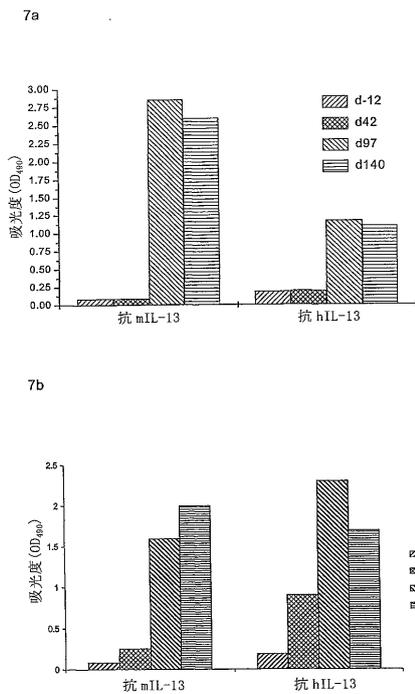
【 図 5 】



【 図 6 】



【 図 7 】

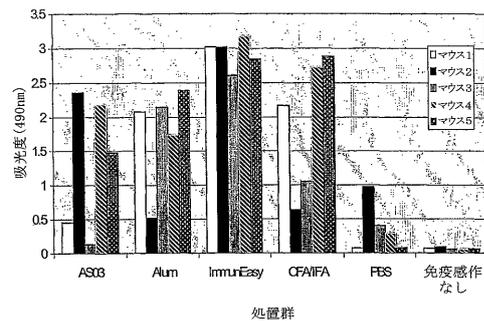


【 図 9 】

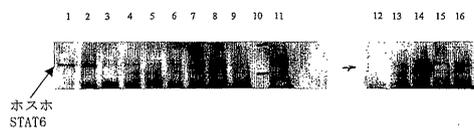
```

1  ATGGCCGCTTTGTTGACCAAGGTCATGCTGCTCCTGCTTGGCGGCTTGCCTCCCA
  M A L L L T T V I A L T C L G G F A S P
61  GGCCCTGTGCTCCCTCTACAGCCCTTAAGGAGCTTATGAGGAGCTGACCAACATCACC
  G P V P P S T A L K E L I E E L S N I T
121  CAGAACAGAAAGGTCGCTGCAATGGCAGCATGTTTGGAGCATCAACCTGACAGCT
  Q N Q K A P L C N G S M V W S I N L T A
181  GGCATGTTCTGTGTAGCCCTGGATTCCCTGATCAAGCTGTCAGGCTGCAGTTCATCACC
  G M F C V A L D S L I N V S G C S A I I Y
241  AGGACCCAGAGGATATGATGCTTCTGCGCCGACAGGCTCAGCTGGGCACTTTTCC
  R T Q R I L H G F C P H K V S A G Q P S
301  AGCTTCATGTCGAGACACAAATCGAGTGGCCCACTTTATAACAAACTGCTCTTA
  S L H V R D T K I E V A H F I T K L L L
361  CATTZAAGAACAATTTTCGCGAGGSAAGGTTCACTGA
  H L K K L F R E G R F N *
  
```

【 図 10 】



【 図 8 】



WO 02/070711 A1 

GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SI, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).

Published:

— with international search report

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BL, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/070711

PCT/GB02/00900

Vaccine

The present invention relates to an isolated polypeptide useful for immunisation against self-antigens. In particular the invention relates to a self-protein that is
5 capable of raising auto-antibodies when administered in vivo. The invention particularly relates to rendering human cytokines immunogenic in humans. The invention further relates to pharmaceutical compositions comprising such compounds and their use in medicine and to methods for their production.

10 Background of the invention

Asthma is a chronic lung disease, caused by inflammation of the lower airways and is characterised by recurrent breathing problems. Airways of patients are sensitive and swollen or inflamed to some degree all the time, even when there are no
15 symptoms. Inflammation results in narrowing of the airways and reduces the flow of air in and out of the lungs, making breathing difficult and leading to wheezing, chest tightness and coughing. Asthma is triggered by super-sensitivity towards allergens (e.g. dust mites, pollens, moulds), irritants (e.g. smoke, fumes, strong odours), respiratory infections, exercise and dry weather. The triggers irritate the airways and
20 the lining of the airways swell to become even more inflamed, mucus then clogs up the airways and the muscles around the airways tighten up until breathing becomes difficult and stressful and asthma symptoms appear.

COPD is an umbrella term to describe diseases of the respiratory tract, which shows
25 similar symptoms to asthma and is treated with the same drugs. COPD is characterised by a chronic, progressive and largely irreversible airflow obstruction. The contribution of the individual to the course of the disease is unknown, but smoking cigarettes is thought to cause 90% of the cases. Symptoms include coughing, chronic bronchitis, breathlessness and respiratory infections. Ultimately
30 the disease will lead to severe disability and death.

WO 02/070711

PCT/GB02/00900

2

As a result of the various problems associated with the production, administration and tolerance of monoclonal antibodies there is an increased focus on methods of instructing the patient's own immune system to generate endogenous antibodies of the appropriate specificity by means of vaccination. However, mammals do not generally have high-titre antibodies against self-proteins present in serum, as the immune system contains homeostatic mechanisms to prevent their formation. The importance of these tolerance mechanisms is illustrated by diseases like myasthenia gravis, in which auto-antibodies directed to the nicotinic acetylcholine receptor of skeletal muscle cause weakness and fatigue (Drachman, 1994, *N Engl J Med* 330:1797-1810). There is therefore a need for a vaccine approach which is able to circumvent antibody tolerance mechanisms without inducing auto-antibody-mediated pathology.

A number of techniques have been designed with the aim of breaking B cell tolerance without necessarily inducing unacceptable autoimmune toxicity. However, all have significant drawbacks.

One technique involves chemically cross-linking either the self-protein (or peptides derived from it) to a highly immunogenic carrier protein, such as keyhole limpet haemocyanin (Antibodies: A laboratory manual" Harlow, E and Lane D. 1988. Cold Spring Harbor Press). This approach is a variant of the widely used hapten-carrier system for raising antibodies to poorly immunogenic targets, such as low-molecular weight chemical compounds. However, the process of chemical conjugation can destroy potentially valuable epitopes, and much of the evoked antibody response is directed at the carrier protein. Furthermore this approach is only applicable to protein vaccination, and is not compatible with nucleic acid immunogens.

A variant on the carrier protein technique involves the construction of a gene encoding a fusion protein comprising both carrier protein (for example hepatitis B core protein) and self-protein (The core antigen of hepatitis B virus as a carrier for immunogenic peptides", *Biological Chemistry*. 380(3):277-83, 1999). The fusion

WO 02/070711

PCT/GB02/00900

3

gene may be administered directly as part of a nucleic acid vaccine. Alternatively, it may be expressed in a suitable host cell *in vitro*, the gene product purified and then delivered as a conventional vaccine, with or without an adjuvant. However, fusing a large carrier protein to the self-protein can constrain or distort the self-protein's conformation, reducing its efficiency in evoking antibodies cross-reactive with the native molecule. Also, like the traditional cross-linked carrier systems, much of the antibody response is directed to the carrier part of the fusion. Anti-carrier responses may limit the effectiveness of subsequent booster administrations of vaccine or increase the chance of allergic or anaphylactic reactions.

10 A more refined approach has been described by Dalum and colleagues wherein a single class II MHC-restricted epitope is inserted into the target molecule. They demonstrated the use of this method to induce antibodies to ubiquitin (Dalum et al, 1996, *J Immunol* 157:4796-4804; Dalum et al, 1997, *Mol Immunol* 34:1113-1120) and the cytokine TNF (Dalum et al, 1999, *Nature Biotech* 17:666-669). As a result, all T cell help must arise either from this single epitope or from junctional sequences. While this approach may work well in subjects possessing the appropriate MHC class II haplotype for which the vaccine was designed, or indeed those fortunate enough to have class II molecules capable of binding junctional epitopes, in any normal outbred population, such as those typical of humans, there will be a significant portion of the population for whom the vaccine will not work. Additionally, since the inserted epitope is typically from a quite unrelated protein, such as ovalbumin or lysozyme, it is likely that the additional sequence will to some degree interfere with the folding of the target protein, preventing the adoption of a fully native conformation of the target protein.

In contrast to all of the above, the present invention provides a multiplicity of potential T cell epitopes, yet retains the target molecule in a conformation close to the native form. These properties allow the vaccines of the present invention to be effective immunogens in complex outbred populations, such as those composed of human patients. These properties are achieved by rendering a mutation in a self-

WO 02/070711

PCT/GB02/00900

4

protein to produce a sequence at that point which can be found in an analogous protein.

A number of recent papers have defined a critical role for the Th2 cytokine IL-13 in driving pathology in the ovalbumin model of allergic asthma (Wills-Karp et al, 1998; Grunig et al, 1998). In this work, mice previously sensitised to ovalbumin were injected with a soluble IL-13 receptor which binds and neutralises IL-13. Airway hyper-responsiveness to acetylcholine challenge was completely ablated in the treated group. Histological analysis revealed that treated mice had reversed the goblet-cell metaplasia seen in controls. In complementary experiments, lung IL-13 levels were raised by over-expression in a transgenic mouse or by installation of protein into the trachea in wild-type mice. In both settings, airway hyper-responsiveness, eosinophil invasion and increased mucus production were seen (Zhu et al, 1999). These data show that IL-13 activity is both necessary and sufficient to produce several of the major clinical and pathological features of allergic asthma in a well-validated model.

A vaccine capable of directing a neutralising response to IL-13 would therefore constitute a useful therapeutic for the treatment of allergic asthma in humans. It would also have application in the treatment of certain helminth infection-related disorders (Brombacher, 2000) and diseases where IL-13 production is implicated in fibrosis (Chiaramonte et al, 1999), such as chronic obstructive pulmonary disease. The present invention addresses this need.

The concepts and principles of the invention are thus set forth with respect to IL-13, but can be applied to any mammalian self-protein having an analogous protein in a second species.

30

WO 02/070711

PCT/GB02/00900

5

Summary of the Invention

The present invention provides an isolated polypeptide which is at least 30% but less than 100% identical to a human protein which polypeptide

- 5 (a) contains at least one mutation which is characteristic of an analogous non human protein;
and b) is capable of raising antibodies in humans and
(c) is sufficiently structurally similar to the human protein that the antibodies bind to both the human protein and the polypeptide; and
10 (d) wherein the polypeptide is not an antibody.

Thus the invention provides in one embodiment; a protein having B cell epitopes from a mammalian self-antigen and a mutation that gives rise to a sequence of an analogous protein from a second mammalian species, such that the protein is able
15 to raise in the species from which the B-cell epitopes are derived, an immune response that recognises the native protein from which the B-cell epitopes are derived.

Preferably the sequence of the analogous protein is more than 5, more preferably
20 greater than 8 contiguous amino acids. Thus the protein of the present invention contains a sequence that is identical to the analogous sequence for at least 5, preferably at least 8 consecutive amino acids. In an alternative embodiment a protein is provided having B cell epitopes of a self protein which are grafted by substitution, into a framework of an analogous protein from a second mammalian
25 species such that the protein is able to raise in the species in which the B cell epitopes are derived an immune response that recognises the natural protein from which the B-cell epitopes are derived.

It will be appreciated that the protein of the present invention are not an antibody.

30

WO 02/070711

PCT/GB02/00900

6

The immune response raised is preferably an antibody response, most preferably a neutralising antibody response.

In general the mutation is introduced preferably into the non-surface exposed region
5 of the molecule, such that surface exposed regions are conserved. Surface exposed regions are accessible to the immune-system and consequently often contain B-cell epitopes. Accordingly the present invention provides a protein comprising conserved surface exposed regions of a self protein, and a mutation introduced into the non-surface exposed region, said mutation giving rise to a sequence of an
10 analogous protein such that the protein is able to raise an immune response to the self-protein arises in the species from which the self-protein is derived.

The self protein is preferably a human protein, but can be a protein from any mammal in which it is desired to raise an auto immune response to. The immune
15 response is preferably specific to the native protein and immunogen of the invention. That is having minimal cross-reactivity or neutralising capacity with respect to other self proteins.

The self antigen is preferably a cytokine, more preferably a 4 helical cytokine, more
20 preferably IL-4 or IL-13, most preferably IL-13. Thus in a preferred embodiment of the present invention there is provided a chimaeric protein comprising B cell epitopes from Human IL-13 presented in a murine IL-13 back bone. Such a construct is capable of raising a specific anti IL-13 antibody response in humans. Such a construct is shown in figure 9 (seq: ID No 21 and 22). Similarly an IL-4
25 construct comprising human IL-surface regions and murine framework is presented in figure 13 (Seq ID: No 25).

The invention also provides:

- an expression vector which comprises a polynucleotide of the invention and
30 which is capable of expressing a polypeptide of the invention;
- a host cell comprising an expression vector of the invention;

WO 02/070711

PCT/GB02/00900

7

a method of producing a polypeptide of the invention which method comprises maintaining a host cell of the invention under conditions suitable for obtaining expression of the polypeptide and isolating the said polypeptide:
a vaccine composition comprising a polypeptide or polynucleotide of the invention
5 and a pharmaceutically acceptable carrier.

In another aspect, the invention provides a method for the design and preparation of a polypeptide according to the invention which method comprises:

1. identification of one or more regions of a self, typically human, protein against
10 which an antibody response is desired.
2. identification of the amino-acid sequence of the self protein.
3. identification of the amino-acid sequence of an analogous protein
construction by recombinant DNA techniques of a chimaeric molecule containing
at least one target region identified in step 1, whose amino-acid sequence is taken
15 from the sequence identified in step 2, and
sufficient amino-acids from the sequence(s) identified in step 3 to enable the
resulting protein to fold into a shape similar to that of the self protein such that the
mutated protein can raise an immune response that recognises the self protein.

20 Description of Figures

GST = glutathione S-transferase, rmlL-13 = recombinant mouse IL-13, rhIL-13 =
recombinant human IL-13, cIL-13 = chimaeric IL-13

Figure 1. Sequence of mouse chimaeric IL-13 vaccine construct. Underlined
25 aminoacid symbols denote sequence human IL-13, unmodified symbols are from
murine IL-13.

Figure 2. Analysis of GST cIL-13 by 4-20% Tris-glycine SDS-PAGE gel (Novex),
stained for total protein with Coomassie Blue.

30

Figure 3. Western blot analysis of GST-cIL-13.

WO 02/070711

PCT/GB02/00900

8

Figure 4. ELISA analysis of cIL-13 and GST-cIL-13 interaction with anti-mIL-13 polyclonal antibody, anti-hIL-13 polyclonal antibody and anti-GST polyclonal antibody.

5 Figure 5. ELISA analysis of the interaction of cIL-13 and GST-cIL-13 with the mIL-13 receptors, mIL-13R α 1 and mIL-13R α 2.

Figure 6. Anti-phospho-STAT6 Western blot of A549 lysates.

10 Figure 7. Antibody responses induced by immunisation with GST-cIL-13 (mouse F5) or cIL-13 (mouse E5).

Figure 8. Anti-phospho-STAT6 Western blot analysis of A549 lysates.

15 Figure 9 Chimaeric IL-13 vaccine for use in humans. Underlined aminoacid symbols denote sequence found in murine IL-13, unmodified symbols are from human IL-13.

Figure 10. Anti-mouse IL-13 antibody profiles follow administration of cIL-13 in combination with various adjuvants.

20 Figure 11. Serum neutralisation capacity of mice following administration of cIL-13.

Figure 12. Alternative cIL-13 for use as a mouse immunogen.

25 Figure 13. Chimaeric IL-4 for use in human anti IL-4 vaccine.

Detailed description of the invention

30 Throughout this specification and the appended claims, unless the context requires otherwise, the words "comprise" and "include" or variations such as "comprising",

WO 02/070711

PCT/GB02/00900

9

"comprises", "including", "includes" etc., are to be construed inclusively, that is, use of these words will imply the possible inclusion of integers or elements not specifically recited.

5 As described herein, the present invention relates isolated polypeptides and isolated polynucleotides. In the context of this invention the term "isolated" is intended to convey that the polypeptide or polynucleotide is not in its native state, insofar as it has been purified at least to some extent or has been synthetically produced, for example by recombinant methods, or mechanical synthesis. The term "isolated"

10 therefore includes the possibility of the polypeptides or polynucleotides being in combination with other biological or non-biological material, such as cells, suspensions of cells or cell fragments, proteins, peptides, expression vectors, organic or inorganic solvents, or other materials where appropriate, but excludes the situation where the polynucleotide is in a state as found in nature.

15

An advantage of the invention is that the polypeptide of the invention contains regions of the self, eg human protein against which an antibody response is desired, in association with regions characteristic of an analogous protein which are sufficiently different to the human protein to provide excellent T cell help, but yet are

20 optimised by evolution to fold into a shape highly similar to the human protein. This allows antibodies to be raised that recognise the self antigen. Typically, the immune response raised includes the raising of a neutralising antibody response.

The human protein according to the invention may be a full length protein encoded

25 by the human genome or a domain or sub-unit of a full length protein encoded by the human genome. Where it is desired to raise neutralising antibodies against a functional domain of the self antigen – or a receptor binding domain a chimaeric antigen involving only these regions may be prepared. Thus the exposed region of such a domain, or the B cell epitopes of such a domain are conserved and mutation

30 of an analogues protein is introduced in the non-B cell epitope or surface exposed domains.

WO 02/070711

PCT/GB02/00900

10

The term 'protein' is intended to include, for example, shorter sequences of amino acid residues which may be referred to as peptides, such as neuropeptides. The human protein will typically be the subject of post-translational modification such as glycosylation, proteolytic cleavage, phosphorylation, and others well known to those skilled in the field. The human protein is preferably a cytokine, a hormone, a growth factor or an extracellular protein, more preferably a 4-helical cytokine, most preferably IL-13. Cytokines include, for example, IL1, IL2, IL3, IL-4, IL5, IL6, IL7, IL8, IL9, IL10, IL11, IL12, IL13, IL14, IL15, IL16, IL17, IL18, IL20, IL21, IL25, TNF, TGF, GMCSF, MCSF and OSM. 4-helical cytokines include IL2, IL3, IL-4, IL5, IL13, GMCSF and MCSF. Hormones include, for example, luteinising hormone (LH), follicle stimulating hormone (FSH), chorionic gonadotropin (CG), VGF, Ghrelin, agouti, agouti related protein and neuropeptide Y. Growth factors include, for example, VEGF. Extracellular proteins include, for example, APP or B-amyloid.

15 An analogous protein is one which is orthologous or paralogous to the self-protein, eg human protein, wherein an orthologous protein can be traced by descent to a common ancestor of the different organisms and is therefore likely to perform similar conserved functions in the different organisms. Thus an orthologous gene means genes which are so similar in sequence they have originated from a single ancestral gene and thus are an equivalent gene in a different species and have evolved from a common ancestor by specification. In particular in humans the orthologous protein is a structurally equivalent molecule in a non human mammal. A paralogous protein is one which appears in more than one copy in a given organism by a duplication event (Venter, Science; 1336, vol 291; 2001), that is homologous sequence (sharing a common evolutionary ancestors) that have diversified by gene duplication. Preferably the analogous protein is an orthologue. An orthologous protein will typically have the same name as the human protein and will typically perform the same function, for example murine IL-13 is the orthologue to human IL-13. The analogous protein is typically mammalian or avian, for example, bovine, ovine, rodent, such as murine, porcine, simian, feline, canine or human. Preferably the analogous protein is murine. Thus in the context of the present invention, Murine IL-13 is an analogous

WO 02/070711

PCT/GB02/00900

11

(and orthologous) protein to human IL-13. Similarly simian IL-4 is an analogous (and orthologous) protein to human IL-4.

The polypeptide of the invention preferably comprises 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 or 5 more mutations characteristic of an analogous protein. More preferably the polypeptide comprises at least three mutations. Each mutation may be characteristic of the same or different analogous proteins. Thus a first mutation might be characteristic of a murine analogue and a second mutation might be characteristic of a simian analogue. According to one feature, the polypeptide 10 comprises at least three mutations, where each mutation is characteristic of a different analogue. Preferably, however, each mutation is characteristic of the same analogue. A mutation is a change in the amino acid sequence of the protein and includes, for example, deletions, insertions and substitutions. Preferably the mutation is a substitution. Preferably more than one amino acids are replaced in 15 each non-surfaced exposed region.

A mutation which is characteristic of an analogous protein is one which results in the sequence of the human protein being closer in identity to the sequence of the analogous protein after the mutation has been made to the human protein. For 20 example when the human sequence is ProProArgVal and the murine analogue has the sequence ProProTyrVal, a mutation characteristic of the analogous protein is to substitute Arg for Tyr. Preferably the mutation is not made in residues which are surface residues in native folded active protein in aqueous solution under physiological conditions. These surface residues particular those forming loop 25 structures are often B cell epitopes and it is preferred that all of these regions are conserved. The mutations thus introduced have the function of breaking the tolerance of the self-protein and being immunogenic in the species that the non-mutated protein is derived from.

30 In an embodiment the polypeptides of the invention are at least 30% and less than 100% identical to a human protein, preferably over the whole length of the human

WO 02/070711

PCT/GB02/00900

12

protein. Preferably the polypeptides are at least 40%, for example at least 50% identical to the human protein. More preferably the polypeptides are at least 60%, for example, at least 70% identical to the human protein. Most preferably the polypeptides are at least 85% identical to the human protein, for example, about
5 90% identical. Such proteins are capable of raising an immune response in humans that recognise the human protein.

For example, the UWGCG Package provides the BESTFIT program which can be used to calculate homology (for example used on its default settings) (Devereux *et al*
10 (1984) *Nucleic Acids Research* 12, p387-395). The PILEUP and BLAST algorithms can be used to calculate homology or line up sequences (typically on their default settings), for example as described in Altschul (1993) *J. Mol. Evol.* 36:290-300; Altschul *et al* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10.

15 Software for performing BLAST analyses is publicly available through the National Centre for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). This algorithm involves first identifying high scoring sequence pair (HSPs) by identifying short words of length W in the query sequence that either match or satisfy some positive-valued threshold score T when aligned with a word of the same length in a database
20 sequence. T is referred to as the neighbourhood word score threshold (Altschul *et al*, 1990). These initial neighbourhood word hits act as seeds for initiating searches to find HSPs containing them. The word hits are extended in both directions along each sequence for as far as the cumulative alignment score can be increased. Extensions for the word hits in each direction are halted when: the cumulative
25 alignment score falls off by the quantity X from its maximum achieved value; the cumulative score goes to zero or below, due to the accumulation of one or more negative-scoring residue alignments; or the end of either sequence is reached. The BLAST algorithm parameters W , T and X determine the sensitivity and speed of the alignment. The BLAST program uses as defaults a word length (W) of 11, the
30 BLOSUM62 scoring matrix (see Henikoff and Henikoff (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci.*

WO 02/070711

PCT/GB02/00900

13

USA 89: 10915-10919) alignments (B) of 50, expectation (E) of 10, M=5, N=4, and a comparison of both strands, when the program is being used on polynucleotides.

The BLAST algorithm performs a statistical analysis of the similarity between two sequences; see e.g., Karlin and Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5873-5787. One measure of similarity provided by the BLAST algorithm is the smallest sum probability (P(N)), which provides an indication of the probability by which a match between two nucleotide or amino acid sequences would occur by chance. For example, a sequence is considered similar to another sequence if the smallest sum probability in comparison of the first sequence to the second sequence is less than about 1, preferably less than about 0.1, more preferably less than about 0.01, and most preferably less than about 0.001.

The successful design of a polypeptide according to the present invention can be verified for example by demonstrating that, when expressed in an appropriate host cell, the polypeptide adopts a conformation sufficiently similar to that of the self protein that antibodies are generated which are cross-reactive with the native self protein. This may be shown using immunological techniques, such as binding of monoclonal or polyclonal antibodies in ELISA, or by physicochemical techniques such as circular dichroism, or by crystallographic techniques such as X-ray crystallography or by computer modelling, or by numerous other approaches well known to those skilled in the art.

Further confirmation of a successful design can be obtained by administering the resulting polypeptide in a self-context in an appropriate vaccination regime, and observing that antibodies capable of binding the protein are induced. This binding may be assessed through use of ELISA techniques employing recombinant or purified native protein, or through bioassays examining the effect of the protein on a sensitive cell or tissue. A particularly favoured assessment is to observe a phenomenon causally related to activity of the protein in the intact host, and to determine whether the presence of antibodies induced by the methods of the

WO 02/070711

PCT/GB02/00900

14

invention modulate that phenomenon. Thus a protein of the present invention will be able to raise antibodies to the native antigen in the species from which the native protein is derived.

5 The polypeptide of the invention may be further modified by mutation, for example substitution, insertion or deletion of amino-acids in order to add desirable properties (such as the addition of a sequence tag that facilitates purification or increase immunogenicity) or remove undesirable properties (such as an unwanted agonistic activity at a receptor) or trans-membrane domains. In particular the present
10 invention specifically contemplates fusion partners that ease purification such as poly histidine tags or GST expression partners that enhance expression.

In a preferred embodiment there is provided a human IL-13 having one or more of the following mutations or a conservative substitution thereof characteristic of mouse
15 IL-13. The following numbering refers to IL-13 expressed with its signal sequence in E.coli.

R	→	K	at	position	30
V	→	S	at	position	37
20 Y	→	F	at	position	63
A	→	V	at	position	65
E	→	D	at	position	68
E	→	Y	at	position	80
K	→	R	at	position	81
25 M	→	I	at	position	85
G	→	H	at	position	87
Q	→	H	at	position	113
V	→	I	at	position	115
D	→	K	at	position	117

30

WO 02/070711

PCT/GB02/00900

15

More preferably the human IL-13 comprises at least two preferably at least 3,4,5,6 or more of the above mutations or a conservative substitution thereof. It is preferred that all twelve mutations are present.

5 A "conservative substitution" is one in which an amino acid is substituted for another amino acid that has similar properties, such that one skilled in the art of peptide chemistry would expect the secondary structure and hydrophobic nature of the polypeptide to be substantially unchanged.

10 For example, certain amino acids may be substituted for other amino acids in a protein structure without appreciable loss of interactive binding capacity with structures such as, for example, antigen-binding regions of antibodies or binding sites on substrate molecules. Since it is the interactive capacity and nature of a protein that defines that protein's biological functional activity, certain amino acid
15 sequence substitutions can be made in a protein sequence, and, of course, its underlying DNA coding sequence, and nevertheless obtain a protein with like properties. It is thus contemplated that various changes may be made in the peptide sequences of the disclosed compositions, or corresponding DNA sequences which encode said peptides without appreciable loss of their biological utility or activity.

20

In making such changes, the hydrophobic index of amino acids may be considered. The importance of the hydrophobic amino acid index in conferring interactive biologic function on a protein is generally understood in the art (Kyte and Doolittle, 1982, incorporated herein by reference). It is accepted that the relative hydrophobic

25 character of the amino acid contributes to the secondary structure of the resultant protein, which in turn defines the interaction of the protein with other molecules, for example, enzymes, substrates, receptors, DNA, antibodies, antigens, and the like. Each amino acid has been assigned a hydrophobic index on the basis of its hydrophobicity and charge characteristics (Kyte and Doolittle, 1982). These values
30 are: isoleucine (+4.5); valine (+4.2); leucine (+3.8); phenylalanine (+2.8); cysteine/cystine (+2.5); methionine (+1.9); alanine (+1.8); glycine (-0.4); threonine (-

WO 02/070711

PCT/GB02/00900

16

0.7); serine (-0.8); tryptophan (-0.9); tyrosine (-1.3); proline (-1.6); histidine (-3.2); glutamate (-3.5); glutamine (-3.5); aspartate (-3.5); asparagine (-3.5); lysine (-3.9); and arginine (-4.5).

5 It is known in the art that certain amino acids may be substituted by other amino acids having a similar hydropathic index or score and still result in a protein with similar biological activity, i.e. still obtain a biological functionally equivalent protein. In making such changes, the substitution of amino acids whose hydropathic indices are within ± 2 is preferred, those within ± 1 are particularly preferred, and those within
10 ± 0.5 are even more particularly preferred. It is also understood in the art that the substitution of like amino acids can be made effectively on the basis of hydrophilicity. U. S. Patent 4,554,101 (specifically incorporated herein by reference in its entirety), states that the greatest local average hydrophilicity of a protein, as governed by the hydrophilicity of its adjacent amino acids, correlates with a biological property of the
15 protein.

As detailed in U. S. Patent 4,554,101, the following hydrophilicity values have been assigned to amino acid residues: arginine (+3.0); lysine (+3.0); aspartate (+3.0 \pm 1); glutamate (+3.0 \pm 1); serine (+0.3); asparagine (+0.2); glutamine (+0.2); glycine (0);
20 threonine (-0.4); proline (-0.5 \pm 1); alanine (-0.5); histidine (-0.5); cysteine (-1.0); methionine (-1.3); valine (-1.5); leucine (-1.8); isoleucine (-1.8); tyrosine (-2.3); phenylalanine (-2.5); tryptophan (-3.4). It is understood that an amino acid can be substituted for another having a similar hydrophilicity value and still obtain a biologically equivalent, and in particular, an immunologically equivalent protein. In
25 such changes, the substitution of amino acids whose hydrophilicity values are within ± 2 is preferred, those within ± 1 are particularly preferred, and those within ± 0.5 are even more particularly preferred.

As outlined above, amino acid substitutions are generally therefore based on the
30 relative similarity of the amino acid side-chain substituents, for example, their

WO 02/070711

PCT/GB02/00900

17

hydrophobicity, hydrophilicity, charge, size, and the like. Exemplary substitutions that take various of the foregoing characteristics into consideration are well known to those of skill in the art and include: arginine and lysine; glutamate and aspartate; serine and threonine; glutamine and asparagine; and valine, leucine and isoleucine.

5 These are preferred conservative substitutions.

Amino acid substitutions may further be made on the basis of similarity in polarity, charge, solubility, hydrophobicity, hydrophilicity and/or the amphipathic nature of the residues. For example, negatively charged amino acids include aspartic acid and
10 glutamic acid; positively charged amino acids include lysine and arginine; and amino acids with uncharged polar head groups having similar hydrophilicity values include leucine, isoleucine and valine; glycine and alanine; asparagine and glutamine; and serine, threonine, phenylalanine and tyrosine. Other groups of amino acids that may represent conservative changes include: (1) ala, pro, gly, glu, asp, gln, asn, ser, thr;
15 (2) cys, ser, tyr, thr; (3) val, ile, leu, met, ala, phe; (4) lys, arg, his; and (5) phe, tyr, trp, his.

In a preferred embodiment, the mutated IL-13 of the present invention comprises one or more of the following sequences or a variant thereof comprising a
20 conservative substitution:

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

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

25

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

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

30 The polypeptide of the invention is encoded by polynucleotides of the invention. A person skilled in the art will readily be able to determine the sequence of the

WO 02/070711

PCT/GB02/00900

18

polynucleotide which encodes the polypeptide by applying the genetic code. Once the required nucleic acid sequence has been determined, the polynucleotide with the desired sequence can be produced as described in the examples. A skilled person will readily be able to adapt any parameters necessary, such as primers and PCR conditions. It will also be understood by a person skilled in the art that, due to the degeneracy of the genetic code, there is potentially more than one polynucleotide which encodes a polypeptide of the invention.

The polynucleotide of the invention is typically RNA, for example mRNA, or DNA, for example genomic DNA, cDNA or synthetic DNA. Preferably the polynucleotide is DNA. Particularly preferably it is cDNA.

The present invention further provides an expression vector, which is a nucleic acid construct, comprising the polynucleotide of the invention. Additionally, the nucleic acid construct will comprise appropriate initiators, promoters, enhancers and other elements, such as for example, polyadenylation signals, which may be necessary, and which are positioned in the correct orientation, in order to allow for protein expression within a mammalian cell.

The promoter may be a eukaryotic promoter for example a CD68 promoter, Gal1, Gal10, or NMT1 promoter, a prokaryotic promoter for example *Tac*, *Trc*, or *Lac*, or a viral promoter, for example the cytomegalovirus promoter, the SV40 promoter, the polyhedrin promoter, the P10 promoter, or the respiratory syncytial virus LTR promoter. Preferably the promoter is a viral promoter. Particularly preferred is when the promoter is the cytomegalovirus immediate early promoter, optionally comprising exon 1 from the HCMV IE gene.

The transcriptional regulatory elements may comprise enhancers, for example the hepatitis B surface antigen 3' untranslated region, the CMV enhancer; introns, for example the CD68 intron, or the CMV intron A, or regulatory regions, for example the CMV 5' untranslated region.

WO 02/070711

PCT/GB02/00900

19

The polynucleotide is preferably operably linked to the promoter on the nucleic acid construct such that when the construct is inserted into a mammalian cell, the polynucleotide is expressed to produce an encoded polypeptide.

The nucleic acid construct backbone may be RNA or DNA, for example plasmid DNA, viral DNA, bacterial DNA, bacterial artificial chromosome DNA, yeast artificial chromosome DNA, synthetic DNA. It is also possible for the nucleic acid construct to be artificial nucleic acid, for example phosphorothioate RNA or DNA. Preferably the construct is DNA. Particularly preferred is when it is plasmid DNA.

10 The present invention further provides a host cell comprising an expression vector of the invention. Such cells include transient, or preferably stable higher eukaryotic cell lines, such as mammalian cells or insect cells, using for example a baculovirus expression system, lower eukaryotic cells, such as yeast or prokaryotic cells such as bacterial cells. Particular examples of cells which may be modified by insertion of
15 vectors encoding for a polypeptide according to the invention include mammalian HEK293T, CHO, HeLa, NS0 and COS cells. Preferably the cell line selected will be one which is not only stable, but also allows for mature glycosylation of a polypeptide. Expression may be achieved in transformed oocytes. A polypeptide of the invention may be expressed in cells of a transgenic non-human animal,
20 preferably a mouse or expressed into the milk of larger mammals, such as goats, sheep and cows. A transgenic non-human animal expressing a polypeptide of the invention is included within the scope of the invention. A polypeptide of the invention may also be expressed in *Xenopus laevis* oocytes.

25 The present invention also includes pharmaceutical or vaccine compositions, which comprise a therapeutically effective amount of nucleic acid construct or polypeptide of the invention, optionally in combination with a pharmaceutically acceptable carrier, preferably in combination with a pharmaceutically acceptable excipient such as phosphate buffered saline (PBS), saline, dextrose, water, glycerol, ethanol,
30 liposomes or combinations thereof. The vaccine composition may alternatively comprise a therapeutically effective amount of a nucleic acid construct of the

WO 02/070711

PCT/GB02/00900

20

invention, formulated onto metal beads, preferably gold beads. The vaccine composition of the invention may also comprise an adjuvant, such as, for example, in an embodiment, imiquimod, tucareol or alum.

5 Protein adjuvant formulations are preferred as these induce high titre antibody responses.

Preferably the adjuvant is administered at the same time as of the invention and in preferred embodiments are formulated together. Such adjuvant agents
10 contemplated by the invention include, but this list is by no means exhaustive and does not preclude other agents: synthetic imidazoquinolines such as imiquimod [S-26308, R-837], (Harrison, et al. 'Reduction of recurrent HSV disease using imiquimod alone or combined with a glycoprotein vaccine', Vaccine 19: 1820-1826, (2001)); and resiquimod [S-28463, R-848] (Vasilakos, et al. 'Adjuvant activities of
15 immune response modifier R-848: Comparison with CpG ODN', Cellular immunology 204: 64-74 (2000).), Schiff bases of carbonyls and amines that are constitutively expressed on antigen presenting cell and T-cell surfaces, such as tucareol (Rhodes, J. et al. 'Therapeutic potentiation of the immune system by costimulatory Schiff-base-forming drugs', Nature 377: 71-75 (1995)), cytokine, chemokine and co-
20 stimulatory molecules, Th1 inducers such as interferon gamma, IL-2, IL-12, IL-15 and IL-18, Th2 inducers such as IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 and IL-13 and other chemokine and co-stimulatory genes such as MCP-1, MIP-1 alpha, MIP-1 beta, RANTES, TCA-3, CD80, CD86 and CD40L, other immunostimulatory targeting ligands such as CTLA-4 and L-selectin, apoptosis stimulating proteins and peptides
25 such as Fas, (49), synthetic lipid based adjuvants, such as vaxfectin, (Reyes et al., 'Vaxfectin enhances antigen specific antibody titres and maintains Th1 type immune responses to plasmid DNA immunization', Vaccine 19: 3778-3786) squalene, alpha-tocopherol, polysorbate 80, DOPC and cholesterol, endotoxin, [LPS], Beutler, B., 'Endotoxin, Toll-like receptor 4, and the afferent limb of innate immunity', Current
30 Opinion in Microbiology 3: 23-30 (2000)); CpG oligo- and di-nucleotides, Sato, Y. et al., 'Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene

WO 02/070711

PCT/GB02/00900

21

immunization', *Science* 273 (5273): 352-354 (1996). Hemmi, H. et al., 'A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA', *Nature* 408: 740-745, (2000) and other potential ligands that trigger Toll receptors to produce Th1-inducing cytokines, such as synthetic Mycobacterial lipoproteins, Mycobacterial protein p19, peptidoglycan, teichoic acid and lipid A.

Certain preferred adjuvants for eliciting a predominantly Th1-type response include, for example, a Lipid A derivative such as monophosphoryl lipid A, or preferably 3-de-O-acylated monophosphoryl lipid A. MPL[®] adjuvants are available from Corixa Corporation (Seattle, WA; see, for example, US Patent Nos. 4,436,727; 4,877,611; 4,866,034 and 4,912,094). CpG-containing oligonucleotides (in which the CpG dinucleotide is unmethylated) also induce a predominantly Th1 response. Such oligonucleotides are well known and are described, for example, in WO 96/02555, WO 99/33488 and U.S. Patent Nos. 6,008,200 and 5,856,462. Immunostimulatory DNA sequences are also described, for example, by Sato et al., *Science* 273:352, 1996. Another preferred adjuvant comprises a saponin, such as Quil A, or derivatives thereof, including QS21 and QS7 (Aquila Biopharmaceuticals Inc., Framingham, MA); Escin; Digitonin; or *Gypsophila* or *Chenopodium quinoa* saponins.

The present invention also provides methods of treating or preventing IL-13 mediated disease, any symptoms or diseases associated therewith, comprising administering an effective amount of a protein, a polynucleotide, a vector or a pharmaceutical composition according to the invention. Administration of a pharmaceutical composition may take the form of one or more individual doses, for example in a "prime-boost" therapeutic vaccination regime. In certain cases the "prime" vaccination may be via particle mediated DNA delivery of a polynucleotide according to the present invention, preferably incorporated into a plasmid-derived vector and the "boost" by administration of a recombinant viral vector comprising the same polynucleotide sequence, or boosting with the protein in adjuvant. Conversely the priming may be with the viral vector or with a protein formulation typically a

WO 02/070711

PCT/GB02/00900

22

protein formulated in adjuvant and the boost with a DNA vaccine of the present invention.

For the treatment of self-antigen, for example IL-13, mediated disease it is preferred that the adjuvant is a preferable inducer of a TH-1 response. In particular, the adjuvant comprises an immunostimulatory CpG oligonucleotide, such as disclosed in (WO96102555). Typical immunostimulatory oligonucleotides will be between 8-100 bases in length and comprises the general formula X_1 CpGX₂ where X₁ and X₂ are nucleotide bases, and the C and G are unmethylated.

The preferred oligonucleotides for use in adjuvants or vaccines of the present invention preferably contain two or more dinucleotide CpG motifs preferably separated by at least three, more preferably at least six or more nucleotides. The oligonucleotides of the present invention are typically deoxynucleotides. In a preferred embodiment the internucleotide in the oligonucleotide is phosphorodithioate, or more preferably a phosphorothioate bond, although phosphodiester and other internucleotide bonds are within the scope of the invention including oligonucleotides with mixed internucleotide linkages. e.g. mixed phosphorothioate/phosphodiesters. Other internucleotide bonds which stabilise the oligonucleotide may be used. Methods for producing phosphorothioate oligonucleotides or phosphorodithioate are described in US5,666,153, US5,278,302 and WO95/26204.

Examples of preferred oligonucleotides have the following sequences. The sequences preferably contain phosphorothioate modified internucleotide linkages.

OLIGO 1: TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT (CpG 1826) (SEQ ID NO 5)

OLIGO 2: TCT CCC AGC GTG CGC CAT (CpG 1758) (SEQ ID NO 6)

OLIGO 3: ACC GAT GAC GTC GCC GGT GAC GGC ACC ACG (SEQ ID NO 7)

OLIGO 4: TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT (CpG 2006) (SEQ ID NO 8)

OLIGO 5: TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT (CpG 1668) (SEQ ID NO 9)

WO 02/070711

PCT/GB02/00900

23

Alternative CpG oligonucleotides may comprise the preferred sequences above in that they have inconsequential deletions or additions thereto.

The CpG oligonucleotides utilised in the present invention may be synthesized by any method known in the art (eg EP 468520). Conveniently, such oligonucleotides
5 may be synthesized utilising an automated synthesizer. An adjuvant formulation containing CpG oligonucleotide can be purchased from Qiagen under the trade name "ImmunEasy".

The compositions of the present invention may be used for both prophylaxis and
10 therapy. The present invention provides a polypeptide or a polynucleotide according to the invention for use in medicine. The invention further provides the use of a polypeptide or a polynucleotide of the invention in the manufacture of a medicament for the treatment of allergies, respiratory ailments such as asthma and COPD, helminth-infection related disorders, fibrosis or cirrhosis of the liver.

15 The present invention also provides a method of vaccinating which comprises administering an effective amount of a vaccine composition of the invention to a patient and provoking an immune response to the vaccine composition.

20 The present invention also provides vaccine compositions as described herein for use in vaccination of a mammal against IL-13 mediated disorders such as allergies, respiratory ailments, helminth-infection related disorders, fibrosis and cirrhosis of the liver. Respiratory ailments include, for example, asthma, such as allergic asthma, and chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Specifically, a vaccine
25 composition capable of directing a neutralising response to IL-13 would therefore constitute a useful therapeutic for the treatment of asthma, particularly allergic asthma, in humans. It would also have application in the treatment of certain helminth infection-related disorders (Brombacher, 2000 *Bioessays* 22:646-656) and diseases where IL-13 production is implicated in fibrosis (Chiaromonte et al, 1999, *J*
30 *Clin Inv* 104:777-785), such as chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and cirrhosis of the liver.

WO 02/070711

PCT/GB02/00900

24

The vaccine compositions of the invention may be administered in a variety of manners for example via the mucosal, such as oral and nasal; pulmonary, intramuscular, subcutaneous or intradermal routes. Where the antigen is to be administered as a protein based vaccine, the vaccine will typically be formulated with an adjuvant and may be lyophilised and resuspended in water for injection prior to use. Such compositions may be administered to an individual as an injectable composition, for example as a sterile aqueous dispersion, preferably isotonic. Typically such compositions will be administered intra muscularly, but other routes of administration are possible.

One technique for intradermally administration involves particle bombardment (which is also known as 'gene gun' technology and is described in US Patent No. 5371015). Proteins may be formulated with sugars to form small particles or DNA encoding the antigen may be coated on to inert particles (such as gold beads) and are accelerated at speeds sufficient to enable them to penetrate a surface of a recipient (e.g. skin), for example by means of discharge under high pressure from a projecting device. (Particles coated with nucleic acid vaccine constructs of the invention and protein sugar particles are within the scope of the present invention, as are devices loaded with such particles.) Other methods of administering the nucleic acid constructs or compositions containing said constructs directly to a recipient include ultrasound, electrical stimulation, electroporation and microseeding which is described in US-5,697,901.

A nucleic acid construct of the present invention may also be administered by means of specialised delivery vectors useful in gene therapy. Gene therapy approaches are discussed for example by Verme *et al*, Nature 1997, 389:239-242. Both viral and non-viral systems can be used. Viral based systems include retroviral, lentiviral, adenoviral, adeno-associated viral, herpes viral and vaccinia-viral based systems. Non-viral based systems include direct administration of nucleic acids and liposome-based systems. For example, the vectors may be encapsulated by liposomes or within polylactide co-glycolide (PLG) particles.

WO 02/070711

PCT/GB02/00900

25

A nucleic acid construct of the present invention may also be administered by means of transformed host cells. Such cells include cells harvested from a subject. The nucleic acid vaccine construct can be introduced into such cells *in vitro* and the transformed cells can later be returned to the subject. The nucleic acid construct of
5 the invention may integrate into nucleic acid already present in a cell by homologous recombination events. A transformed cell may, if desired, be grown up *in vitro* and one or more of the resultant cells may be used in the present invention. Cells can be provided at an appropriate site in a patient by known surgical or microsurgical techniques (e.g. grafting, micro-injection, etc.). Suitable cells include dendritic cells.

10

The amount of vaccine composition which is delivered will vary significantly, depending upon the species and weight of mammal being immunised, the nature of the disease state being treated/protected against, the vaccination protocol adopted (i.e. single administration versus repeated doses), the route of administration and the
15 potency and dose of the adjuvant compound chosen. Based upon these variables, a medical or veterinary practitioner will readily be able to determine the appropriate dosage level but it may be, for example, when the vaccine is a nucleic acid that the dose will be 0.5-5 μ g/kg of the nucleic acid constructs or composition containing them. In particular, the dose will vary depending on the route of administration. For
20 example, when using intradermal administration on gold beads, the total dosage will preferably be between 1 μ g – 10ng, particularly preferably, the total dosage will be between 10 μ g and 1ng. When the nucleic acid construct is administered directly, the total dosage is generally higher, for example between 50 μ g and 1 or more milligram. The above dosages are exemplary of the average case.

25

In a protein vaccine, the amount of protein in each vaccine dose is selected as an amount which induces an immunoprotective response without significant, adverse side effects in typical vaccinees. Such amount will vary depending upon which specific immunogen is employed and how it is presented. Generally, it is expected
30 that each dose will comprise 1-1000 μ g of protein, preferably 1-500 μ g, preferably 1-

WO 02/070711

PCT/GB02/00900

26

100µg, most preferably 1 to 50µg. An optimal amount for a particular vaccine can be ascertained by standard studies involving observation of appropriate immune responses in vaccinated subjects. Following an initial vaccination, subjects may receive one or several booster immunisation adequately spaced. Such a vaccine
5 formulation may be either a priming or boosting vaccination regime; be administered systemically, for example via the transdermal, subcutaneous or intramuscular routes or applied to a mucosal surface via, for example, intra nasal or oral routes.

There can, of course, be individual instances where higher or lower dosage ranges
10 are merited, and such are within the scope of this invention.

It is possible for the vaccine composition to be administered on a once off basis or to be administered repeatedly, for example, between 1 and 7 times, preferably between 1 and 4 times, at intervals between about 1 day and about 18 months, preferably
15 one month. This may be optionally followed by dosing at regular intervals of between 1 and 12 months for a period up to the remainder of the patient's life. In an embodiment the patient will receive the antigen in different forms in a prime boost regime. Thus for example an antigen will be first administered as a DNA based vaccine and then subsequently administered as a protein adjuvant base formulation.
20 Once again, however, this treatment regime will be significantly varied depending upon the size and species of animal concerned, the amount of nucleic acid vaccine and / or protein composition administered, the route of administration, the potency and dose of any adjuvant compounds used and other factors which would be apparent to a skilled veterinary or medical practitioner.

25

The following example illustrates the theory of the invention in mice rather than in humans, so that the protein is murine with mutations characteristic of human protein, but the results can readily be extrapolated to treatment of humans where the protein will have B cell epitopes from Human with mutations characteristic of a mouse, or
30 other analogous protein.

WO 02/070711

PCT/GB02/00900

27

Throughout the following examples of the invention, use is made of various widely known and practised techniques in molecular and cellular biology. Practical details of these may be found in a number of textbooks including Sambrook et al (1989, 2nd edition. Cold Spring Harbor Press: New York). Amino acid sequences or
5 designations may be given in either the one letter code, or the three letter code. The prefix 'h' is used to denote a protein or gene of human origin, 'm', murine origin and 'c', a chimaeric construct. 'r' is used to indicate a recombinant protein.

Examples

10

1. Design of a vaccine against murine IL-13

IL-13 belongs to the SCOP (Murzin et al, 1995, *J Mol Biol* 247:536-540) defined 4-helical cytokines fold family. Individual members of this fold superfamily are related
15 structurally, but are difficult to align at the sequence level. The 3D structure of IL-13 has not yet been determined, but structures have been generated for a number of other 4-helical cytokines. Protein multiple sequence alignments were generated for IL-13 orthologues, and also for a number of other cytokines exhibiting this fold where the structure of at least one member had been determined (IL-4, GM-CSF, IL-5 and
20 IL-2). Secondary structure predictions were performed for the IL-13 protein multiple sequence alignment using DSC (King and Sternberg, 1996, *Prot Sci* 5:2298-2310), SIMPA96 (Levin, 1997, *Prot Eng* 7:771-776) and Pred2ary (Chandonia and Karplus, 1995, *Prot Sci* 4:275-285). The individual cytokine protein multiple sequence alignments were aligned to each other, using both the sequence information and the
25 structural information (from the known crystal structures and from the secondary structure prediction).

Antigenic sites, specifically B-cell epitopes, were predicted for murine IL-13 using the Cameleon software (Oxford Molecular), and these were mapped onto the IL-4
30 structure (accession number 1RCB in the Brookhaven database) using the protein multiple sequence alignment to give an idea of where they might be located

WO 02/070711

PCT/GB02/00900

28

structurally on IL-13. From this analysis, exposed regions which were potentially both antigenic and involved in receptor binding were selected.

From this model, a chimaeric IL-13 sequence was designed in which the sequence of the predicted antigenic loops was taken from murine IL-13, and the sequence of the predicted structural (predominantly helical) regions was taken from human IL-13. The purpose of this design was to identify target epitopes from murine IL-13 against which neutralising antibodies might be raised, and to present them on a framework which was structurally similar to the native protein, but yet contained sufficient sequence variation to the native (murine) protein to ensure that one or more CD4 T helper epitopes would be present. The nucleic acid and protein sequences selected for this example of a chimaeric IL-13 vaccine are shown in Figure 1 (SEQ ID NO 19 and 20). The underlined sequences correspond to sequences found in the human orthologue. Twelve amino acids were substituted to achieve the sequence in figure 1. It should be understood that the degeneracy of the genetic code allows many possible nucleic acid sequences to encode identical proteins. Furthermore, it will be appreciated that there are other possible chimaeric IL-13 vaccine designs within the scope of the invention, that have other orthologous mutations in non-exposed areas.

1.2 Preparation of chimaeric IL-13

Chimaeric IL-13 (cIL-13) DNA sequence was synthesised from a series of partially overlapping DNA oligonucleotides, with the sequences cIL-13-1 to cIL-13-6 shown in Table 1. These oligos were annealed, and cIL-13 DNA generated by a PCR with the cycle specification of 94°C for 1 minute followed by 25 cycles of 94°C for 30 seconds, 55°C for 1 minute and 72°C for 2 minutes. Followed by 72°C for 7 minutes and cooling to 4°C when finished. The reaction product comprised a band of the expected size, 361 base pairs, which was subcloned into the T/A cloning vector pCR2.1 (Invitrogen, Groningen, Netherlands) to generate pCR2.1-cIL-13. A BamH1 and Xho1 cIL-13 digested fragment from pCR2.1-cIL-13 was then subcloned into the BamH1 and Xho1 sites in pGEX4T3 (Amersham Pharmacia, Amersham, Bucks, UK)

WO 02/070711

PCT/GB02/00900

29

generating pGEX4T3-cIL-13/1. On sequencing the pGEX4T3-cIL-13/1 construct we discovered an extra 39 base pairs of DNA sequence (derived from the pCR2.1 vector) between the sequence for GST and cIL-13. To correct this, we repeated the PCR for cIL-13 using pGEX4T3-cIL-13/1 and primers cIL-13Fnew and cIL-13R. The PCR product obtained was then cloned back into pGEX4T3 using BamH1 and Xho1 restriction sites, to generate the expression vector pGEX4T3-cIL-13. The sequence of this construct was verified by dideoxy terminator sequencing. This vector encodes a genetic fusion protein consisting of glutathione-S-transferase and cIL-13 (GST-cIL-13). The two moieties of the protein are linked by a short spacer which contains the recognition site for thrombin. The fusion protein may be readily purified by glutathione sepharose affinity chromatography, and then used directly, or a preparation of free cIL-13 produced by cleavage with thrombin.

Table 1. Oligonucleotides used to construct chimaeric IL-13.

15

Oligo	Sequence (5'-3')
cIL-13-1R (SEQ ID NO 10)	TGTGATGTTGACCAGCTCCTCAATGAGCTCCCTAAGGG TCAGAGGGAGAGACACAGATCTTGGCACC GGCCC
cIL-13-2F (SEQ ID NO 11)	AGGAGCTGGTCAACATCACACAAGACCAGACTCCCCT GTGCAACGGCAGCATGGTATGGAGTGTGGACCTGGC
cIL-13-3R (SEQ ID NO 12)	GCAATTGGAGATGTTGGTCAGGGATTCCAGGGCTGCA CAGTACCCGCCAGCGGCCAGGTCCACACTCCATAC
cIL-13-4F (SEQ ID NO 13)	TGACCAACATCTCCAATTGCAATGCCATCGAGAAGACC CAGAGGATGCTGGGCGGACTCTGTAACCGCAAGGC
cIL-13-5R (SEQ ID NO 14)	AAACTGGGCCACCTCGATTTTGGTATCGGGGAGGCTG GAGACCGTAGTGGGGCCCTTGCCGTTACAGAGTCC
cIL-13-6F (SEQ ID NO 15)	AAATCGAGGTGGCCCAGTTTGTAAAGGACCTGCTCAG CTACACAAAGCAACTGTTTCGCCACGGCCCTTC
cIL-13F (SEQ ID NO 16)	CGCGGATTCGGGCCGGTGCCAAGATCTG
cIL-13R	CTCCGCTCGAGTCGACTTAGAAGGGCCCGTGGCGAAA

WO 02/070711

PCT/GB02/00900

30

(SEQ ID NO 17)	
cIL-13Fnew	CGCGGATCCGGGCCGGTGCCAAGATCTG
(SEQ ID NO 18)	

The pGEX4T3-cIL-13 expression vector was transformed into E.coli BLR strain (Novagen, supplied by Cambridge Bioscience, Cambridge, UK). Expression of GST-cIL-13 was induced by adding 0.5 mM IPTG to a culture in the logarithmic growth phase for 4hrs at 37°C. The bacteria were then harvested by centrifugation and GST-cIL-13 purified from them by a method previously described for purification of a similar GST-human IL-13 fusion protein (McKenzie et al, 1993, *Proc Natl Acad Sci* 90:3735-3739).

10 Characterisation of cIL-13 properties

Samples of purified GST-cIL-13 were analysed by SDS-PAGE electrophoresis.

Figure 2 shows that the purified preparation contains a protein of the expected size for GST-cIL-13. The lower band represents a small quantity of GST, arising due to partial cleavage of the fusion protein during preparation.

To confirm that the purified protein was GST-cIL-13, samples were separated by SDS-PAGE, blotted onto PVDF membrane and then analysed for the presence of IL-13 and GST immunoreactivity by Western blotting. Since cIL-13 contains sequence arising from both human and murine IL-13, it was expected that it would be recognised by specific antisera directed at human IL-13 or mouse IL-13. Blots were blocked with 3% bovine serum albumin (BSA) in TBS (50mM trizma hydrochloride, 138mM sodium chloride, 2.7mM potassium chloride, pH8.0) containing 0.05% Tween-20 (TBST) overnight at 4°C, incubated with primary antibody for 1 hour at room temperature (RT) with shaking then washed 4 times with TBST. Secondary antibody was added for 1 hour at RT with shaking, prior to washing 4 times and developing with SuperSignal Chemiluminescent Reagent (Pierce, Rockford, Illinois, USA).

WO 02/070711

PCT/GB02/00900

31

Figure 3 (legend below) illustrates the results of this analysis, which indicate that the purified protein is recognised by antibodies to human IL-13, mouse IL-13 and GST, so confirming the expected structure.

Lane	Sample	Primary Antibody
1	GST-clL-13	Anti-mIL-13
2	rhIL-13	Anti-mIL-13
3	rmIL-13	Anti-mIL-13
4	Markers	-
5	GST-clL-13	Anti-hIL-13
6	rhIL-13	Anti-hIL-13
7	rmIL-13	Anti-hIL-13
8	Markers	-
9	GST-clL-13	Anti-GST
10	rhIL-13	Anti-GST
11	rmIL-13	Anti-GST
12	GST	Anti-GST

5

The primary antibodies used in this experiment were: anti-hIL-13, catalogue number AF-213-NA, R&D Systems, Abingdon, Oxford, UK, used at 1µg/ml; anti-mIL-13, catalogue number AF-413-NA, R&D Systems, used at 1µg/ml and anti-GST, catalogue number 27-4590D, Pharmacia, used at 1/200. The secondary antibodies used in this experiment were: HRP-conjugated anti-goat IgG, catalogue number A-5420, Sigma-Aldrich Company Ltd, Poole, Dorset, UK, used at 1/40,000.

The protein samples were GST-clL-13, prepared as described in Example 2, recombinant human IL-13 (rhIL-13), catalogue number CH1-013, Cambridge Bioscience, Cambridge, UK, recombinant mouse IL-13 (rmIL-13) catalogue number 413-ML-025, R&D Systems, and GST, prepared from E.coli transfected with empty

15

WO 02/070711

PCT/GB02/00900

32

pGEX4T3 vector as described (Sambrook et al, 1989, 2nd edition. Cold Spring Harbor Press: New York).

1.3 Conformation of Chimaeric IL-13

5

To confirm that GST-cIL-13 adopts a similar conformation in solution to that of native IL-13, samples of GST-cIL-13 and cIL-13 (generated from GST-cIL-13 by thrombin cleavage) were analysed by ELISA. 96-well Maxisorp plates (Life Technologies Ltd, Paisley, UK) were coated with cIL-13, GST-cIL-13, mL-13, hIL-13 or gst in carbonate-bicarbonate buffer, overnight at 4^oC. Plates were then blocked with 3% BSA/TBST for 1 hour at RT, washed 3 times in TBST, incubated with primary antibody for 1 hour at RT then washed 3 times in TBST. Secondary antibody was added for 1 hour, washed 3 times in TBST, then developed with 0-phenylenediamine dihydrochloride peroxidase substrate (OPD, Sigma Aldrich) for 30 minutes. The primary and secondary antibodies used in this experiment were as described above. As shown in Figure 4, GST-cIL-3 and cIL-13 were specifically recognised by antibodies to human IL-13 and mouse IL-13. These data confirm that the chimaerisation process has not grossly altered the protein confirmation.

20 1.4 Binding of Chimaeric IL-13 to receptors

ELISAs were set up to determine whether cIL-13 could bind to either of the known mouse IL-13 receptors (mIL-13R1 or mIL-13R2). 96-well Maxisorp plates were coated with anti-human IgG (catalogue number I-3382, Sigma Aldrich) in carbonate-bicarbonate buffer overnight at 4^oC. Plates were then blocked with 3% BSA/TBST for 1 hour at RT, washed 3 times in TBST, and incubated with mIL-13R1-Fc or mIL-13R2-Fc (catalogue numbers 491-IR-200 and 539-IR-100 respectively, R+D Systems) for 1 hour at RT. After washing, plates were incubated with dilutions of mIL-13 or cIL-13 or GST-cIL-13 for 1 hour at RT, washed again and incubated with biotinylated anti-mIL-13 (catalogue number BAF413, R+D Systems). Following further washing and incubation with streptavidin conjugated horse-radish peroxidase,

WO 02/070711

PCT/GB02/00900

33

the plates were developed with 0-phenylenediamine dihydrochloride peroxidase substrate for 30 minutes. As shown in Figure 5, cIL-13 and GST-cIL-13 are both able to bind to either of the mL-13 receptors. Again, these data confirm that the chimaerisation process has not grossly altered the protein confirmation.

5

1.5 Bioactivity of Chimaeric IL-13

The bioactivity of GST-cIL-13 was assessed by the ability of this protein to phosphorylate STAT6 in the human lung fibroblast cell line A549. These cells
10 express the human type-2 IL-4 receptor that is responsive to both IL-4 and IL-13. Stimulation of these cells with hIL-4, hIL-13 or mL-13 induces phosphorylation of the signalling protein STAT6. 5×10^5 A549 cells were plated into 60mm tissue culture dishes (Life Technologies) in RPMI (Life Technologies) and grown to 70% confluence. Cells were then incubated with between 2 and 150ng/ml cytokine or
15 purified cIL-13 for 15 mins at 37°C. Because the presence of a GST fusion partner may alter the bioactivity of cytokines, the chimaeric IL-13 was assayed as both GST-cIL-13 fusion protein, and free cIL-13 liberated from the fusion by thrombin cleavage. By way of control, mL-13 and GST were also tested. Cell lysates were then prepared and analysed by Western blot for the presence of phospho-STAT6 using
20 rabbit anti-phospho-STAT6 polyclonal antibody (NEB, Hitchin, Herts, UK. Catalogue number 9361S). Blots were blocked overnight in 5% BSA / TBST (BSA must be A-7906 from Sigma as primary antibody is phospho-specific, 0.1% Tween-20), primary antibody was added at 1/1000 for 1 hour at RT then washed 3 times with TBST. Anti-rabbit HRP conjugated secondary antibody (A-4914, Sigma Aldrich) was added at
25 1/5000 for 1 hour at RT then washed 4 times with TBST prior to developing with the HRP chemiluminescent substrate ECL Reagent (Amersham Pharmacia). The results of this experiment are shown in Figure 6.

Each lane was loaded with the following protein:

30

Lane	Lysates of A549 cells treated with...
------	---------------------------------------

WO 02/070711

PCT/GB02/00900

34

1	50ng/ml rmlL-13 (R&D Systems)
2	10ng/ml rmlL-13 (R&D Systems)
3	2ng/ml rmlL-13 (R&D Systems)
4	50ng/ml cIL-13
5	10ng/ml cIL-13
6	2ng/ml cIL-13
7	150ng/ml GST-cIL-13
8	30ng/ml GST-cIL-13
9	6ng/ml GST-cIL-13
10	No treatment
11	1µg/ml GST
12	0.25µg/ml GST
13	Molecular weight markers

Recombinant protein reagents were as described in Figure 3.

Treatment of A549 cells with 50 or 10ng/ml (but not 2ng/ml) rmlL-13 induced the phosphorylation of STAT6, indicating bioactivity. Treatment of A549 cells with 50ng/ml (but not 10 or 2ng/ml) cIL-13 induced the phosphorylation of STAT6, indicating bioactivity. Similarly, 150ng/ml GST-cIL-13 (which is approximately equivalent in molar terms to 50ng/ml cIL-13) is bioactive, whereas 30 and 6ng/ml are not. CIL-13 is therefore an agonist at this receptor, but under these experimental conditions is approximately 5 fold less bioactive than rmlL-13.

1.6 Immunisation with cIL-13

cIL-13 and GST-cIL-13 were then used as immunogens to induce the formation of auto-antibodies against mouse IL-13 in Balb/c mice. Female mice aged 6-8 weeks were given one subcutaneous (sc) injection of approximately 30µg protein in complete Freund's adjuvant (CFA) at the base of the tail. This was followed by three

WO 02/070711

PCT/GB02/00900

35

booster immunisations at the same site, each consisting of approximately 10µg protein in incomplete Freund's adjuvant [IFA] for boosts. Each treatment group contained 5 animals, and they were immunised according to the protocol in Table 2.

5 Table 2

Group	Immunisation
A	Saline control in CFA/IFA s/c
B	30/10µg GST in CFA/IFA s/c
C	Non immunised naïve mice
D	30/10µg GST-hIL-13 in CFA/IFA s/c
E	30/10µg cIL-13 in CFA/IFA s/c
F	30/10µg GST-cIL-13 in CFA/IFA s/c

Day	Treatment
-12	Pre-bleed
0	Primary immunisation
14	1 st Boost Immunisation
27	Tail bleed
42	Tail bleed
49	2 nd Boost Immunisation
70	Tail bleed
97	Tail bleed
99	3 rd Boost Immunisation
113	Tail bleed
140	Tail bleed

Serum samples were obtained by venepuncture of the tail vein at the timepoints specified in Table 2. After clarification by centrifugation, the samples were assayed
 10 by ELISA for the presence of specific IgG responses to mouse IL-13, human IL-13 and GST. None of the animals in groups A-D possessed anti-mouse IL-13 antibodies

WO 02/070711

PCT/GB02/00900

36

at any time point. All of the animals in groups B, D and F made a strong IgG response to GST (group E animals also made strong antibody responses to GST, because there was GST remaining in the cIL-13 sample used to immunise these mice). Anti-mouse IL-13 antibody responses were induced in five out of five animals in group F and four out of five animals in group E. Figure 7 (a and b) shows the serological analysis for one of these animals in group F and one of these animals from group E 7b (gst – cIL-13 immunised and cIL-13 immunised respectively). The results indicate that immunisation with GST-cIL-13 or cIL-13 was able to break tolerance to mIL-13, generating mouse anti-mIL-13 antibodies.

Sera from two mice (F1d70 and F5d97) that had strong anti-mIL-13 IgG responses, were tested for the capacity to neutralise the bioactivity of rmlL-13 in the A549/phospho-STAT6 assay. 20ng/ml or 10ng/ml rmlL-13 (R&D Systems) were incubated with 1% sera in serum free RPMI tissue culture media for 15 minutes at room temperature prior to a 15 minute incubation at 37°C with A549 cells. Cell lysates were prepared and analysed by Western blot for the presence of phospho-STAT6 as previously described above. As a negative control, anti-hIL-13 serum was obtained from a Balb/c mouse immunised with GST-hIL-13 and shown by ELISA to have a strong anti-hIL-13 IgG response, but no anti-mIL-13 antibodies. As a positive control, normal mouse serum was spiked with a neutralising anti-mIL-13 antibody (R&D Systems, catalogue number AF-413-NA) to give a final concentration of 1 µg/ml.

The results of this experiment are shown in Figure 8, in which the following was tested:

Lane	Cytokine	Antibody
1	20 ng/ml rmlL-13	Normal mouse serum
2	10 ng/ml rmlL-13	Normal mouse serum
3	0 ng/ml rmlL-13	Normal mouse serum

WO 02/070711

PCT/GB02/00900

37

4	20 ng/ml rmlL-13	Serum sample F1d70
5	10 ng/ml rmlL-13	Serum sample F1d70
6	0 ng/ml rmlL-13	Serum sample F1d70
7	20 ng/ml rmlL-13	Anti-hiL-13 mouse serum
8	10 ng/ml rmlL-13	Anti-hiL-13 mouse serum
9	0 ng/ml rmlL-13	Anti-hiL-13 mouse serum
10	Molecular weight markers	-
11	0 ng/ml rmlL-13	Normal mouse serum + anti-miL-13
12	20 ng/ml rmlL-13	Serum sample F5d97
13	10 ng/ml rmlL-13	Serum sample F5d97
14	0 ng/ml rmlL-13	Serum sample F5d97
15	20 ng/ml rmlL-13	Normal mouse serum + anti-miL-13
16	10 ng/ml rmlL-13	Normal mouse serum + anti-miL-13

Immunisation with a chimaeric IL-13 immunogen of the invention induces the production of auto-antibodies against mouse IL-13, capable of neutralising the biological activity of the mouse IL-13 (lanes 4, 5, 12, 13), in a fashion comparable to
 5 exogenously added anti-murine IL-13 antibody (lanes 15, 16). This activity is not present in normal mouse serum (lanes 1,2), nor in serum from animals immunised with GST-hiL-13 (lanes 7, 8).

These data provide a basis for treating mammals with an IL-13 dependent pathology
 10 by vaccinating them with cIL-13, and so inducing an endogenous neutralising antibody activity.

1.7 Alternative Constructs

15 1.7.1 6 his tagged cIL-13 design.

GST-cIL-13 is bacterially produced protein is insoluble and requires solubilisation and refolding *in vitro*. Size exclusion chromatography indicates that the refolding

WO 02/070711

PCT/GB02/00900

38

process generates several differentially folded forms, which suggest that a proportion of the immune response is being directed against forms that may be generating irrelevant antibodies that do not bind native mouse IL-13.

5 Therefore this candidate may not be generating the most potent neutralising anti-mouse IL-13 antibody responses possible.

For this reason 6 his-cIL-13 has been cloned into a mammalian expression vector, mammalian expressed 6 his-cIL-13 is soluble and does not require refolding *in vitro*.

10

1.7.2 Figure 12 (SEQ ID NO 23 and 24) shows a vaccine antigen where different analogous mutations are made. Protein sequence numbering according to a scheme where the glycine residue in the sequence "GPVPR" is residue 1. Single underlined sequences correspond to the predicted helical regions from the revised structural model. Double underlined bold residues indicate points at which mutations are incorporated into the mouse sequence:

11 mouse Leu changed to Val (rat)
21 mouse Ser changed to Thr (non-orthologous)
20 63 mouse Tyr changed to Phe (non-orthologous)
71 mouse Gly changed to Ala (dog/pig/cow)
100 mouse Ser changed to Thr (dog)
104 mouse Gln changed to Asn (non-orthologous)
108 mouse His changed to Arg (non-orthologous)

25

1.8 Application to human therapy

Figure 9 shows one possible vaccine antigen according to the invention directed at the production of anti-human IL-13 antibodies in humans. This will be useful for the treatment of diseases characterised by excessive or inappropriate IL-13, for example asthma. The sequence corresponding to mouse IL-13 are underlined. The

30

WO 02/070711

PCT/GB02/00900

39

construct contains twelve amino-acid substitutes that are analogous to murine IL-13.

These are:

	R	→	K	at	position	30
	V	→	S	at	position	37
5	Y	→	F	at	position	63
	A	→	V	at	position	65
	E	→	D	at	position	68
	E	→	Y	at	position	80
	K	→	R	at	position	81
10	M	→	I	at	position	85
	G	→	H	at	position	87
	Q	→	H	at	position	113
	V	→	I	at	position	115
	D	→	K	at	position	117

15

Figure 13 (SEQ ID NO 25) shows one possible vaccine for human use based on Chimaeric IL-4. It is an Example of a chimearic human IL-4 vaccine protein.

Underlined amino-acid residues comprise the alpha-helical structural regions and are derived from mouse IL-4 with the inclusion of amino acid 21 into the first helix.

20 Plain symbols indicate amino-acid residues derived from human IL-4. Positions of the alpha-helical regions are taken from Zuegg, J et al (2001) Immunol and Cell Biol 79:332-339.

Example 2: Immune response to gst-cIL-13 is specific for mouse IL-13 and

25 **does not cross react with mouse IL-4.**

As mouse IL-13 is structurally similar to mouse IL-4, sera from a GST-cIL-13 immunised mouse (that had been shown to contain high titre anti-mouse IL-13 autoantibodies) was analysed for cross-reactivity to mouse IL-4 using an anti-mouse

30 IL-4 ELISA and an *in vitro* mIL-4 neutralisation bioassay.

WO 02/070711

PCT/GB02/00900

40

2.1 Anti-mouse IL-4 ELISA.

96-well Maxisorp plates were coated with anti-mouse IL-4 monoclonal antibody (Cat. No. MAB404, R+D Systems) in carbonate-bicarbonate buffer overnight at 4°C.

5 Plates were then blocked with 3% BSA/TBST for 1 hour at RT, washed 3 times in TBST, and incubated with mouse IL-4 (Cat. No. 404-ML-005, R+D Systems) for 1 hour at RT. After washing, plates were incubated with mouse sera for 1 hour at RT, washed again and incubated with HRP conjugated anti-mouse IgG polyclonal antibody (Cat. No. A-9309, SIGMA). Following further washing, the plates were
10 developed with 0-phenylenediamine dihydrochloride peroxidase substrate for 30 minutes.

The level of anti-mouse IL-4 antibodies in the serum was expressed as an endpoint titre. The endpoint titre is defined as that dilution of serum that is equivalent to twice
15 the ELISA background reading.

Mouse	Anti-mouse IL-4 antibody endpoint titre	Anti-mouse IL-13 antibody endpoint titre
C2 (serum sample taken at day 125, post 4 x GST-cIL-13 vaccine doses)	1/900	1/80000

A very low level of mouse IL-4 cross-reactivity was detected in this serum sample. In contrast, a much higher anti-mouse IL-13 antibody endpoint titre was previously
20 determined in this serum sample, using an anti-mouse IL-13 antibody ELISA. The level of mouse IL-4 cross-reactivity determined by this ELISA, would not be expected to have mouse IL-4 neutralising effects *in vivo*. This serum sample was assessed for mouse IL-4 neutralisation capacity in an *in vitro* mouse IL-4 bioassay.

25

WO 02/070711

PCT/GB02/00900

41

2.2 In vitro mouse IL-4 neutralisation bioassay.

Mouse IL-4 stimulates the proliferation of CTLL cells *in vitro*. An assay was therefore developed in these cells, to assess the mouse IL-4 neutralisation capacity of serum
5 from this GST-cIL-13 vaccinated mouse.

To measure the ability of mouse serum to neutralise the bioactivity of recombinant mouse IL-4 on mouse CTLL cells (Cat. No. 87031904, ECACC), 3ng/ml recombinant mouse IL-4 was incubated with various concentrations of sera for 1 hour at 37°C in a
10 96-well tissue culture plate (Invitrogen). Following this pre-incubation period, CTLL cells were added. The assay mixture, containing various serum dilutions, recombinant mouse IL-4 and CTLL cells, was incubated at 37°C for 70 hours in a humidified CO₂ incubator. MTT substrate (Cat. No. G4000, Promega) was added during the final 4 hours of incubation, after which the reaction was stopped with an
15 acid solution to solubilise the metabolised blue formazan product. The absorbance of the solution in each well was read in a 96-well plate reader at 570nm wavelength.

Note that this assay is only able to measure mouse IL-4 neutralisation capacity in serum dilutions greater than or equivalent to 1/100. Serum dilutions less than 1/100
20 induce non-specific proliferative effects in CTLL cells.

The capacity of the serum to neutralise mouse IL-4 bioactivity was expressed as, that dilution of serum required to neutralise the bioactivity of a defined amount of mouse IL-4 by 50% (= ND₅₀). The more dilute serum sample required, the more
25 potent the neutralisation capacity.

The highest concentration of mouse C2 serum tested was a 1/100 dilution. This did not neutralise the bioactivity of 3ng/ml mouse IL-4 by 50%, therefore the ND₅₀ is expressed as < 1/100 dilution.

30

WO 02/070711

PCT/GB02/00900

42

Mouse	Mouse IL-4 neutralisation capacity (ND ₅₀)	Mouse IL-13 neutralisation capacity (ND ₅₀)
C2 (serum sample taken at day 125, post 4 x GST- cIL-13 vaccine doses)	<1/100	1/5300

No mouse IL-4 neutralisation capacity was detected in this serum sample at the dilutions of serum tested. In contrast (when assessed for mouse IL-13 neutralisation capacity), this serum sample potentially neutralised mouse IL-13 bioactivity.

These data demonstrate that although a very low level of mouse IL-4 cross-reactivity can be measured in the serum by an anti-mouse IL-4 antibody ELISA, there is no associated mouse IL-4 neutralisation capacity.

10

2.3 New mouse IL-13 neutralisation bioassay to assess the mouse IL-13 neutralisation capacity of mouse serum samples.

Previous GST-cIL-13 bioactivity and mouse IL-13 neutralisation capacity data were generated using a STAT-6 phosphorylation readout in A549 cells. This assay was cumbersome and not easily amenable for the generation of quantitative data. Mouse IL-13 stimulates the proliferation of TF-1 cells *in vitro*. An assay was therefore developed in these cells to assess the mouse IL-13 neutralisation capacity of serum from GST-cIL-13 vaccinated mice.

20

2.4 In vitro mouse IL-13 neutralisation bioassay.

To measure the ability of mouse serum to neutralise the bioactivity of recombinant mouse IL-13 on human TF-1 cells (obtained in-house), 5ng/ml recombinant mouse IL-13 was incubated with various concentrations of sera for 1 hour at 37°C in a 96-well tissue culture plate (Invitrogen). Following this pre-incubation period, TF-1 cells were added. The assay mixture, containing various serum dilutions, recombinant

WO 02/070711

PCT/GB02/00900

43

mouse IL-13 and TF-1 cells, was incubated at 37°C for 70 hours in a humidified CO₂ incubator. MTT substrate (Cat. No. G4000, Promega) was added during the final 4 hours of incubation, after which the reaction was stopped with an acid solution to solubilise the metabolised blue formazan product. The absorbance of the solution in 5 each well was read in a 96-well plate reader at 570nm wavelength.

Note that this assay is only able to measure mouse IL-13 neutralisation capacity in serum dilutions greater than or equivalent to 1/100. Serum dilutions less than 1/100 induce non-specific proliferative effects in TF-1 cells.

- 10 The capacity of the serum to neutralise mouse IL-13 bioactivity was expressed as, that dilution of serum required to neutralise the bioactivity of a defined amount of mouse IL-13 by 50% (= ND₅₀). The more dilute serum sample required, the more potent the neutralisation capacity.
- 15 The mouse IL-13 neutralisation capacity of serum from GST-cIL-13 immunised mice was measured by the above method. Potent IL-13 neutralising responses were generated, as indicated below.

Mouse (Serum samples taken at day 125, post 4 x GST-cIL-13 vaccine doses)	Mouse IL-13 neutralisation capacity (ND ₅₀)
C1	1/1250
C2	1/5230
C3	1/523
C4	1/417
C5	1/1670

20

2.5 Determination of the level of mouse IL-13 neutralisation required for efficacy in the 'ovalbumin challenge' mouse asthma model.

In order to benchmark the required potency of an IL-13 autovaccine for treatment of asthma, mice were treated with various doses of rabbit anti-mouse IL-13 polyclonal antibody (administered passively by intra-peritoneal injection) during ovalbumin challenge, in the 'ovalbumin challenge' mouse asthma model. Model parameters such as airway hyper-responsiveness (AHR), goblet cell metaplasia (GCM) and lung inflammatory cell content were measured at the end of this experiment. Efficacy in this model was correlated to the levels of mouse IL-13 neutralisation achieved in mouse serum. The mouse IL-13 neutralisation bioassay was used to determine the level of mouse IL-13 neutralisation in serum samples.

Treatment group (Dose of passively administered rabbit anti-mouse IL-13 antibody)	Mouse IL-13 neutralisation capacity (ND ₅₀)
Highest dose	1/4100
High dose	1/2670
Mid dose	1/476
Lowest dose	1/207

15

Treatment groups given the highest three doses of antibody all performed similarly. All of these three groups showed efficacy equivalent to (for AHR) or better than (for GCM) the gold standard treatment (dexamethasone, administered by the intraperitoneal route at 3 x 1.5mg/kg) used in this model. The 'lowest dose' of antibody administered, showed efficacy somewhere between that of dexamethasone and the 'no treatment' positive control groups.

Therefore the level of IL-13 neutralisation achieved in the 'mid dose' treatment group, represents the required potency threshold for an IL-13 autovaccine in this

WO 02/070711

PCT/GB02/00900

45

animal model. The potency threshold is defined as the lowest level of IL-13 neutralisation in mouse serum, required to show 100% efficacy in the asthma model (= ED₁₀₀). 1x ED₁₀₀ is therefore equivalent to an ND₅₀ of 1/476.

5 **Significance of defined potency threshold.**

The level of IL-13 neutralisation required for efficacy in the 'ovalbumin challenge' mouse asthma model has been defined above. The levels of IL-13 neutralisation induced by GST-cIL-13 in mice C1-3 and C5, are in excess of the potency threshold
10 required for efficacy in the asthma model. These results are illustrated in figure 11.

Therefore the GST-cIL-13 vaccine would be expected to show efficacy in the mouse asthma model.

15 **Example 3: immunogenicity profile of GST-cIL-13 in combination with various adjuvants.**

3.1 Immunisation protocol.

20 GST-cIL-13 was used as an immunogen to induce the formation of auto-antibodies against mouse IL-13 in Balb/c mice. Female mice aged 6-8 weeks were given one injection of approximately 100µg protein in adjuvant. This was followed by four booster immunisations each consisting of 50µg protein in adjuvant (See below for immunogen + adjuvant formulations). Each treatment group contained 5 animals,
25 immunised according to the protocol in the table below.

Serum samples were obtained by venepuncture of the tail vein at the timepoints specified. After clarification by centrifugation, the samples were assayed by ELISA for the presence of specific IgG responses to mouse IL-13.

30

WO 02/070711

PCT/GB02/00900

46

Group	Immunisation
A	GST-cIL-13 in AS03 i/m
B	GST-cIL-13 in Alum i/p
C	GST-cIL-13 in 'ImmunEasy' i/m
D	GST-cIL-13 in CFA/IFA s/c
E	GST-cIL-13 in PBS s/c
F	No immunisations

Day	Treatment
-7	Pre-bleed
0	Primary immunisation
21	1 st boost immunisation
35	Tail bleed
49	2 nd boost immunisation
63	Tail bleed
77	3 rd boost immunisation
92	Tail bleed
106	4 th boost immunisation
125	Tail bleed

3.2 Immunogen + adjuvant formulation.

5

Preparation of emulsion adjuvant AS03:

Tween 80 is dissolved in phosphate buffered saline (PBS) to give a 2% solution in the PBS. To provide 100 ml two-fold concentrate emulsion 5g of DL alpha
 10 tocopherol and 5ml of squalene are vortexed to mix thoroughly. 90ml of PBS/Tween solution is added and mixed thoroughly. The resulting emulsion is then passed through a syringe and finally microfluidised by using an M110S microfluidics machine. The resulting oil droplets have a size of approximately 180 nm.

WO 02/070711

PCT/GB02/00900

47

Mix adjuvant 1:1 with protein solution, vortex briefly (10 seconds at middle speed) and incubate for 10 minutes at room temperature on an orbital shaker. Vortex briefly before injection and administer 100ul total suspension per mouse by the intramuscular route at 2 separate sites (ie. 2 x 50ul per mouse, one injection in each 5 quadriceps muscle). Prepare fresh before each immunisation.

Alum

Supplied by SIGMA (Cat. No. A-1577). Prepare a 2mg/ml suspension of alum in PBS. Mix adjuvant 1:1 with protein solution, vortex briefly and incubate shaking 10 gently for 10 minutes at room temperature. Vortex briefly before injection and administer 100ul total suspension per mouse i/p. Prepare fresh before each immunisation.

CpG - ImmunEasy

15 Supplied by Qiagen (Cat.No. 303101). Mix the stock pot of adjuvant by gentle vortexing, then mix adjuvant 1:1 with protein by gently pipetting up and down 5 times. Incubate at room temperature for 15 minutes. Gently pipette the mix up and down 5 times and administer 100ul suspension per mouse by the intramuscular route at 2 separate sites (ie. 2 x 50ul per mouse, one injection in each quadriceps 20 muscle). Prepare fresh before each immunisation.

CFA/IFA

Supplied by SIGMA (Cat. Nos. F-5881, F-5506). Formulate 1:1 with pre-mixed CFA for primary or IFA for boosts. Whirlimix sample to ensure an even white suspension 25 with the CFA/IFA. Store on ice for at least 30 mins prior to use and whirlimix thoroughly prior to dosing.

3.3 Anti-mouse IL-13 antibody responses.

30 Anti-mouse IL-13 antibody responses were monitored in the serum samples using an anti-mouse IL-13 antibody detection ELISA.

WO 02/070711

PCT/GB02/00900

48

96-well Maxisorp plates were coated with anti-mouse IL-13 monoclonal antibody (Cat. No. MAB, R+D Systems) in carbonate-bicarbonate buffer overnight at 4°C. Plates were then blocked with 3% BSA/TBST for 1 hour at RT, washed 3 times in TBST, and incubated with mouse IL-13 (Cat. No. 413-ML-025, R+D Systems) for 1
 5 hour at RT. After washing, plates were incubated with mouse sera for 1 hour at RT, washed again and incubated with HRP conjugated anti-mouse IgG polyclonal antibody (SIGMA, Cat. No. A-9309). Following further washing the plates were developed with 0-phenylenediamine dihydrochloride peroxidase substrate for 30 minutes.

10

The level of anti-mouse IL-13 antibodies in the serum was expressed as an endpoint titre. The endpoint titre is defined as that dilution of serum that is equivalent to twice the ELISA background reading.

Mouse	Anti-mouse IL-13 antibody endpoint titre			
	AS03	Alum	CpG	CFA/IFA
1	1/875	1/7250	1/67500	1/6750
2	1/9250	1/800	1/80000	1/975
3	1/160	1/9000	1/54000	1/6000
4	1/9000	1/6500	1/62500	1/16000
5	1/3600	1/10000	1/77500	1/31000

15

Figure 10 illustrates the anti-mouse IL-13 antibody profiles in the various treatment groups at day 125, for serum samples diluted at 1/100.

- 20 All five mice immunised with GST-cIL-13 in combination with CpG adjuvant raised strong anti-mouse IL-13 auto-antibody responses. This is in contrast to the other adjuvants, where responses were less consistent throughout each group, some mice raising very weak responses indeed.
- 25 These results indicate that CpG adjuvant is much more effective at raising consistent high titre anti-mouse IL-13 auto-antibody responses compared to the other adjuvants tested.

WO 02/070711

PCT/GB02/00900

49

These serum samples were analysed for IL-13 neutralising ability in an *in vitro* IL-13 neutralisation bioassay.

3.4 IL-13 neutralisation capacity.

5

To measure the ability of mouse serum to neutralise the bioactivity of recombinant mouse IL-13 on human TF-1 cells (ATCC Cat. No. CRL-2003), 5ng/ml recombinant mouse IL-13 was incubated with various concentrations of sera for 1 hour at 37°C in a 96-well tissue culture plate (Gibco BRL). Following this pre-incubation period, TF-1
10 cells were added. The assay mixture, containing various serum dilutions, recombinant mouse IL-13 and TF-1 cells, was incubated at 37°C for 70 hours in a humidified CO₂ incubator. MTT substrate (Cat. No. G4000, Promega) was added during the final 4 hours of incubation, after which the reaction was stopped with an acid solution to solubilise the metabolised blue formazan product. The absorbance
15 of the solution in each well was read in a 96-well plate reader at 570nm wavelength.

Note that this assay is only able to measure mouse IL-13 neutralisation capacity in serum dilutions greater than or equivalent to 1/100. Serum dilutions less than 1/100 induce non-specific proliferative effects in TF-1 cells.

20

The capacity of the serum to neutralise mouse IL-13 bioactivity was expressed as, that dilution of serum required to neutralise the bioactivity of 5ng/ml mouse IL-13 by 50% (= ND₅₀). The more dilute serum sample required, the more potent the neutralisation capacity.

25

The highest concentration of mouse D5 serum tested was a 1/100 dilution. This did not neutralise the bioactivity of 5ng/ml mouse IL-13 by 50%, therefore the ND₅₀ is expressed as < 1/100 dilution.

30

WO 02/070711

PCT/GB02/00900

50

Mouse (Serum samples taken at day 125)	Mouse IL-13 neutralisation capacity (ND ₅₀)
C1	1/1250
C2	1/5230
C3	1/523
C4	1/417
C5	1/1670
D5	<1/100

Day 125 serum samples from all five mice immunised with GST-cIL-13 in combination with CpG adjuvant, were able to potently neutralise the bioactivity of mouse IL-13 in an *in vitro* bioassay. In contrast, the day 125 serum sample from mouse D5 (immunised with GST-cIL-13 in CFA/IFA) was unable to neutralise the bioactivity of mouse IL-13 at all dilutions tested.

These results indicate that CpG adjuvant is much more effective at raising neutralising anti-mouse IL-13 auto-antibody responses compared to the other adjuvants tested.

WO 02/070711

PCT/GB02/00900

51

Claims

1. An isolated protein which is at least 30% but less than 100% identical to a human protein which polypeptide
- 5 (a) contains at least one mutation which is characteristic of an analogous non-human protein;
- (b) is capable of raising antibodies in human
- (c) is sufficiently structurally similar to the human protein that the antibodies bind to both the human protein and the polypeptide
- 10 and
- wherein the protein is not an antibody.
2. A protein having B-cell epitopes from a mammalian self-antigen and a mutation that gives rise to a sequence of an analogous protein of a second
- 15 mammalian species such that the protein is able to raise in the species from which the B-cell epitopes derived, an immune response that recognises the natural protein from which the B-cell epitopes are derived.
3. A protein having B-cell epitopes of a self-protein which are grafted, by
- 20 substitution, into a frame work of an analogous protein from a second mammalian species such that the protein is able to raise in the species in which the B-cell epitopes are derived, an immune response that recognises the natural protein from which the B-cell epitopes are derived.
- 25 4. A protein as claimed in any of claims 1 to 3 comprising conserved surface region introduced into the non-surface exposed region, said mutation giving rise to a sequence of an analogous protein such that the protein is able to raise an immune response to the self protein in the species from which the self-protein is derived.
- 30 5. A protein as claimed in any one of claims 1 to 4 wherein the immune response is a neutralising antibody response.

WO 02/070711

PCT/GB02/00900

52

6. A protein as claimed in any of claims 1 to 5 wherein the human protein, or B-cell epitope is derived from a cytokine.
- 5 7. A cytokine as claimed in claim 6, which is a 4-helical cytokine.
8. A cytokine as claimed in claim 7 which is IL-4 or IL-13.
9. A mutated human – IL-13 having one or more of the following substitutions or
10 a substitution involving a conservative substitution thereof.
- | | | | | | |
|------|---|---|----|----------|-----|
| R | → | K | at | position | 30 |
| V | → | S | at | position | 37 |
| Y | → | F | at | position | 63 |
| 15 A | → | V | at | position | 65 |
| E | → | D | at | position | 68 |
| E | → | Y | at | position | 80 |
| K | → | R | at | position | 81 |
| M | → | I | at | position | 85 |
| 20 G | → | H | at | position | 87 |
| Q | → | H | at | position | 113 |
| V | → | I | at | position | 115 |
| D | → | K | at | position | 117 |
- 25 10. A mutated human IL-13 as claimed in claim 9 having a plurality of substitutions as set forth in claim 9.
11. A mutated human IL-13 as claimed in any of claim 9 or 10 having one or more of the following sequences

30

L K E L I E E L S N

WO 02/070711

PCT/GB02/00900

53

F C V A L D S L

A I Y R T Q R I L H G

5

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

or a variant of said sequence comprising one or more conservative substitutions.

- 10 12. A mutated human IL-13 as shown in figure 9.
13. A polynucleotide encoding a protein of claim 1 to 12.
14. A polynucleotide of claim 13 which is a DNA and is operably linked to a
15 promoter.
15. A vector comprising a polynucleotide of claim 13 or 14.
16. A host transformed with a polynucleotide of claim 13 or 14 or vector of claim
20 15.
17. A pharmaceutical composition comprising , a protein, polynucleotide, vector
as claimed in any of claims 1 to 15 with a pharmaceutically acceptable carrier or
excipient.
- 25 18. A pharmaceutical composition as claimed in claim 17 additionally comprising
an adjuvant.
19. A pharmaceutical composition as claimed in claim 18 comprising a protein as
30 set forth in any of claims 1 to 12 and an immunostimulatory oligonucleotide.

WO 02/070711

PCT/GB02/00900

54

20. A pharmaceutical composition as claimed in claim 19 wherein the immunostimulatory oligonucleotide is selected from the group:
- OLIGO 1 (SEQ ID NO:1): TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT (CpG 1826)
5 OLIGO 2 (SEQ ID NO:2): TCT CCC AGC GTG CGC CAT (CpG 1758)
OLIGO 3 (SEQ ID NO:3): ACC GAT GAC GTC GCC GGT GAC GGC ACC ACG
OLIGO 4 (SEQ ID NO:4): TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT (CpG 2006)
OLIGO 5 (SEQ ID NO:5): TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT (CpG 1668)
- 10 21. A protein, polynucleotide, vector, host or composition as claimed in any of claims 1 to 20 for use in medicine.
22. Use of a protein as claimed in any of claim 1 to 12 in the manufacture of a medicament for the treatment of IL-13 mediated diseases.
- 15 23. Use as claimed in claim 22 for the treatment of asthma.
24. A method for the treatment of prophylaxis of IL-13 mediated disease comprising the administration of a safe and effective amount of composition
20 according to any of claims 17-20 to a patient in need thereof.
25. A method for the preparation of a protein according to any of claims 1 to 12 which method comprises:
- 25 1. identification of one or more regions of a self, typically human, protein against which an antibody response is desired.
2. identification of the amino-acid sequence of the self protein.
3. identification of the amino-acid sequence of an analogous protein
construction by recombinant DNA techniques of a chimaeric molecule containing
30 at least one target region identified in step 1, whose amino-acid sequence is taken from the sequence identified in step 2, and

WO 02/070711

PCT/GB02/00900

55

sufficient amino-acids from the sequence(s) identified in step 3 to enable the resulting protein to fold into a shape similar to that of the self protein such that the mutated protein can raise an immune response that recognises the self protein.

5

10

15

20

25

30

WO 02/070711

PCT/GB02/00900

1/13

Figure 1.

5 GGGCCGCTGCCAAGATCTGTGTCTCTCCCTCTGACCCCTTAGGGAGCTCATTTGAGGAGCTG 50
1 -----+-----+-----+-----+-----+
G P V P R S V S L P L T L R E L I E E L

10 GTCACATCACACAAGACCAGACTCCCCTGTGCACCGCAGCATGGTATGGAGTGTGGAC 120
61 -----+-----+-----+-----+-----+
V N I T Q D Q T P L C N G S M V W S V D

15 CTGGCCCTGCCGGTACTGTGCAGCCCTGGATCCCTGACCAACATCTCCAAFTGCAAT 180
121 -----+-----+-----+-----+-----+
L A A G G Y C A A L E S L T N I S N C N

20 GCCATCGAGAAGACCAGAGGATGCTGGGCGGACTCTGTAAACCGCAAGGCCCACTACG 240
181 -----+-----+-----+-----+-----+
A I E K T Q R M L G G L C N R K A P T T

25 GPTCCAGCCTCCCGATACCAAAATCGAGTGGCCAGTTTGTAAAGGACCTGCTCAGC 300
241 -----+-----+-----+-----+-----+
V S S L P D T K I E V A Q F V K D L L S

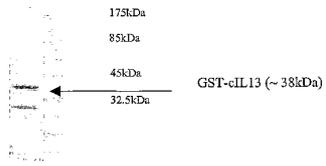
30 TACACAAAGCAACTGTTTCGCCACGGCCCTTCTAA 336
301 -----+-----+-----+-----+-----+
Y T K Q L F R H G P P *

WO 02/070711

PCT/GB02/00900

2/13

Figure 2.



WO 02/070711

PCT/GB02/00900

3/13

Figure 3

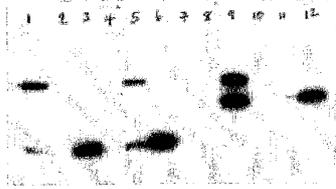
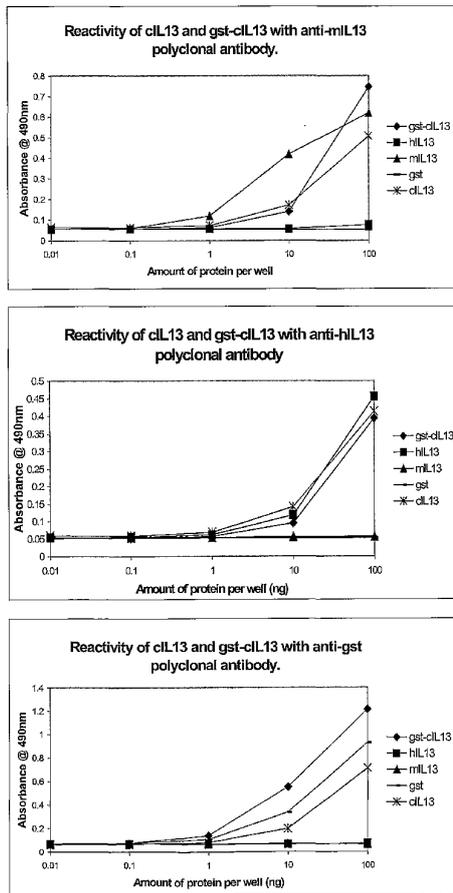


Figure 4

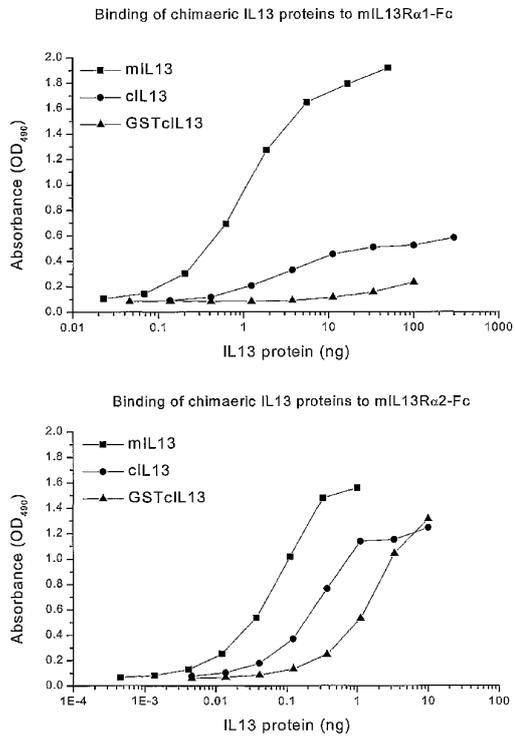


WO 02/070711

PCT/GB02/00900

5/13

Figure 5

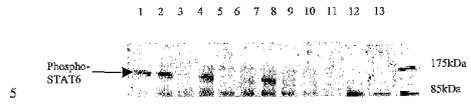


WO 02/070711

PCT/GB02/00900

6/13

Figure 6



WO 02/070711

PCT/GB02/00900

7/13

Figure 7a

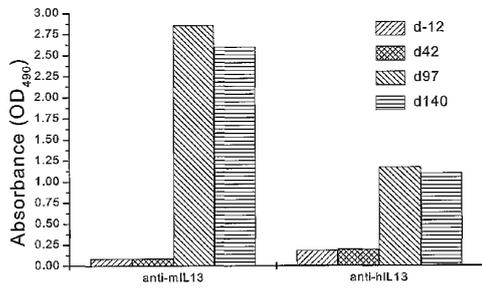
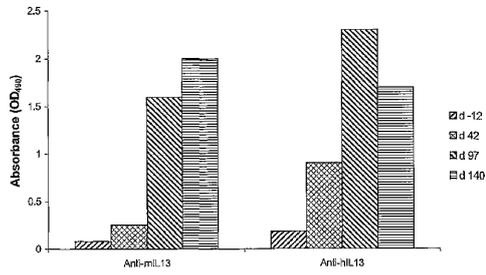


Figure 7b

5

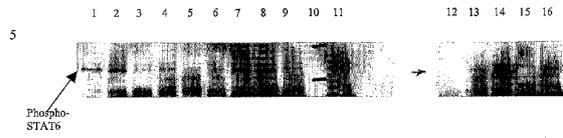


WO 02/070711

PCT/GB02/00900

8/13

Figure 8



10

WO 02/070711

PCT/GB02/00900

9/13

Figure 9

```
5      ATGGCGCTTTTGTGACCAAGGTCATTCCTCTCCTTGCCCTTGGCGGCTTTGCCTCCCA  
1      -----+-----> 60  
      M A L L L T T V I A L T C L G G F A S P  
10     GGCCTGTGCCTCCCTCTACAGCCCTTAAGGAGCTTATTGAGAGCTGAGCAACATCAC  
61     -----+-----> 120  
      G P V P P S T A L K E L I E E L S N I T  
15     CAGAACCAGAAGGCTCCGCTCTGCAATGGCAGCATGGTTTGGAGCATCAACCTGACAGCT  
121    -----+-----> 180  
      Q N Q K A P L C N G S M V W S I N L T A  
20     GGCATGTTCTGTGTAGCCCTGGAATCCCTGATCAACGTCTCAGGCTGCAGTGCCATCFAC  
181    -----+-----> 240  
      G M F C V A L D S L I N V S G C S A I Y  
25     AGGACCCAGAGGATATTCATGGCTTCTCCCGCACAGGTCCTCAGCTGGGAGTTTCC  
241    -----+-----> 300  
      R T Q R I L H G F C P H K V S A G Q P S  
30     AGCTTGCAATGTCGAGACCCAAATCGAAGTAGCCCACTTTATAACAAAACCTGCTCTTA  
301    -----+-----> 360  
      S L H V R D T K I E V A H F I T K L L D  
35     CATTTRAAGAAGCTTTTCCGAGGGACGGTTCACCTGA 399  
361    -----+----->  
      H L K K L F R E G R F N *
```

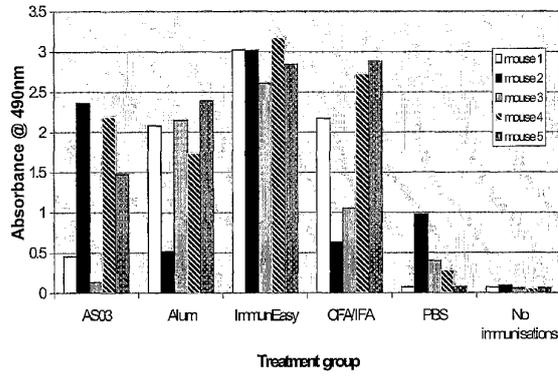
40

45

50

10/13

Figure 10



5

10

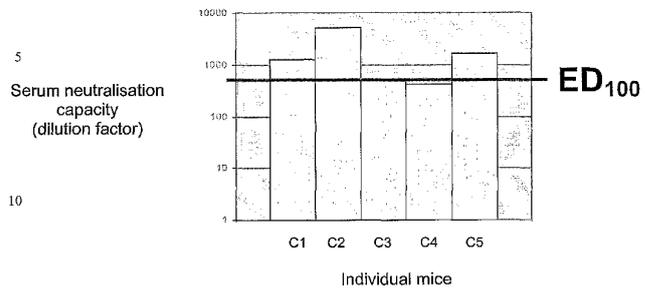
15

WO 02/070711

PCT/GB02/00900

11/13

Figure 11



15

20

25

30

WO 02/070711

PCT/GB02/00900

12/13

Figure 12

```

5      1 atggcgctctgggtgactgeagtcctggetttgcttgcccttgggtggtctgcccgcaca
-19 M A L W V T A V L A L A C L G G L A A P 0
      61 GGGCCGCTGCCAAGATCTGTCTCTCCCTGTGACCCCTTAAGGAGCTTATTGAGGAGCTG
10     1 G F V P R S V S L P V T L K E L I E E L 20
      121 ACCAACATCACACAAGACCAGACTCCCTGTGCAACGGCCAGCATGGTATGGAGTGTGAC
15     21 T N I T Q D Q T P L C N G S M V W S V D 40
      181 CTGGCCGCTGGCGGTTCTGTGTAGCCCTGGATCCCTGACCAACATCTCCATTGCAAT
18     41 L A A G G F C V A L D S L T N I S N C N 60
      241 GCCATCTTCAGGACCCAGAGGATATGCATGCCCTCTGTAAACCGCAGGCCCCCACTACG
20     61 A I E R T Q R I L H A L C N R K A P T T 80
      301 GTCTCCAGCCTCCCGATACCAAAATCGAAGTAGCCCACTTTTATACAAAACGTGCTCACC
25     81 V S S L P D T K I E V A H F I T K L L T 100

      361 TACACAAAGAACCTGTTTCGCCGCGGCCCTTCTAA 396
30     101 Y T K N L F R R G P F * 112

```

35

40

WO 02/070711

PCT/GB02/00900

13/13

Figure 13

```
5  -23  ---+-----+-----+  0
      MGLTSQLLPPLPPLACAGNFVHG
      1  -----+-----+-----+  24
      HKCDKKLRLREITIGLLNEVTGKTL
10  25  ---+-----+-----+  48
      CTELTVTDIIPAASKNTTESELVCR
      49  ---+-----+-----+  72
      ASKVLRIFVLRKEKDTKLGATAK
15  73  ---+-----+-----+  96
      NSSVLMELQRLFRFRCLDGLNSC
      97  ---+-----+-----+  120
      PVKEANQSSLRKDFLESLSIMQMD
20  121  -----  126
      YKCSS
25
```

WO 02/070711

1/7

PCT/GB02/00900

SEQUENCE LISTING

<110> Glaxo Group Ltd

<120> Vaccine

<130> PG4355

<160> 25

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutated epitope

<400> 1

Leu Lys Glu Leu Ile Glu Glu Leu Ser Asn
1 5 10

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutated epitope

<400> 2

Phe Cys Val Ala Leu Asp Ser Leu
1 5

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutated epitope

<400> 3

Ala Ile Tyr Arg Thr Gln Arg Ile Leu His Gly
1 5 10

<210> 4

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutated epitope

WO 02/070711

2/7

PCT/GB02/00900

<400> 4
Lys Ile Glu Val Ala His Phe Ile Thr Lys Leu Leu
1 5 10

<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> unknown

<220>
<223> synthetic immunostimulatory oligonucleotide

<400> 5
tccatgacgt tcctgacgtt 20

<210> 6
<211> 18
<212> DNA
<213> unknown

<220>
<223> synthetic immunostimulatory oligonucleotide

<400> 6
tctcccagcg tgcgccat 18

<210> 7
<211> 30
<212> DNA
<213> unknown

<220>
<223> synthetic immunostimulatory oligonucleotide

<400> 7
accgatgacg tcgccggtga oggcaccacg 30

<210> 8
<211> 24
<212> DNA
<213> unknown

<220>
<223> synthetic immunostimulatory oligonucleotide

<400> 8
tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt 24

<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> unknown

<220>
<223> synthetic immunostimulatory oligonucleotide

<400> 9
tccatgacgt tcctgatgct 20

<210> 10

WO 02/070711 3/7 PCT/GB02/00900

<211> 72
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR oligoprimer for Chimeric IL13 for murine use

<400> 10
tgtgatgttg accagctct caatgagctc cctaagggtc agaggagag acacagatct 60
tggcaacggc cc 72

<210> 11
<211> 73
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR oligoprimer for Chimeric IL13 for murine use

<400> 11
aggagatggg caacatcaca caagaccaga ctcccctgtg caacggcagc atggtatgga 60
gtgtggacct ggc 73

<210> 12
<211> 72
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR oligoprimer for Chimeric IL13 for murine use

<400> 12
gcaattggag atgttggtca gggattccag ggctgcacag taccgccag cggccaggtc 60
cacactccat ac 72

<210> 13
<211> 73
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR oligoprimer for Chimeric IL13 for murine use

<400> 13
tgaccaacat ctccaattgc aatgccatcg agaagacca gaggatgctg ggcggactct 60
gtaaccgcaa ggc 73

<210> 14
<211> 72
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR oligoprimer for Chimeric IL13 for murine use

<400> 14
aaactgggcc acctcgattt tggtatcggg gaggtggag accgtagtgg ggccttgcg 60
gttacagagt cc 72

<210> 15
<211> 71

WO 02/070711

4/7

PCT/GB02/00900

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> PCR oligoprimer for Chimeric IL13 for murine use

 <400> 15
 aaatcgaggt ggcccagttt gtaaaggacc tgctcagcta cacaaagcaa ctggttccgc 60
 acggccctt c 71

 <210> 15
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> PCR oligoprimer for Chimeric IL13 for murine use

 <400> 16
 cgggattcg ggccggtgcc aagatctg 28

 <210> 17
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> PCR oligoprimer for Chimeric IL13 for murine use

 <400> 17
 ctccgctcga gtcgacttag aagggccgt ggcgaaa 37

 <210> 18
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> PCR oligoprimer for Chimeric IL13 for murine use

 <400> 18
 cgggatccg ggcggtgcc aagatctg 28

 <210> 19
 <211> 336
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Chimeric IL13 for murine use

 <400> 19
 gggccggtgc caagatctgt gtctctccct ctgaccctta gggagctcat tgaggagctg 60
 gtcacaatca cacaaagcca gactcccctg tgcaacggca gcatggtatg gactgtggac 120
 ctggcgctg gcgggtactg tgcagccctg gaatccctga ccaacatctc caattgcaat 180
 ccactcgaga agaccagag gatgctgggc ggactctgta accgcaaggc cccctctacg 240
 gtctccagcc tcccagatac caaatcgag ttggcccagt ttgtaaagga cctgctcagc 300
 tacacaagc aactgtttcg ccaaggcccc ttctaa 336

 <210> 20
 <211> 111

WO 02/070711

5/7

PCT/GB02/00900

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Chimeric IL13 for murine use

<400> 20
 Gly Pro Val Pro Arg Ser Val Ser Leu Pro Leu Thr Leu Arg Glu Leu
 1 5 10 15
 Ile Glu Glu Leu Val Asn Ile Thr Gln Asp Gln Thr Pro Leu Cys Asn
 20 25 30
 Gly Ser Met Val Trp Ser Val Asp Leu Ala Ala Gly Tyr Cys Ala
 35 40 45
 Ala Leu Glu Ser Leu Thr Asn Ile Ser Asn Cys Asn Ala Ile Glu Lys
 50 55 60
 Thr Gln Arg Met Leu Gly Gly Leu Cys Asn Arg Lys Ala Pro Thr Thr
 65 70 75 80
 Val Ser Ser Leu Pro Asp Thr Lys Ile Glu Val Ala Gln Phe Val Lys
 85 90 95
 Asp Leu Leu Ser Tyr Thr Lys Gln Leu Phe Arg His Gly Pro Phe
 100 105 110

<210> 21
 <211> 399
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Chimeric IL13 for human use

<400> 21
 atggcgcttt tgttgaccac ggtcattgct ctcacttgcc ttggcggtt tgccctccca 60
 ggccctgtgc ctccctctac agcccttaag gagcttattg aggagctgag caacatcacc 120
 cagaaccaga aggtccgct ctgcaatggc agcatggttt ggagcatcaa cctgacagct 180
 ggcatgttct gtgtagccct ggattccctg atcaactgtt caggctgcag tgcacatcac 240
 aggaccaga ggatattgca tggcttctgc cgcacaagg tctcagctgg gcagttttcc 300
 agcttgcag tccgagacac caaatcgaa gttagccact ttataacaaa actgctctta 360
 catttaaga aactttttcg cgaggacggt ttcaactga 399

<210> 22
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Chimeric IL13 for human use

<400> 22
 Met Ala Leu Leu Thr Thr Val Ile Ala Leu Thr Cys Leu Gly Gly
 1 5 10 15
 Phe Ala Ser Pro Gly Pro Val Pro Pro Ser Thr Ala Leu Lys Glu Leu
 20 25 30
 Ile Glu Glu Leu Ser Asn Ile Thr Gln Asn Gln Lys Ala Pro Leu Cys
 35 40 45
 Asn Gly Ser Met Val Trp Ser Ile Asn Leu Thr Ala Gly Met Phe Cys
 50 55 60
 Val Ala Leu Asp Ser Leu Ile Asn Val Ser Gly Cys Ser Ala Ile Tyr
 65 70 75 80
 Arg Thr Gln Arg Ile Leu His Gly Phe Cys Pro His Lys Val Ser Ala
 85 90 95

WO 02/070711

6/7

PCT/GB02/00900

Gly Gln Phe Ser Ser Leu His Val Arg Asp Thr Lys Ile Glu Val Ala
 100 105 110
 His Phe Ile Thr Lys Leu Leu His Leu Lys Lys Leu Phe Arg Glu
 115 120 125
 Gly Arg Phe Asn
 130

<210> 23
 <211> 396
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Chimeric IL13 for murine use

<400> 23
 atggcgctct gggcgactgc agtcctggct ctgcttggc ttgggtgtct cgcgcgccca 60
 ggcgcgggfc caagatctgt gtctctccct gtgaccctta aggagcttat tgaggagctg 120
 accaacatca cacaagacca gactccctcg tgcacggca gcatggtatg gagtgggac 180
 ctggcgcgtg gcgggttctg tgtagccctg gattccctga ccaacatctc caattgcaat 240
 gccatcttca ggaccagag gatattgcat gccctctgta accgcaagcc cccactacg 300
 gtctccagcc tcccagatac caaatcgaa gtagccact ttatacaaa actgtcacc 360
 tacacaaaga acctgttctg ccgcgcccc tcttaa 396

<210> 24
 <211> 131
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Chimeric IL13 for murine use

<400> 24
 Met Ala Leu Trp Val Thr Ala Val Leu Ala Leu Ala Cys Leu Gly Gly
 1 5 10 15
 Leu Ala Ala Pro Gly Pro Val Pro Arg Ser Val Ser Leu Pro Val Thr
 20 25 30
 Leu Lys Glu Leu Ile Glu Glu Leu Thr Asn Ile Thr Gln Asp Gln Thr
 35 40 45
 Pro Leu Cys Asn Gly Ser Met Val Trp Ser Val Asp Leu Ala Ala Gly
 50 55 60
 Gly Phe Cys Val Ala Leu Asp Ser Leu Thr Asn Ile Ser Asn Cys Asn
 65 70 75 80
 Ala Ile Phe Arg Thr Gln Arg Ile Leu His Ala Leu Cys Asn Arg Lys
 85 90 95
 Ala Pro Thr Thr Val Ser Ser Leu Pro Asp Thr Lys Ile Glu Val Ala
 100 105 110
 His Phe Ile Thr Lys Leu Leu Thr Tyr Thr Lys Asn Leu Phe Arg Arg
 115 120 125
 Gly Pro Phe
 130

<210> 25
 <211> 150
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Chimeric IL4 for human use

WO 02/070711

7/7

PCT/GB02/00900

```

<400> 25
Met Gly Leu Thr Ser Gln Leu Leu Pro Pro Leu Phe Phe Leu Leu Ala
1          5          10          15
Cys Ala Gly Asn Phe Val His Gly His Lys Cys Asp Lys Asn His Leu
20          25          30
Arg Glu Ile Ile Gly Ile Leu Asn Glu Val Thr Gly Glu Lys Thr Leu
35          40          45
Cys Thr Glu Leu Thr Val Thr Asp Ile Phe Ala Ala Ser Lys Asn Thr
50          55          60
Thr Glu Ser Glu Leu Val Cys Arg Ala Ser Lys Val Leu Arg Ile Phe
65          70          75          80
Tyr Leu Lys His Glu Lys Asp Thr Arg Cys Leu Gly Ala Thr Ala Lys
85          90          95
Asn Ser Ser Val Leu Met Glu Leu Gln Arg Leu Phe Arg Ala Phe Arg
100         105         110
Cys Leu Asp Gly Leu Asn Ser Cys Pro Val Lys Glu Ala Asn Gln Ser
115         120         125
Ser Leu Lys Asp Phe Leu Glu Ser Leu Lys Ser Ile Met Gln Met Asp
130         135         140
Tyr Ser Lys Cys Ser Ser
145         150

```

7

【手続補正書】

【提出日】平成15年4月14日(2003.4.14)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

第1の哺乳動物種の自己タンパク質に由来するB細胞エピトープ、および第1の哺乳動物種とは異なる哺乳動物種の類似したタンパク質の配列を生じさせる変異を有し、その結果として、第1の哺乳動物種において、B細胞エピトープが誘導された天然タンパク質を認識する免疫応答を引き出すことができるキメラ組換えタンパク質の、B細胞の免疫寛容を破壊することにより第1の哺乳動物種の体内で該自己タンパク質に対する免疫応答を引き出すためのワクチンの製造における使用。

【請求項2】

第1の哺乳動物種の自己タンパク質に由来するB細胞エピトープが、第2の哺乳動物種由来の類似したタンパク質のフレームワーク中に置換によってグラフトされており、その結果として、B細胞エピトープの起源となった該動物種において、B細胞エピトープが誘導された天然タンパク質を認識する免疫応答を引き出すことができるキメラ組換えタンパク質の、B細胞の免疫寛容を破壊することにより第1の哺乳動物種の体内で該自己タンパク質に対する免疫応答を引き出すためのワクチンの製造における使用。

【請求項3】

前記タンパク質が保存された表面領域および表面に露出していない領域に導入された変異を含んでなり、前記変異は類似したタンパク質の配列を生じさせるものであり、その結果として、前記タンパク質は、自己タンパク質の起源となった該動物種において、該自己タンパク質に対する免疫応答を引き出すことができるようになる、請求項1または2に記載の使用。

【請求項4】

前記タンパク質がヒトタンパク質であり、そのアミノ酸配列は類似した非ヒトタンパク質由来の5個より多い連続したアミノ酸の配列を生じさせるように変異させてあり、ここで、該変異は、ヒトタンパク質の表面に露出していない領域にある天然ヒトアミノ酸配列の1個より多いアミノ酸を置換するものであって、生理学的条件下の水溶液中で折りたたまれた天然の活性タンパク質の表面にある残基には存在しない、請求項1～3のいずれか1項に記載の使用。

【請求項5】

前記免疫応答が中和抗体応答である、請求項1～4のいずれか1項に記載の使用。

【請求項6】

前記タンパク質またはB細胞エピトープがヒトサイトカイン由来のものである、請求項1～5のいずれか1項に記載の使用。

【請求項7】

前記ヒトサイトカインが4-ヘリカルサイトカインである、請求項6に記載の使用。

【請求項8】

前記ヒトサイトカインがIL-4またはIL-13である、請求項7に記載の使用。

【請求項9】

前記ヒトサイトカインがIL-13であり、前記ワクチンが喘息治療用である、請求項8に記載の使用。

【請求項10】

ヒトタンパク質のアミノ酸配列が、類似した非ヒトタンパク質由来の5個より多い連続したアミノ酸の配列を生じさせるように変異させてあり、ここで、天然ヒト配列の1個より

多いアミノ酸が、それぞれヒトタンパク質の表面に露出していない領域において置換されているが、生理学的条件下の水溶液中で折りたたまれた天然の活性タンパク質の表面にある残基においては置換されていない、上記ヒトタンパク質のアミノ酸配列を含んでなる組換えキメラタンパク質。

【請求項 1 1】

前記ヒトタンパク質のアミノ酸配列は、表面に露出されたB細胞エピトープを保存しつつ、該ヒトタンパク質の表面に露出していない領域を、類似した非ヒトタンパク質由来の同等の配列で置換するように変異させてある、請求項 1 0 に記載の組換えタンパク質。

【請求項 1 2】

前記ヒトタンパク質がIL-4である、請求項 1 0 または 1 1 に記載の組換えタンパク質。

【請求項 1 3】

前記ヒトタンパク質がIL-13である、請求項 1 0 または 1 1 に記載の組換えタンパク質。

【請求項 1 4】

下記の1以上の置換またはその保存的置換を含む置換を有する、請求項 1 3 に記載の組換え変異型ヒトIL-13。

R	K	30位
V	S	37位
Y	F	63位
A	V	65位
E	D	68位
E	Y	80位
K	R	81位
M	I	85位
G	H	87位
Q	H	113位
V	I	115位
D	K	117位

【請求項 1 5】

2 以上の前記置換を有する、請求項 1 4 に記載の変異型ヒトIL-13。

【請求項 1 6】

全部の前記置換またはその保存的置換を含む置換を有する、請求項 1 4 に記載の組換え変異型ヒトIL-13。

【請求項 1 7】

下記の 1 以上の配列：

L K E L I E E L S N
 F C V A L D S L
 A I Y R T Q R I L H G
 K I E V A H F I T K L L

または1以上の保存的置換を含んでなる該配列の改変体を有する、請求項 1 2 に記載の変異型ヒトIL-13。

【請求項 1 8】

図 9 に示す配列を有する、請求項 1 7 に記載の変異型ヒトIL-13。

【請求項 1 9】

請求項 1 0 ~ 1 8 のいずれか 1 項に記載のタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

【請求項 2 0】

DNAであり、プロモーターと機能的に連結されている、請求項 1 9 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 2 1】

請求項 1 9 または 2 0 に記載のポリヌクレオチドを含有するベクター。

【請求項 2 2】

請求項 19 もしくは 20 に記載のポリヌクレオチド、または請求項 21 に記載のベクターにより形質転換された宿主。

【請求項 23】

請求項 10 ~ 22 のいずれか 1 項に記載のタンパク質、ポリヌクレオチド、またはベクターを、製薬上許容される担体または賦形剤と共に含んでなる、医療用のワクチン組成物。

【請求項 24】

免疫刺激性オリゴヌクレオチドをさらに含んでなる、請求項 23 に記載のワクチン組成物。

【請求項 25】

免疫刺激性オリゴヌクレオチドが次の群：

オリゴ1(配列番号1)：TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT (CpG 1826)

オリゴ2(配列番号2)：TCT CCC AGC GTG CGC CAT (CpG 1758)

オリゴ3(配列番号3)：ACC GAT GAC GTC GCC GGT GAC GGC ACC ACG

オリゴ4(配列番号4)：TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT (CpG 2006)

オリゴ5(配列番号5)：TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT (CpG 1668)

から選択されたものである、請求項 24 に記載のワクチン組成物。

【請求項 26】

B細胞の免疫寛容を破壊することによりヒト体内で自己タンパク質に対する免疫応答を引き出すためのワクチンの製造における、請求項 10 または 11 に記載のタンパク質の使用。

【請求項 27】

IL-13が媒介する疾患の治療用医薬の製造における、請求項 12 ~ 18 のいずれか 1 項に記載のタンパク質の使用。

【請求項 28】

喘息治療用である、請求項 27 に記載の使用。

【請求項 29】

請求項 21 に記載の組成物の安全かつ有効な量を、それを必要とする患者に投与することを含んでなる、IL-13が媒介する疾患の治療または予防方法。

【請求項 30】

請求項 10 または 11 に記載のタンパク質の調製方法であって、

1. 抗体応答が望まれる自己(典型的にはヒト)タンパク質の1以上の領域を同定すること；

2. 該自己タンパク質のアミノ酸配列を同定すること；

3. 類似したタンパク質のアミノ酸配列を同定すること；

ステップ1で同定された標的領域(そのアミノ酸配列はステップ2で同定された配列から得られる)の少なくとも1つ、およびステップ3で同定された配列からの十分なアミノ酸を含んでなるキメラ分子を組換えDNA技法により構築することを含んでなり、その結果として得られるタンパク質が自己タンパク質と類似した形状へと折りたたまれることが可能となり、それによって該変異タンパク質が自己タンパク質を認識する免疫応答を引き出すことができるようになる、上記方法。

【請求項 31】

B細胞の免疫寛容を破壊することによりヒト体内で自己抗原に対する免疫応答を引き出すための自己タンパク質ワクチンの製造方法であって、(a) ヒトタンパク質を取得し、(b) そのヒトタンパク質のアミノ酸配列を、類似した非ヒトタンパク質由来の5個より多い連続したアミノ酸の配列を生じさせるように変異させることを含んでなり、ここで、天然のヒト配列の1個より多いアミノ酸が、それぞれヒトタンパク質の表面に露出していない領域において置換されるが、生理学的条件下の水溶液中で折りたたまれた天然の活性タンパク質の表面にある残基においては置換されない、上記方法。

【請求項 32】

(a) ヒトタンパク質を取得し、(b) 表面に露出されたB細胞エピトープを保存しつつ、表

面に露出していないアミノ酸を、ヒト以外の哺乳動物種からの類似したタンパク質由来の同等のアミノ酸と置換することを含んでなる、請求項 3 1 に記載の自己タンパク質ワクチンの製造方法。

【請求項 3 3】

ヒトタンパク質の保存された表面領域、および表面に露出していない領域に導入された変異を含むキメラ組換えタンパク質を調製し、ただし、該変異は、該タンパク質がヒトにおいてヒトタンパク質に対する免疫応答を引き出すことができるように、類似したタンパク質の配列を生じさせるものであり、次いで、該キメラ組換え抗原を処方してワクチン製剤とすることを含んでなる、自己ワクチンの製造方法。

【請求項 3 4】

請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のキメラ組換えタンパク質をコードするポリヌクレオチド、または該ポリヌクレオチドを含むベクターの、B細胞の免疫寛容を破壊するためのワクチンの製造における使用。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/GB 02/00900
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/24 C07K14/47 C07K14/54 A61K39/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are indicated in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, BIOTECHNOLOGY ABS, CHEM ABS Data, SEQUENCE SEARCH, EMBASE, LIFESCIENCES, MEDLINE, FAJ, SCISEARCH, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96 04306 A (SCHERING CORP) 15 February 1996 (1996-02-15) the whole document claim 12	6-18, 21-24
X	MCKENZIE A N J ET AL: "Structural comparison and chromosomal localization of the human and mouse IL-13 genes" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE WILLIAMS AND WILKINS CO. BALTIMORE, US, vol. 150, no. 12, 15 June 1993 (1993-06-15), pages 5436-5444, XP002176473 ISSN: 0022-1767 Figure 2	6-16
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		
B earlier document but published on or after the international filing date		
L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		
C document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention		
X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone		
Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.		
Z document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
14 May 2002	04/06/2002	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5516 Patentsstr 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Pilat, D	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/GB 02/00900

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>BUITKAMP JOHANNES ET AL: "The cattle interleukin-13 gene: Genomic organization, chromosomal location, and evolution of the promoter."</p> <p>IMMUNOGENETICS, vol. 49, no. 10, 1999, pages 872-878, XP002198871 ISSN: 0093-7711 the whole document</p>	6-11, 13-18, 21-24
X	<p>HEINZMANN A ET AL: "Genetic variants of IL-13 signalling and human asthma and atopy."</p> <p>HUMAN MOLECULAR GENETICS, vol. 9, no. 4, 1 March 2000 (2000-03-01), pages 549-559, XP002198872 ISSN: 0964-6906 the whole document</p>	6-8, 13-18, 21-24
X	<p>EP 0 759 468 A (VIRBAC LAB) 26 February 1997 (1997-02-26) claims; figure 2</p>	6-8, 13-18,21
Y	<p>page 6, line 11 - line 15</p>	19,20
Y	<p>WO 96 02555 A (UNIV IOWA RES FOUND) 1 February 1996 (1996-02-01) cited in the application the whole document</p>	19,20
X	<p>WO 93 10235 A (SEBALD WALTER) 27 May 1993 (1993-05-27) claims</p>	6-8, 13-18,21
X	<p>EP 0 911 401 A (BAYER AG) 28 April 1999 (1999-04-28) claims; tables 1,2</p>	6-8, 13-18,21
X	<p>WO 00 78334 A (LIM SIEW PHENG ;TAN YIN HWEE (SG); INST OF MOLECUL & CELL BIOLOGY) 28 December 2000 (2000-12-28) the whole document</p>	6-8, 13-18,21
X	<p>WO 96 04388 A (BROWNE MICHAEL JOSEPH ;CHAPMAN CONRAD GERALD (GB); CLINKENBEARD HE) 15 February 1996 (1996-02-15) claims; examples</p>	6-8, 13-18,21
A	<p>WO 97 40149 A (BOOTS ANNA MARIA HELENA ;AKZO NOBEL NV (NL); BOS EBO SYBREN (NL);) 30 October 1997 (1997-10-30) the whole document</p>	6-8, 13-18,21
	-/--	

Form PCT/ISA/210 (Continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/GB 02/00900
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 99 46992 A (GREGORY RICHARD J ;GENZYME CORP (US); KAPLAN JOHANNE (US)) 23 September 1999 (1999-09-23) page 3, line 6 - line 10; claims page 8, line 10 - line 18 -----	6-8, 13-18
A	WO 96 26218 A (RUDY GEORGE ;HONEYMAN MARGO (AU); LEW ANDREW (AU); AMRAD OPERATION) 29 August 1996 (1996-08-29) page 2; claims; figure 1 -----	6-8, 13-18
A	EP 1 026 238 A (UNIV CALIFORNIA) 9 August 2000 (2000-08-09) page 3, paragraph 9; claims; figure 4 -----	6-8, 13-18
P, X	WO 01 34645 A (JOSHI BHARAT H ;OSHIMA YASUO (US); PURI RAJ K (US); GOVERNMENT OF) 17 May 2001 (2001-05-17) the whole document figure 1 -----	6-18, 21-24

Form PCT/ISA(210) (continuation of second sheet) (July 1999)

International Application No. PCT/GB 02 00900

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 1-5

Present claims 1-5 relate to an extremely large number of possible compounds. In fact, the claims contain so many variables that a lack of clarity (and/or conciseness) within the meaning of Article 6 PCT arises to such an extent as to render a meaningful search of the claims impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the application which do appear to be clear (and/or concise), namely compounds wherein the human protein or B cell epitope is derived from cytokine as claimed in claims 6-8, mutated interleukin 13 as claimed in claims 9-12 and subject-matter as claimed in claims 13-25 referring directly or indirectly thereto.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/GB 02/00900

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date			
WO 9604306	A	15-02-1996	US 5696234 A 09-12-1997			
			AU 3196195 A 04-03-1996			
			WO 9604306 A2 15-02-1996			
EP 0759468	A	26-02-1997	EP 0759468 A1 26-02-1997			
			JP 9118696 A 06-05-1997			
WO 9602555	A	01-02-1996	AU 713040 B2 18-11-1999			
			AU 1912795 A 16-02-1996			
			CA 2194761 A1 01-02-1996			
			EP 1167377 A2 02-01-2002			
			EP 1167378 A2 02-01-2002			
			EP 1167379 A2 02-01-2002			
			EP 0772619 A1 14-05-1997			
			JP 10506265 T 23-06-1998			
			WO 9602555 A1 01-02-1996			
			US 6194388 B1 27-02-2001			
			US 6207646 B1 27-03-2001			
			WO 9310235	A	27-05-1993	DE 4137333 A1 19-05-1993
						AT 163196 T 15-02-1998
AU 671960 B2 19-09-1996						
AU 2928292 A 15-06-1993						
CA 2123315 A1 27-05-1993						
CZ 9401185 A3 15-12-1994						
DE 59209196 D1 19-03-1998						
DK 613499 T3 23-09-1998						
WO 9310235 A1 27-05-1993						
EP 0613499 A1 07-09-1994						
ES 2112340 T3 01-04-1998						
GR 3026600 T3 31-07-1998						
HU 66826 A2 30-01-1995						
JP 7501522 T 16-02-1995						
KR 276410 B1 15-12-2000						
NO 941681 A 06-05-1994						
SK 55494 A3 07-12-1994						
US 5723118 A 03-03-1998						
EP 0911401	A	28-04-1999	EP 0911401 A1 28-04-1999			
			AU 9749598 A 10-05-1999			
			WO 9920765 A1 29-04-1999			
			EP 1023446 A1 02-08-2000			
			JP 2001520040 T 30-10-2001			
			ZA 9809540 A 22-04-1999			
WO 0078334	A	28-12-2000	AU 5617900 A 09-01-2001			
			WO 0078334 A1 28-12-2000			
WO 9604388	A	15-02-1996	AU 2140699 A 03-06-1999			
			AU 3382595 A 04-03-1996			
			BR 9508469 A 16-09-1997			
			CA 2196200 A1 15-02-1996			
			CN 1164872 A 12-11-1997			
			CZ 9700256 A3 17-09-1997			
			WO 9604388 A1 15-02-1996			
			EP 0770135 A1 02-05-1997			
			HU 76369 A2 28-08-1997			
			JP 10503371 T 31-03-1998			

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 2002)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				International Application No.	
Information on patent family members				PCT/GB 02/00900	
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	Publication date	Publication date
WO 9604388	A	NO	970374 A	19-02-1997	
		NZ	292124 A	28-10-1998	
		PL	318380 A1	09-06-1997	
		US	5783181 A	21-07-1998	
		ZA	9506253 A	08-01-1997	
WO 9740149	A	30-10-1997	US	5843449 A	01-12-1998
			AU	724547 B2	28-09-2000
			AU	2386997 A	12-11-1997
			BR	9708714 A	03-08-1999
			CA	2251584 A1	30-10-1997
			CN	1216582 A	12-05-1999
			CZ	9803333 A3	17-03-1999
			WO	9740149 A1	30-10-1997
			EP	0904369 A1	31-03-1999
			JP	2000509265 T	25-07-2000
			NO	984835 A	16-12-1998
			NZ	332311 A	26-05-2000
			PL	329350 A1	29-03-1999
			TR	9802082 T2	21-09-2000
			WO 9946992	A	23-09-1999
CA	2322624 A1	23-09-1999			
EP	1071333 A1	31-01-2001			
JP	2002506618 T	05-03-2002			
WO	9946992 A1	23-09-1999			
WO 9626218	A	29-08-1996	AU	706774 B2	24-06-1999
			AU	4659796 A	11-09-1996
			WO	9626218 A1	29-08-1996
			CA	2213301 A1	29-08-1996
			EP	0815136 A1	07-01-1998
JP	11500719 T	19-01-1999			
EP 1026238	A	09-08-2000	EP	1026238 A2	09-08-2000
			AT	207537 T	15-11-2001
			AU	661684 B2	03-08-1995
			AU	1516392 A	24-12-1992
			CA	2070004 A1	19-12-1992
			DE	69232147 D1	29-11-2001
			DK	519469 T3	10-12-2001
			EP	0519469 A1	23-12-1992
			ES	2165350 T3	16-03-2002
			JP	7070182 A	14-03-1995
			KR	262247 B1	15-07-2000
			US	5674978 A	07-10-1997
			US	5475086 A	12-12-1995
			US	6011139 A	04-01-2000
			US	5846740 A	08-12-1998
US	5705626 A	06-01-1998			
US	5998366 A	07-12-1999			
WO 0134645	A	17-05-2001	AU	1599301 A	06-06-2001
			WO	0134645 A2	17-05-2001

Form PCT/ISA210 (patent family search) (July 1999)

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 43/00	C 0 7 K 14/54	4 H 0 4 5
C 0 7 K 14/54	C 0 7 K 19/00	
C 0 7 K 19/00	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 N 5/10	A 6 1 K 37/02	
C 1 2 P 21/02	C 1 2 N 5/00	A

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74) 代理人 100096183

弁理士 石井 貞次

(74) 代理人 100118773

弁理士 藤田 節

(72) 発明者 アシュマン, クレア

イギリス国 ハートフォードシャー エスジ-1 2 エヌワイ, スティーブネージ, ガンネルズ
ウッド ロード, グラクソスミスクライン

(72) 発明者 クロウ, ジェームズ, スコット

イギリス国 ハートフォードシャー エスジ-1 2 エヌワイ, スティーブネージ, ガンネルズ
ウッド ロード, グラクソスミスクライン

(72) 発明者 エリス, ジョナサン, ヘンリー

イギリス国 ハートフォードシャー エスジ-1 2 エヌワイ, スティーブネージ, ガンネルズ
ウッド ロード, グラクソスミスクライン

(72) 発明者 ルイス, アラン, ピーター

イギリス国 ハートフォードシャー エスジ-1 2 エヌワイ, スティーブネージ, ガンネルズ
ウッド ロード, グラクソスミスクライン

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA26 CA02 HA17

4B064 AG03 CA19 CC24 DA01

4B065 AB01 BA02 CA45

4C084 AA01 AA02 AA13 BA02 BA35 CA17 CA41 CA53 DA12 DA16

MA02 NA05 ZA591 ZB131 ZC751

4C087 AA01 BC83 NA01

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA20 BA41 CA40 DA02 DA86 EA31

FA74