

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 15/24

C07K 14/47 C07K 14/54

A61K 39/00



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02809324.0

[43] 公开日 2004 年 11 月 3 日

[11] 公开号 CN 1543504A

[22] 申请日 2002.3.1 [21] 申请号 02809324.0

[30] 优先权

[32] 2001.3.3 [33] GB [31] 0105360.2

[86] 国际申请 PCT/GB2002/000900 2002.3.1

[87] 国际公布 WO2002/070711 英 2002.9.12

[85] 进入国家阶段日期 2003.11.3

[71] 申请人 葛兰素集团有限公司

地址 英国梅得塞克斯

[72] 发明人 C·阿斯曼 J·S·克罗维

J·H·埃利斯 A·P·路易斯

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 刘 玥 孟凡宏

权利要求书 3 页 说明书 39 页 序列表 9 页
附图 13 页

[54] 发明名称 疫苗

[57] 摘要

本发明涉及一种可用于对自身抗原免疫的分离的多肽。具体地讲,本发明涉及一种自身蛋白,在体内施用,该蛋白能够产生自身抗体。本发明特别涉及使人类细胞因子在人体内具有免疫原性。本发明还涉及含有所述化合物的药用组合物,及其在药物中的用途,并且涉及其生产方法。

```

5  GAGCGGCTGCAAGATCTGATCTCTCTTAACTTATGAGGACTCTATGAGACTG  60
  1  .....
  O P V P R S V S L D L T E R R L L R R L
19  CTGACATGACAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG  120
  61  .....
  E N I T O D Q T P L C W G S M V W V E
15  CTGGGCTGGGAGCTGTCAGCTGATGATCTGATGATGATGATGATGATGATGAT  180
  121  .....
  L A A G Q T C A A A S L S T R I S C F
20  GCGCTGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG  240
  181  .....
  A L R R T G R M L S G L C M R K A D T T
25  CTCTCGGCTGCGGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG  300
  241  .....
  V S S L P D T K I R Y A Q P V X H L S
30  TACAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG  360
  321  .....
  T T K O S P R E G D V A

```

```

5  23  .....  0
  W L T S G L P P P L A C A R E P F S
1  .....  24
  R E K T F I L E L F I G A G G T G S T
10 25  .....  48
  C S L C Y T D L F A A F P F T E S T A C S
15 49  .....  72
  A R K G L L E P L A G G P F G A N T E
20 73  .....  96
  R E V T E S G L P A L F C C Q A G A C
25 87  .....  120
  P Y K A M P S G L P F T S A S T T M S
30 121 125
  T A R T S E

```

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

1. 一种与人类蛋白具有至少 30%，但不低于 100%的相同性的分离的蛋白，所述多肽

(a)包括至少一种突变，该突变是类似的非人类蛋白所特有的；和

5 (b)能够在人体内产生抗体；

(c)在结构上与所述人类蛋白足够相似，使得所述抗体能结合所述人类蛋白和所述多肽；并且

其中，所述多肽不是抗体。

2. 一种蛋白，具有来自哺乳动物自身抗原的 B 细胞表位和来自另一种哺乳动物的能产生类似蛋白的序列的突变，使得所述蛋白能够在产生所述 B-细胞表位的物种中产生能识别产生所述 B-细胞表位的天然蛋白的免疫反应。

3. 一种具有自身蛋白的 B 细胞表位的蛋白，它通过替换而移植到另一种哺乳动物的类似蛋白的构架上，使得所述蛋白能够在产生所述 B 细胞表位的物种中产生能识别产生所述 B-细胞表位的天然蛋白的免疫反应。

4. 如权利要求 1-3 中任意一项的蛋白，包括导入非表面暴露区的保守的表面区，所述突变能产生类似蛋白的序列，使得所述蛋白能在产生所述自身蛋白的物种中产生针对自身蛋白的免疫反应。

20 5. 如权利要求 1-4 中任意一项的蛋白，其中所述免疫反应是中和抗体反应。

6. 如权利要求 1-5 中任意一项的蛋白，其中所述人类蛋白或 B-细胞表位来自细胞因子。

7. 如权利要求 6 的细胞因子，它是 4 螺旋细胞因子。

25 8. 如权利要求 7 的细胞因子，它是 IL-4 或 IL-13。

9. 一种突变的人 IL-13，它具有一个或多个下列取代或与其保守性取代相关的取代：

第 30 位 R → K

第 37 位 V → S

30 第 63 位 Y → F

第 65 位 A → V

第 68 位 E → D

第 80 位 E → Y

第 81 位 K → R

第 85 位 M → I

第 87 位 G → H

5 第 113 位 Q → H

第 115 位 V → I

第 117 位 D → K。

10. 如权利要求 9 的突变的人 IL-13,它具有多个权利要求 9 中所给出的取代。

10 11. 如权利要求 9 或 10 中任意一项的突变的人 IL-13,它具有下列序列中的一种或多种

LKELIEELSN

FCVALDSL

AIYRTQRILHG

15 KIEVAHFITKLL

或所述序列的包括一种或多种保守性取代的变体。

12. 如图 9 所示的突变的人 IL-13。

13. 一种编码权利要求 1-12 的蛋白的多核苷酸。

20 14. 如权利要求 13 的多核苷酸,它是 DNA,并且可操作地与启动子连接。

15. 一种载体,包括权利要求 13 或 14 的多核苷酸。

16. 一种用权利要求 13 或 14 的多核苷酸或权利要求 15 的载体转化的宿主。

25 17. 一种药用组合物,包括权利要求 1-15 中任意一项的蛋白、多核苷酸、载体,和可以药用的载体或赋形剂。

18. 如权利要求 17 的药用组合物,还包括佐剂。

19. 如权利要求 18 的药用组合物,包括权利要求 1-12 中任意一项的蛋白和免疫刺激寡核苷酸。

30 20. 如权利要求 19 的药用组合物,其中所述免疫刺激寡核苷酸选自:

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

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)

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

21. 权利要求 1-20 中任意一项的蛋白、多核苷酸、载体、宿主或组
合物，用于医学目的。

10 22. 权利要求 1-12 中任意一项的蛋白在制备用于治疗 IL-13 介导的
疾病的药品中的用途。

23. 如权利要求 22 的用途，其用于治疗哮喘。

24. 一种治疗或预防 IL-13 介导的疾病的方法，包括给需要治疗或
预防的患者施用安全有效量的权利要求 17-20 中任意一项的组合物。

15 25. 一种用于制备权利要求 1-12 中任意一项的蛋白的方法，该方法
包括：

(1) 鉴定需要针对它的抗体反应的自身蛋白，通常是人类自身蛋白的
一个或多个区。

(2) 鉴定所述自身蛋白的氨基酸序列。

20 (3) 鉴定类似蛋白的氨基酸序列，通过重组 DNA 技术构建包含在步
骤 1 中鉴定的至少一个目标区的嵌合分子，其氨基酸序列来自在步骤 2
中所鉴定的序列，和

来自在步骤 3 中鉴定的序列的足够的氨基酸，使得所得到的蛋白能
够折叠成类似于所述自身蛋白的形状，这样，突变蛋白能产生识别所述
自身蛋白的免疫反应。

25

疫苗

5 本发明涉及一种可用于对自身(self)抗原免疫的分离的多肽。具体地讲,本发明涉及一种自身蛋白,在体内施用时,该蛋白能够产生自身抗体。本发明特别涉及使人类细胞因子在人体内具有免疫原性。本发明还涉及含有所述化合物的药用组合物,及其在药物中的用途,并且涉及其生产方法。

10

背景技术

哮喘是由下呼吸道炎症引起的慢性肺病,并且以反复发作的呼吸问题为特征。患者的呼吸道是敏感的,并且一直存在某种程度的肿胀或炎症,即使是在没有症状时也是这样。炎症会导致呼吸道变窄,并且减弱流入和流出肺部的气流,使得呼吸困难,并且导致喘息、胸部压迫和咳嗽。哮喘是由对过敏原(例如尘螨、花粉、霉菌)、刺激剂(例如火、烟气、强烈气味)、呼吸道感染、运动和干燥天气的过敏性引起的。所述诱发原因刺激呼吸道和呼吸道衬里,使其肿胀加重炎症,随后黏液会堵塞呼吸道,并且呼吸道周围的肌肉收紧,直到呼吸变得困难和窘迫,并且出现哮喘症状。

20 COPD 是用于描述呼吸道疾病的涵盖式术语(umbrella term),这种疾病表现出类似于哮喘的症状,并且是用相同的药物治疗的。COPD 的特征是慢性、渐进的、和大部分不可恢复的气流障碍。个体对这种病的发展过程的作用尚属未知,不过有人认为这种病 90%是由吸烟引起的。其症状包括咳嗽、慢性支气管炎、呼吸困难和呼吸道充血。这种病最终会导致严重的残疾和死亡。

与生产、施用和耐受单克隆抗体相关的各种问题的结果是,越来越关注通过免疫接种指导患者自身的免疫系统产生具有合适专一性的内源抗体的方法。不过,哺乳动物在血清中通常没有高效价的抗自身蛋白的抗体,因为其免疫系统包括防止所述抗体形成的稳态机制。诸如重症肌无力的疾病表明了这种耐受机制的重要性,其中,抗骨骼肌

30

的烟酸乙酰胆碱受体的自身抗体引起了虚弱和疲劳(Drachman, 1994, N Engl J Med 330: 1797-1810)。因此, 需要一种能够避开抗体耐受机制, 而又不诱导自身抗体介导病理的接种方法。

业已设计了多种技术, 以破坏 B 细胞耐受性, 而又不必诱导不可接受的自身免疫毒性。不过, 所有这些技术都存在明显缺陷。

一种技术包括将自身蛋白(或由该蛋白衍生的肽)化学交联在诸如匙孔蕨血兰蛋白的强免疫原性载体蛋白上(“Antibodies: A laboratory manual”, Harlow, E and Lane D. 1988. Cold Spring Harbor Press)。该方法是被普遍用于生产抗弱免疫原性靶(如低分子量化合物)的抗体的半抗原载体系统。不过, 化学缀合方法可能破坏具有潜在价值的表位, 并且所引起的很多抗体反应是针对所述载体蛋白的。另外, 该方法仅适用于蛋白免疫接种, 并且与核酸免疫原不兼容。

载体蛋白技术的一种变化形式, 包括构建编码包括载体蛋白(例如乙型肝炎病毒蛋白核心蛋白)和自身蛋白的融合蛋白的基因(“作为免疫原性肽的载体的乙型肝炎病毒的核心抗原”, Biological Chemistry. 380 (3): 277-83, 1999)。所述融合基因可以作为核酸疫苗的一部分直接施用, 或者, 它可以在合适的宿主细胞中在体外表达, 纯化所述基因产物, 然后作为常规疫苗给药, 使用或不使用佐剂。不过, 将大的载体蛋白融合在自身蛋白上, 可能限制或改变自身蛋白的构象, 减弱其诱导能与天然分子发生交叉反应的抗体的效率。另外, 与传统交联载体系统相似, 很多抗体反应是针对融合体的载体部分的。抗载体反应可能限制随后加强施用疫苗的效果或增加过敏反应的机会。

Dalum 和同事披露了一种更精细的方法, 其中, 将单一的 II 型 MHC-限制表位插入靶分子上。他们证实了用该方法能诱导抗遍在蛋白(Dalum 等, 1996, J Immunol 157 : 4796-4804; Dalum 等, 1997, Mol Immunol 34 : 1113-1120)和细胞因子 TNF (Dalum 等, 1999, Nature Biotech 17: 666-669)的抗体。结果, 所有 T 细胞辅助(help)必须来自该单一表位或接合序列。尽管该方法在具有合适 II 型单元型 MHC 的治疗对象体内能很好地发挥作用(所述疫苗是针对这种单元型设计的), 或者事实上所述治疗对象足够幸运地具有能够结合结合表位的 II 型分子, 在任何正常的异族群体中, 如典型的人类群体, 所述疫苗对相当

大比例的群体不起作用。另外，由于所述插入的表位通常来自很不相关的蛋白，如卵白蛋白或溶菌酶，所述额外序列有可能在某种程度上干扰靶蛋白的折叠，阻止所述靶蛋白的全天然构象的形成。

与上述所有技术不同，本发明提供了多种潜在 T 细胞表位，仍然保留了靶分子的接近天然形式的构象。这种特征使得本发明的疫苗可以作为复杂的异族群体，如由人类患者组成的群体的有效免疫原。所述特征是通过在自身蛋白上产生突变，以便在该位点上产生可以在类似蛋白中找到的序列而实现的。

最近的多份论文业已确定了 Th2 细胞因子 IL-13 在启动过敏原性哮喘的卵白蛋白模型的病理学方面的关键作用(Wills-Karp 等, 1998; Grunig 等, 1998)。在本研究中，用能结合并且中和 IL-13 的可溶性 IL-13 受体注射以前对卵白蛋白过敏的小鼠。在治疗组中，被乙酰胆碱刺激的呼吸道过敏反应被完全消除。组织学分析发现，接受治疗的小鼠业已恢复了在对照中出现的杯状细胞组织转化。在互补实验中，通过在转基因小鼠体内的超量表达或通过野生型小鼠的气管中使用蛋白，提高了肺 IL-13 含量。在这两组实验中，都出现了呼吸道过敏反应，嗜曙红性粒细胞入侵和黏膜产生的增加(Zhu 等, 1999)。以上结果表明，IL-13 活性是在成熟的模型中产生过敏性哮喘的若干种主要临床和病理学特征所必需的，并且足以产生这些特征。

因此，能够引起对 IL-13 的中和反应的疫苗构成了一种用于治疗人类过敏性哮喘的有用治疗剂。还可将其用于治疗某些与寄生虫感染相关的疾病(Brombacher, 2000)和 IL-13 的产生与纤维化相关的疾病(Chiaramonte 等, 1999)，如慢性阻碍性肺病。本发明满足了这一需要。

因此，本发明的构思和原理是结合 IL-13 提出的，不过，可应用于另一种物种中的具有类似蛋白的任何哺乳动物自身蛋白。

发明概述

本发明提供了一种与人类蛋白具有至少 30%，但低于(less than) 100%的相同性的分离的多肽，该多肽

(a)包括至少一种突变，该突变是类似的非人类蛋白所特有的；和
(b)能够在人体内产生抗体；和

(c)在结构上与所述人类蛋白足够相似，使得所述抗体能结合所述人类蛋白和所述多肽；和

(d)其中，所述多肽不是抗体。

因此，在一个实施方案中，本发明提供了一种蛋白，其具有来自哺乳动物自身抗原的 B 细胞表位和来自另一种哺乳动物的能产生类似蛋白的序列的突变，使得所述蛋白能够在产生所述 B-细胞表位的物种中产生能识别产生所述 B-细胞表位的天然蛋白的免疫反应。

所述类似蛋白的序列优选超过 5 个，更优选超过 8 个连续的氨基酸。因此，本发明的蛋白包括与类似序列的至少 5 个，优选至少 8 个连续的氨基酸相同的序列。在另一种实施方案中，提供了具有自身蛋白的 B 细胞表位的蛋白，它是通过替换而移植到另一种哺乳动物的类似蛋白的构架上的，使得所述蛋白能够在产生所述 B 细胞表位的物种中产生能识别产生所述 B-细胞表位的天然蛋白的免疫反应。

应当理解的是，本发明的蛋白不是抗体。

所产生的免疫反应优选是抗体反应，最优选是中和抗体反应。

一般地，优选将所述突变导入所述分子的非表面暴露区，使得保留表面暴露区。表面暴露区是免疫系统可以接触的，因此，通常包括 B-细胞表位。因此，本发明提供了一种包括自身蛋白的保守的表面暴露区和导入所述非表面暴露区的突变的蛋白，所述突变能产生一种类似蛋白的序列，使得所述蛋白能产生针对在产生所述自身蛋白的物种中产生的自身蛋白的免疫反应。

所述自身蛋白优选是人蛋白，不过，可以是来自需要在它体内产生自身免疫反应的任何哺乳动物的蛋白。所述免疫反应优选对本发明的天然蛋白和免疫原有专一性。就是说，与其他自身蛋白具有很少的交叉反应性或中和能力。

所述自身抗原优选是细胞因子，更优选是 4 螺旋细胞因子，更优选 IL-4 或 IL-13，最优选 IL-13。因此，在本发明的优选实施方案中，提供了一种包括鼠 IL-13 主链上的来自人 IL-13 的 B 细胞表位的嵌合蛋白。这样一种构建体能够在人体内产生专一性抗 IL-13 抗体反应。在图 9 中示出了这种构建体(seq: ID No 21 和 22)。类似地，在图 13 中示出了包括人 IL-表位区和鼠构架的 IL-4 构建体(Seq ID: No 25)。

本发明还提供了：

- 一种表达载体，它包括本发明的多核苷酸，并且能够表达本发明的多肽；
- 一种包括本发明的表达载体的宿主细胞；
- 5 - 一种生产本发明多肽的方法，该方法包括将本发明的宿主细胞保持在适合使所述多肽表达的条件下，并且分离所述多肽；
- 一种疫苗组合物，包括本发明的多肽或多核苷酸，以及可以药用的载体。

在另一方面，本发明提供了一种设计和制备本发明多肽的方法，
10 该方法包括：

1. 鉴定需要产生针对它的抗体反应的自身蛋白，通常是人类自身蛋白的一个或多个区。
2. 鉴定所述自身蛋白的氨基酸序列。
3. 鉴定类似蛋白的氨基酸序列，通过重组 DNA 技术构建包含在步
15 骤 1 中鉴定的至少一个目标区的嵌合分子，其氨基酸序列来自在步骤 2 中所鉴定的序列，和
来自在步骤 3 中鉴定的序列的足够的氨基酸，使得所得到的蛋白能够折叠成类似于所述自身蛋白的形状，这样，突变蛋白能产生识别所述自身蛋白的免疫反应。

20

附图说明

GST=谷胱甘肽 S-转移酶，rmIL-13 =重组小鼠 IL-13 ， rhIL-13 =重组人 IL-13 ， cIL-13 =嵌合 IL-13

图 1. 小鼠嵌合 IL-13 疫苗构建体的序列。加下划线的氨基酸符号
25 表示人 IL-13 序列，未修饰过的符号来自鼠 IL-13 。

图 2. 通过 4-20%Tris-甘氨酸 SDS-PAGE 凝胶(Novex)分析 GST cIL-13，用考马斯兰对所有蛋白进行染色。

图 3. GST-cIL-13 的 Western 印迹分析。

图 4. cIL-13 和 GST-cIL-13 与抗-mIL-13 多克隆抗体，抗-hIL-13 多
30 克隆抗体和抗-GST 多克隆抗体的相互作用的 ELISA 分析。

图 5. cIL-13 和 GST-cIL-13 与 mIL13 受体，mIL-13R α 1 和 mIL-13R

$\alpha 2$ 的相互作用的 ELISA 分析。

图 6. A549 裂解物的抗-磷酸-STAT6 Western 印迹。

图 7. 通过 GST-cIL-13 (小鼠 F5)或 cIL-13 (小鼠 E5)的免疫诱导的抗体反应。

5 图 8. A549 裂解物的抗-磷酸-STAT6 Western 印迹分析。

图 9. 用于人体的嵌合 IL-13 疫苗。加下划线的氨基酸符号表示存在于鼠 IL-13 中的序列，未修饰过的符号来自人 IL-13。

图 10. 在施用与各种佐剂组合的 cIL-13 之后产生的抗-小鼠 IL-13 抗体曲线。

10 图 11. 在施用 cIL-13 之后小鼠的血清中和能力。

图 12. 用作小鼠免疫原的其他 cIL-13。

图 13. 用于人抗 IL-4 疫苗中的嵌合 IL-4。

发明详述

15 在本说明书和所附权利要求书中，除非文中有其他需要，词语“包括”（“comprise”和“include”或诸如“comprising”，“comprises”，“including”，“includes”等的变化形式），应被理解成是包含性的，就是说这些词语的使用意味着可能包括没有具体引用的整数或因素。

如本文所述，本发明涉及分离的多肽和分离的多核苷酸。在本发明
20 明中，术语“分离的”用于表示所述多肽或多核苷酸不是以它的天然状态存在的，就是说它已经至少被纯化到某种程度或者是通过合成生产的，例如，通过重组方法，或机械合成。因此，术语“分离的”包括所述多肽或多核苷酸与其他生物学或非生物学材料（如细胞、细胞悬浮液或细胞片段、蛋白、肽、表达载体、有机或无机溶剂，或其他合适
25 材料）组合的可能性，但是，排除了所述多核苷酸处于其天然存在状态的情形。

本发明的一个优点是，本发明的多肽包括自身蛋白，例如，人类自身蛋白的、需要针对它的抗体反应的区，所述区与类似蛋白特有的区结合，所述类似蛋白与所述人类蛋白具有足够的差异，以便提供良好的 T 细胞辅助，不过，业已通过演化(evolution)进行过优化，以便折
30 叠成与所述人类蛋白高度类似的形状。由此可以制备能识别所述自身

抗原的抗体。通常，所产生的免疫反应包括产生中和抗体反应。

本发明的人类蛋白可以是由人类基因组编码的完整长度的蛋白，或由人类基因组编码的完整长度蛋白的结构域或亚基。当需要产生针对自身抗原的功能结构域或受体结合结构域的中和抗体时，可以制备
5 仅包括所述区的嵌合抗原。因此，所述结构域的暴露区或所述结构域的 B 细胞表位是保守的，并且将类似蛋白的突变导入所述非 B 细胞表位或暴露结构域。

术语“蛋白”意在包括，例如氨基酸残基的较短的序列，它可能是指肽，如神经肽。所述人类蛋白通常是翻译后修饰的对象，如糖基
10 化、蛋白水解裂解、磷酸化和其他为本领域技术人员所熟知的修饰。所述人类蛋白优选是细胞因子、激素、生长因子或细胞外蛋白，更优选 4-螺旋细胞因子，最优选 IL-13。细胞因子包括例如 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
15 和 OSM。4-螺旋细胞因子包括 IL2、IL3、IL-4、IL5、IL13、GMCSF 和 MCSF。激素包括例如黄体生成素(LH)、促滤泡激素(FSH)、绒毛膜促性腺素(CG)、VGF、GHreltin、刺鼠、刺鼠相关蛋白和神经肽 Y。生长因子包括例如 VEGF。细胞外蛋白包括例如 APP 或 B-淀粉样蛋白。

类似蛋白可以是与所述自身蛋白直向同源或平行同源的蛋白，例
20 如人类蛋白，其中，直向同源蛋白可以向下追踪到不同生物的共同祖先，因此，有可能在不同生物中发挥类似的保守作用。因此，直向同源基因表示在序列上如此相似的基因，它们源于同一个祖先基因，并且因此是不同物种中的等同基因，并且是通过特化由共同的祖先进化而来。特别是对人类来说，所述直向同源蛋白是非人哺乳动物体内的
25 结构上等价的分子。平行同源蛋白是这样一种蛋白，通过复制事件它在特定生物中以一个以上拷贝出现 (Venter, Science; 1336, vol 291; 2001)，它是业已通过基因复制多样化的同源序列（拥有共同的进化祖先）。所述同源蛋白优选是直向同源的。直向同源蛋白通常具有与人类蛋白相同的名称，并且通常发挥相同的功能，例如，鼠 IL-13 是人类
30 IL-13 的直向同源物。所述类似蛋白通常是哺乳动物的或禽类的，例如牛、绵羊、啮齿类（如鼠）、猪、猴、猫科动物、犬类动物或人类。

所述类似蛋白优选是鼠类的。因此,在本发明中,鼠类 IL-13 是人类 IL-13 的类似(或直向同源)蛋白。类似地,猴 IL-4 是人 IL-4 的类似(直向同源)蛋白。

本发明的多肽优选包括一种类似蛋白所特有的 2、3、4、5、6、7、
5 8、9、10、11 或更多种突变。更优选地,所述多肽至少包括三种突变。每一种突变可能是相同或不同类似蛋白所特有的。因此,第一种突变可能是鼠类类似物所特有的,而第二种突变可能是猴类似物所特有的。根据一种特征,所述多肽包括至少三种突变,其中,每一种突变是一种不同的类似物所特有的。不过,每一种突变优选是同一种类似
10 物所特有的。突变是所述蛋白氨基酸序列的一种改变,并且包括,例如,缺失、插入和替换。所述突变优选是替换。优选替换每一个非表面暴露区上的一个以上的氨基酸。

类似蛋白的特征突变是这样一种突变:在对所述人类蛋白进行所述突变之后,它会导致所述人类蛋白的序列更接近所述类似蛋白的序
15 列。例如,当所述人类序列是 ProProArgVal,并且鼠类类似物具有序列 ProProTyrVal 时,所述类似蛋白的突变特征是用 Arg 替换 Tyr。所述突变优选不是在生理状态下,在水溶液中,在天然折叠的活性蛋白的表面残基中的残基上进行的。所述表面残基,特别是形成环状结构的残基,通常是 B 细胞表位,并且优选所有这样的区都是保守的。由此
20 导入的突变,具有破坏所述自身蛋白耐受性的作用,并且在产生所述非突变蛋白的物种中具有免疫原性。

在一个实施方案中,本发明的多肽与人类蛋白,优选在所述人类蛋白的整个长度上的相同性至少为 30%,并且低于 100%。优选所述多肽与所述人类蛋白的相同性至少为 40%,例如至少 50%。更优选,所
25 述多肽与所述人类蛋白的相同性至少为 60%,例如至少 70%。最优选,所述多肽与所述人类蛋白的相同性至少为 85%,例如大约 90%。所述蛋白能够在能识别所述人类蛋白的人体内产生免疫反应。

例如,UWGCG 包提供了 BESTFIT 程序,可以利用该程序计算同源性(例如使用其预设参数)(Devereux 等(1984) *Nucleic Acids Research* 12, p387-395)。可以将 PILEUP 和 BLAST 程序用于计算同源性
30 或排列序列(通常根据其预设参数),例如由 Altschul(1993) *J. Mol. Evol.*

36: 290-300; Altschul 等 (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-10 所披露的。

用于进行 BLAST 分析的软件可以从国家生物技术信息中心公开获得(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。该程序包括首先通过在查询序列上鉴定长度为 W 的短词语, 鉴定高得分序列对(HSPs), 当该短词语与数据库
5 中相同长度的词语比对时, 要么匹配, 要么满足某些阳性阈值得分 T。T 被称作相邻词语得分阈值(Altschul 等, 1990)。所述起始相邻词语作为种子命中, 以便启动寻找包含它的 HSPs 的检索。沿着每一个序列的两个方向延伸所命中的词语, 以便尽可能地提高累计比对得分。当出现以下情况时终止沿每个方向的命中词语的延伸: 累计比对
10 得分从它的最大获得值下降了数量 X; 由于一个或多个负得分残基比对的积累, 所述累计得分下降到零或更低, 或达到了每一个序列的末端。所述 BLAST 程序参数 W, T 和 X 决定了该程序的灵敏度和速度。所述 BLAST 程序使用的预设词语长度(W)为 11, BLOSUM62 评分矩阵(参见 Henikoff 和 Henikoff (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915-
15 10919)比对(B)为 50, 预期值(E)为 10, M=5, N=4, 并且在该程序被用于多核苷酸时比较两种链。

所述 BLAST 算法对两种序列之间的相似性进行统计学分析; 例如, 参见 Karlin 和 Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5787。由 BLAST 算法所提供的相似性的一种指标是最小总可能性(P(N)), 它提供了所述可能性的指标, 通过这种可能性, 在两种核苷酸或
20 氨基酸序列之间有可能发生配对。例如, 如果比较的第一种序列和第二种序列之间的最小总可能性低于大约 1, 优选低于大约 0.1, 更优选低于大约 0.01, 最优选低于大约 0.001 的话, 就认为一种序列与另一种序列类似。

25 例如, 本发明多肽的成功设计可以通过以下方法验证, 当在合适的宿主细胞中表达时, 证实所述多肽采用了与所述自身蛋白的构象足够相似的构象, 所产生的抗体能与所述天然自身蛋白发生交叉反应。这一结果可以使用免疫学技术证实, 如通过 ELISA 结合单克隆或多克隆抗体, 或通过物理化学技术, 如圆二色性, 或通过晶体学技术, 如 X
30 射线晶体学或通过计算机模拟, 或通过本领域技术人员所熟知的多种其他方法。

成功设计的进一步验证可以通过以下方法实现：通过合适的免疫方案，以自身关联(self-context)方式施用所得到的多肽，并且观察能够结合所述诱导蛋白的抗体。可以通过采用重组或纯化天然蛋白的 ELISA 技术评估这种结合，或通过检查所述蛋白对敏感型细胞或组织的作用的生物测定评估。一种特别优选的评估方法是完整宿主中与所述蛋白活性有因果关系的表型，并且确定由本发明方法诱导的抗体的存在是否能调节所述表型。因此，本发明的蛋白能够在产生所述天然蛋白的物种中产生针对天然抗原的抗体。

还可以通过突变对本发明的多肽进行进一步的修饰，例如替换、插入或缺失氨基酸，以便增加希望的特征（如增加有利于纯化的序列标记或提高免疫原性），或去掉不希望的特征（如受体上的不希望的刺激活性）或跨膜结构域。具体地讲，本发明特别涉及有利于纯化的融合配偶体，如聚组氨酸标记或能增强表达的 GST 表达配偶体。

在一个优选实施方案中，提供了一种具有小鼠 IL-13 所特有的下列一种或多种突变或保守性替换的人 IL-13。以下编号涉及在大肠杆菌中表达的具有其信号序列的 IL-13。

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

更优选的是，所述人 IL-13 包括上述突变或其保守性替换中的至少

两个，优选至少 3、4、5、6 或更多个。优选所有十二种突变都存在。

“保守性替换”是这样一种替换，其中，用一种氨基酸替换了具有类似特性的另一种氨基酸，因此，肽化学免疫的技术人员能够预料的是，所述多肽的二级结构和亲水性基本上没有改变。

5 例如，某些氨基酸可以替换一种蛋白结构上的其他的氨基酸，而又不会明显丧失与诸如抗体的抗原结合区或底物分子上的结合位点的结构的相互结合能力。由于正是所述相互作用能力和蛋白的性质决定了蛋白的生物学功能活性，可以在蛋白序列上进行某种氨基酸序列替换，并且理所当然地改变其 DNA 编码序列，并且仍然能获得具有类似
10 特征的蛋白。因此，可以对所披露组合物的肽序列或编码所述肽的相应的 DNA 序列进行各种改变，而又不会明显丧失其生物学用途或活性。

在进行所述改变时，可能要考虑到氨基酸的亲水指数。亲水性氨基酸指数在赋予蛋白的相互作用生物学功能方面的重要性为本领域所
15 普遍了解(Kyte 和 Doolittle, 1982, 被引入本文作为参考)。人们认为，氨基酸的相对亲水特征决定了所得到蛋白的二级结构，这种二级结构又决定了所述蛋白与其他分子，例如酶、底物、受体、DNA、抗体和抗原等的相互作用。根据其疏水性和带电特征，为每一种氨基酸确定了一个亲水指数(Kyte 和 Doolittle, 1982)。所述亲水指数为：异亮氨酸
20 (+4.5)；缬氨酸(+4.2)；亮氨酸(+3.8)；苯丙氨酸(+2.8)；半胱氨酸/胱氨酸(+2.5)；甲硫氨酸(+1.9)；丙氨酸(+1.8)；甘氨酸(-0.4)；苏氨酸(-0.7)；丝氨酸(-0.8)；色氨酸(-0.9)；酪氨酸(-1.3)；脯氨酸(-1.6)；组氨酸(-3.2)；谷氨酸(-3.5)；谷氨酰胺(-3.5)；天冬氨酸(-3.5)；天冬酰胺(-3.5)；赖氨酸(-3.9)和精氨酸(-4.5)。

25 本领域公知的是，某些氨基酸可以被具有类似亲水指数或得分的其他氨基酸所替换，并且仍然能得到具有类似生物学活性的蛋白，即仍然获得了生物学功能上等同的蛋白。在产生所述改变时，优选亲水性指数在 ± 2 范围内的氨基酸替换，更优选 ± 1 范围内的替换，特别优选 ± 0.5 范围内的替换。本领域中还能理解的是，类似氨基酸的替换可以
30 根据亲水性有效进行。美国专利 4,554,101 (在此引入作为参考)指出，由它的相邻氨基酸的亲水性决定的一种蛋白的最大局部平均亲水

性与该蛋白的生物学特征相关。

正如在美国专利 4,554,101 中所披露的,业已为氨基酸残基确定了以下亲水性值:精氨酸(+3.0);赖氨酸(+3.0);天冬氨酸(+3.0±1);谷氨酸(+3.0±1);丝氨酸(+0.3);天冬酰胺(+0.2);谷氨酰胺(+0.2);甘氨酸(0);苏氨酸(-0.4);脯氨酸(-0.5±1);丙氨酸(-0.5);组氨酸(-0.5);半胱氨酸(-1.0);甲硫氨酸(-1.3);缬氨酸(-1.5);亮氨酸(-1.8);异亮氨酸(-1.8);酪氨酸(-2.3);苯丙氨酸(-2.5);色氨酸(-3.4)。可以理解的是,一种氨基酸可以替换具有类似亲水性值的另一种氨基酸,并且仍然能获得生物学等同物,具体地讲,获得免疫学上等同的蛋白。在所述变化中,优选亲水性值在±2范围内的氨基酸替换,更优选在±1范围内的替换,特别优选在±0.5范围内的替换。

如上文所述,氨基酸替换因此通常是基于氨基酸侧链取代基的相对相似性,例如,其疏水性、亲水性、电荷和大小等。考虑了上述各种特征的典型替换为本领域技术人员所熟知,并且包括:精氨酸和赖氨酸;谷氨酸和天冬氨酸;丝氨酸和苏氨酸;谷氨酰胺和天冬酰胺;和缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸。上述替换是优选的保守性替换。

氨基酸替换还可以根据残基在极性电荷、溶解度、疏水性、亲水性和/或两亲性方面的相似性进行。例如,带负电荷的氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸;带正电荷的氨基酸包括赖氨酸和精氨酸;而具有类似亲水性值的具有不带电荷的极性首基的氨基酸包括亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸;甘氨酸和丙氨酸;天冬酰胺和谷氨酰胺;和丝氨酸、苏氨酸、苯丙氨酸和酪氨酸。可以代表保守性变化的其他氨基酸基团包括:(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; 和(5) phe, tyr, trp, his。

在一种优选实施方案中,本发明的突变 IL-13 包括具有一种保守性替换的一种或多种下列序列或其变体:

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

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

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

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

本发明的多肽是由本发明的多核苷酸编码的。本领域技术人员可

5 以通过采用遗传密码方便地确定编码所述多肽的多核苷酸序列。一旦确定了需要的核酸序列，就可以按照实施例中所披露的方法生产具有理想序列的多核苷酸。本领域技术人员能够方便地采用任何需要的参数，如引物和 PCR 条件。本领域技术人员还可以理解的是，由于遗传密码的简并性，可能有一种以上的多核苷酸编码本发明的多肽。

本发明的多核苷酸通常是 RNA，例如 mRNA；或 DNA，例如基因组 DNA、cDNA 或合成 DNA。所述多核苷酸优选是 DNA，特别优选是 cDNA。

10 本发明还提供了一种表达载体，它是包括本发明多核苷酸的核酸构建体。另外，所述核酸构建体包括合适的起始密码子、启动子、增强子和其他因子，例如，聚腺苷酸化信号，这些因子可能是必要的，并且以正确取向定位，以便能够在哺乳动物细胞内进行蛋白表达。

所述启动子可以是真核启动子，例如 CD68 启动子、Gal1、Gal10、或 NMT1 启动子，原核启动子，例如 Tac、Trc 或 Lac 或病毒启动子，15 例如巨细胞病毒启动子、SV40 启动子、多角体蛋白启动子、P10 启动子或呼吸道合胞病毒 LTR 启动子。所述启动子优选是病毒启动子。当所述启动子是巨细胞病毒立即早期启动子时，特别优选的是选择性地包括 HCMV IE 基因的外显子 1。

20 所述转录调控因子可以包括增强子，例如乙型肝炎表面抗原 3' 非翻译区、CMV 增强子，内含子，例如 CD68 内含子或 CMV 内含子 A，或调控区，例如 CMV 5'非翻译区。

在所述核酸构建体上，所述多核苷酸优选可操作地与所述启动子连接，以便在将该构建体插入哺乳动物细胞中时，所述多核苷酸能够表达，产生编码的多肽。所述核酸构建体主链可以是 RNA 或 DNA，例25 如质粒 DNA、病毒 DNA、细菌 DNA、细菌人工染色体 DNA、酵母人工染色体 DNA、合成 DNA。所述核酸构建体还可以是人工核酸，例如硫代磷酸 RNA 或 DNA。所述构建体优选是 DNA。当所述构建体是质粒 DNA 时是特别优选的。

30 本发明还提供了一种包括本发明的表达载体的宿主细胞。所述细胞包括瞬时的、或者优选稳定的高等真核细胞系，如哺乳动物细胞或昆虫细胞，举例来说，所述细胞使用诸如杆状病毒表达系统，诸如酵

母的低等真核细胞或诸如细菌细胞的原核细胞。可以通过插入编码本发明多肽的载体进行修饰的细胞的具体例子包括哺乳动物 HEK293T, CHO, HeLa, NSO 和 COS 细胞。所选择的细胞系优选是这样的细胞系, 它不仅是稳定的, 而且还能进行多肽的成熟糖基化。表达可以在转化过的卵细胞中进行。本发明的多肽可以在转基因非人动物的细胞中进行, 优选在小鼠细胞中进行, 或者表达在诸如山羊、绵羊或牛的大型哺乳动物的乳液中。表达本发明多肽的转基因非人动物包括在本发明的范围内。本发明的多肽还可以在爪蟾卵母细胞中表达。

本发明还包括药用或疫苗组合物, 所述组合物包括治疗有效量的本发明的核酸构建体或多肽, 选择性地与可以药用的载体组合, 优选与可以药用的赋形剂组合, 如磷酸缓冲的盐溶液(如 PBS)、盐水、葡萄糖、水、甘油、乙醇、脂质体或其组合。所述疫苗组合物还可以包括治疗有效量的本发明的核酸构建体, 所述核酸构建体配制在金属珠, 优选金珠上。本发明的疫苗组合物还包括佐剂, 例如, 在一种实施方案中, 包括咪喹莫特(imiquimod)、tucarecol 或明矾。

优选蛋白佐剂制剂, 因为这种制剂能诱导高效价抗体反应。

所述佐剂优选与本发明的(组合物)同时施用, 并且在优选实施方案中, 将其配制在一起。本发明涉及的佐剂包括(但是所列举的佐剂不是穷举性的, 并且不排除其他制剂): 合成咪唑啉, 如咪喹莫特 [S26308, R-837], (Harrison 等, “单独用咪喹莫特或与糖蛋白疫苗组合减轻 HSV 疾病的复发”, *Vaccine* 19: 1820-1826, (2001)), 和 resiquimod [S-28463, R-848] (Vasilakos 等, “免疫反应修饰剂 R-848 的佐剂活性: 与 CpG ODN 比较”, *Cellular immunology* 204: 64-74 (2000)), 在抗原呈递细胞和 T-细胞表面上组成型形式表达的羰基和胺的 Schiff 碱, 如 tucarecol (Rhodes, J.等, “通过共刺激成 Schiff 碱药物治疗加强免疫系统”, *Nature* 377: 71-75 (1995)), 细胞因子, 趋化因子和共刺激分子, Th1 诱导物, 如干扰素 γ 、IL-2、IL-12、IL-15 和 IL-18, Th2 诱导物, 如 IL-4、IL-5、IL-6、IL-10 和 IL-13 和其他趋化因子和共刺激基因, 如 MCP-1、MIP-1 α 、MIP-1 β 、RANTES、TCA-3、CD80、CD86 和 CD40L, 其他免疫刺激导向配体, 如 CTLA-4 和 L-选择蛋白, 细胞程序死亡刺激蛋白和肽, 如 Fas, (49), 合成脂基佐剂, 如 vaxfectin, (Reyes 等, “Vaxfectin

能增强质粒 DNA 免疫的抗原专一性抗体效价，并且保持 Th1 型免疫反应”，Vaccine 19: 3778-3786)，角鲨烯， α -生育酚，聚山梨酯 80，DOPC 和胆甾醇，内毒素，[LPS]，Butler, B., “内毒素，Toll-样受体 4 和天然免疫性的传入分支”，Current Opinion in Microbiology 3: 23-30 (2000)；CpG 寡聚-和二-核苷酸，Sato, Y. 等，“有效皮内基因免疫所需要的免疫刺激 DNA 序列”，Science 273 (5273): 352-354 (1996)。Hemmi, H. 等，“Toll-样受体识别细菌 DNA”，Nature 408: 740-745, (2000)和能诱导 Toll 受体产生 Th1-诱导细胞因子的其他潜在配体，如合成的分支杆菌脂蛋白、分支杆菌蛋白 p19、肽基聚糖、磷壁酸和脂 A。

10 用于诱导主要为 Th1-型反应的某些优选佐剂包括，例如脂 A 衍生物，如单磷酸脂 A，或优选 3-脱氧乙酰化单磷酸脂 A。MPL[®]佐剂是由 Corixa 公司出售的(Seattle, WA; 例如，参见美国专利号 4,436,727; 4,877,611; 4,866,034 和 4,912,094)。含有 CpG 的寡核苷酸（其中，CpG 二核苷酸是非甲基化的）同样能诱导主要 Th1 反应。所述寡核苷酸为
15 本领域所公知，并且披露于以下文献中：例如 WO 96/02555、WO 99/33488 和美国专利 6,008,200 和 5,856,462。例如，还披露了免疫刺激 DNA 序列，Sato 等，Science 273: 352, 1996。另一种优选佐剂包括皂苷，如 Quil A 或其衍生物，包括 QS21 和 QS7 (Aquila Biopharmaceuticals Inc., Framingham, MA); 七叶树皂苷；毛地黄皂苷；或翟麦或
20 Chenopodium quinoa 皂苷。

本发明还提供了治疗或预防 IL-13 介导的疾病、与它相关的任何症状或疾病的方法，包括施用有效量的本发明的蛋白、多核苷酸、载体或药用组合物。药用组合物的施用可以采用一个或多个单位剂量形式，例如采用“启动加强”免疫方案。在某些场合下，“启动(prime)”
25 免疫可以通过粒子介导的 DNA 输送方法输送本发明的多核苷酸，优选整合到质粒衍生的载体上，并且通过施用包括相同核苷酸序列的重组病毒载体“加强”，或者用存在于佐剂中的所述蛋白加强。相反，所述启动可以采用病毒载体或采用蛋白制剂，蛋白制剂通常是用佐剂配制的蛋白，并且用本发明的 DNA 疫苗加强。

30 为了治疗自身抗原，例如 IL-13 介导的疾病，所述佐剂优选是 TH-1 反应的优选诱导物。具体地讲，所述佐剂包括免疫刺激 CpG 寡核苷酸，

如在 W096102555 中所披露的。典型的免疫刺激寡核苷酸的长度为 8-100 个碱基，并且包括通式 X_1CpGX_2 ，其中， X_1 和 X_2 是核苷酸碱基，而 C 和 G 是未甲基化的。

用于本发明佐剂或疫苗中的优选寡核苷酸优选包括两个或两个以上二核苷酸 CpG 基序，优选由至少三个基序隔开，更优选 6 或 6 个以上核苷酸。本发明的寡核苷酸通常是脱氧核苷酸。在一种优选实施方案中，所述寡核苷酸的核苷酸间是二硫代磷酸酯，或者更优选硫代磷酸酯键，同样属于本发明范围的磷酸二酯和其他内部核苷酸键包括具有混合的核苷酸间连键的寡核苷酸。例如，混合的硫代磷酸酯/磷酸二酯。可以采用能稳定寡核苷酸的其他核苷酸间键。用于生产硫代磷酸酯寡核苷酸或二硫代磷酸酯的方法披露于以下文献中：US5,666,153, US5,278,302 和 W095/26204。

优选寡核苷酸的例子具有以下序列。所述序列优选包括硫代磷酸酯修饰过的核苷酸间连键。

15

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)

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

其他 CpG 寡核苷酸可以包括上述优选序列，其中，所述序列是不连续地缺失或添加上去的。本发明所使用的 CpG 寡核苷酸可以通过本领域已知的任何方法合成(例如 EP468520)。通常，所述寡核苷酸可以用自动合成仪合成的。含有 CpG 寡核苷酸的佐剂制剂可以以“ImmunEasy”商品名从 Qiagen 公司购买。

本发明的组合物可用于预防和治疗。本发明提供了用于医疗的本发明的多肽或多核苷酸。本发明还提供了将本发明的多肽或多核苷酸用于生产用来治疗过敏、诸如哮喘和 COPD 的呼吸道疾病、与寄生虫感染相关的疾病、肝脏纤维化或硬化的药品的用途。

30 本发明还提供了一种免疫方法，该方法包括给患者施用有效量的

本发明的疫苗组合物，并且诱导针对所述疫苗组合物的免疫反应。

本发明还提供了本文所披露的疫苗组合物，用于使哺乳动物对 IL-13 介导的疾病（如过敏、呼吸道疾病、与寄生虫感染相关的疾病、肝脏纤维化和硬化）进行免疫。呼吸道疾病包括例如哮喘，如过敏性哮喘，和慢性阻碍性肺病（COPD）。具体地讲，能够诱导针对 IL-13 的中和反应的疫苗组合物，可以构成一种用于治疗哮喘，特别是人类过敏性哮喘的有用治疗剂。它还可用于治疗某些与寄生虫感染相关的疾病(Brombacher, 2000 Bioessays 22: 646-656)和 IL-13 的生产与纤维化相关的疾病 (Chiaromonte 等, 1999, J Clin Inv 104: 777-785)，如慢性阻碍性肺病(COPD)和肝硬化。

本发明的疫苗组合物可以通过多种方法施用，例如通过黏膜，如口腔和鼻腔；肺、肌内、皮下或皮内途径。当所述抗原要以蛋白型疫苗施用，所述疫苗通常是用一种佐剂制备的，并且可以冷冻干燥，并且在使用之前重新悬浮在水中，以便注射。所述组合物可以作为注射组合物给个体施用，例如，作为无菌水分散液，优选等渗分散液。通常，所述组合物是肌内施用的，不过，其他施用途径也是可行的。

皮内施用的一种技术包括粒子轰击（它又被称为‘基因枪’技术，并且披露于美国专利 5371015 中）。蛋白可以与糖类配伍，以便形成小的颗粒，或者可以将编码所述抗原的 DNA 包衣在惰性颗粒上（如金颗粒），并且以能够使它穿透受体（例如皮肤）表面的速度加速，例如，通过一个发射装置在高压下通过发射加速（用本发明的核酸疫苗构建体包衣的颗粒和蛋白糖类颗粒属于本发明的范围，在所述装置上加载所述颗粒）。将含有所述构建体的核酸构建体或组合物直接施用到受体内的其他方法包括超声波、电刺激、电穿孔和微量接种，这些方法披露于 US5,697,901 中。

本发明的核酸构建体还可以通过用于基因治疗中的特殊输送载体施用。例如，基因治疗方法披露于以下文献中：Verme 等，Nature 1997,389: 239-242。可以使用病毒和非病毒系统。基于病毒的系统包括逆转录病毒、慢病毒、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒和基于痘苗病毒的系统。非病毒型系统包括直接施用核酸和脂质体型系统。例如，所述载体可以用脂质体胶囊化，或者包裹在聚交酯共-乙交酯(PLG)颗粒

中。

本发明的核酸构建体还可以通过转化过的宿主细胞施用。所述细胞包括从受治疗对象体内收获的细胞。可以在体外将所述核酸疫苗构建体导入所述细胞，并且随后将转化过的细胞送回所述受治疗对象。

- 5 可以通过同源重组事件，将本发明的核酸构建体整合到业已存在于细胞中的核酸中。如果需要，转化过的细胞可以在体外生长，并且将一个或多个所得到的细胞用于本发明。可以通过已知的手术或显微手术技术（例如移植、显微注射等）将细胞提供给患者体内的合适部位。合适的细胞包括树状细胞。

- 10 所输送的疫苗组合物的量可以有显著变化，使用量取决于要免疫的哺乳动物物种和体重，要治疗/预防的疾病状态的性质，所采用的免疫方案（即一次施用与重复剂量），施用途径以及所选择的佐剂化合物的效力和剂量。根据上述变量，医生或兽医师可以方便地确实合适的剂量水平，不过，举例来说，当所述疫苗是核酸时，所述剂量为 0.5-5
15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 所述核酸构建体或含有该核酸构建体的组合物。具体地讲，所述剂量可以根据施用途径而改变。例如，在使用包衣在金珠上的方式皮内施用时，总剂量优选为 $1\ \mu\text{g}$ - 10ng ，特别优选的剂量是 $10\ \mu\text{g}$ - 1ng 。当直接施用所述核酸构建体时，所述总剂量通常更高，例如 $50\ \mu\text{g}$ - 1mg 或更高。上述剂量是一般情况的代表。

- 20 在蛋白疫苗中，每一种疫苗剂量中的蛋白数量是经过选择的，该用量可以在典型的接种疫苗者体内诱导免疫保护反应，而又不会出现明显的、不利副作用。所述用量可以根据所使用的特定免疫原以及提供免疫原的方式而改变。一般，预计每一个剂量包括 1 - $1000\ \mu\text{g}$ 蛋白，
25 优选 1 - $500\ \mu\text{g}$ ，优选 1 - $100\ \mu\text{g}$ ，最优选 1 - $50\ \mu\text{g}$ 。可以通过标准研究确定特定疫苗的最佳用量，包括观察免疫对象体内的合适的免疫反应。在初步接种之后，受治疗对象可以接受适当间隔开的一次或若干次加强免疫。所述疫苗制剂可以是启动免疫方案或加强免疫方案；可以是系统施用的，例如通过皮内、皮下或肌肉途径，或通过诸如鼻腔或口腔的途径用于黏膜表面上。

- 30 当然，可能存在需要更高或更低剂量的个别情况，并且这种情况属于本发明的范围。

对于所述疫苗组合物来说，施用可以是一次性的或者反复施用，例如，施用 1-7 次，优选 1-4 次，间隔时间为大约 1 天-大约 18 个月，优选间隔 1 个月。在此之后，可以以 1-12 个月的有规律的间隔用药，直到患者生命的终结。在一种实施方案中，所述患者可以通过启动加
5 强方案接受不同形式的抗原。因此，举例来说，一种抗原首先是以 DNA 型疫苗施用的，然后以蛋白佐剂型制剂施用。不过，这种治疗方案同样会根据相关动物的体形和种类，所施用的核酸疫苗和/或蛋白组合物的量、施用途径、所使用的任何佐剂化合物的效力和剂量以及对兽医
10 师和医师来说显而易见的其他因素而有很大变化。

以下实施例在小鼠中而不是在人体中证实了本发明的理论，因此所述蛋白是具有人类蛋白突变特征的鼠类蛋白，不过，有关结果可方便地外推用于治疗人类，其中，所述蛋白将具有带有鼠类突变特征的人类 B 细胞表位，或其他类似蛋白。

在本发明的以下实施例中，利用了分子和细胞生物学领域普遍公
15 知和采用的技术。所述技术的操作细节可以在多种教科书中查阅到，包括 Sambrook 等 (1989, 2nd edition. Cold Spring Harbor Press: New York)。氨基酸序列或名称以一字母代码或三字母代码形式提供。前缀 ‘h’ 用于表示来源于人的蛋白或基因，‘m’ 表示来源于鼠类，而 ‘c’ 表示嵌合结构，‘r’ 被用于表示重组蛋白。

20

实施例

1. 抗鼠类 IL-13 疫苗的设计

IL-13 属于 SCOP (Murzin 等, 1995, J Mol Biol 247 : 536-540) 定义的 4 螺旋细胞因子折叠家族。该折叠超家族的每一个成员在结构上相
25 关，但是在序列水平上难于比较。IL-13 的三维结构尚未确定，不过，业已确定了多种其他 4 螺旋细胞因子的结构。业已对 IL-13 直向同源物进行了蛋白的多种序列比对，并且还比对了具有该折叠的多种其他细胞因子，其中，业已决定了至少一个成员的结构(IL-4, GM-CSF, IL-5 和
30 IL-2)。用 DSC (King 和 Sternberg, 1996, Prot Sci 5 : 2298-2310), SIMPA96 (Levin, 1997, Prot Eng 7: 771-776)和 Pred2ary (Chandonia 和 Karplus, 1995, Prot Sci 4 : 275-285)对 IL-13 蛋白多种序列比对进行了二级结构预

测。利用序列信息和结构信息（来自已知的晶体结构和来自二级结构预测），对单个细胞因子蛋白多种序列比对彼此之间进行排比。

利用 Camelion 软件(Oxford Molecular)推测鼠 IL-13 的抗原位点，特别是 B-细胞表位，并且利用蛋白多种序列比对将该位点在 IL-4 结构上作图（在 Brookhaven 数据库中的登记号为 1 RCB），以便提供它们将定位在 IL-13 上的何种结构部位的信息。通过上述分析，筛选了有可能具有抗原性，并且参与受体结合的暴露区。

根据这一模型，设计了一种嵌合 IL-13 序列，其中，所推测的抗原环的序列来自鼠 IL-13，而所述推测的结构（主要是螺旋形）区的序列来自人 IL-13。该设计的目的是鉴定来自鼠 IL-13 的靶表位，可能产生针对该表位的中和抗体，并且将其提供给在结构上类似于天然蛋白的构架，不过它相对（鼠）仍然包括足够的序列变异，以便确定存在一个或多个 CD4T 辅助表位。在图 1 中示出了为嵌合 IL-13 疫苗的这种例子而筛选的核酸和蛋白序列(SEQ ID NO 19 和 20)。加下划线的序列相当于存在于人类直向同源物中的序列。为了获得图 1 中的序列，替换了 12 个氨基酸。应当理解的是，遗传密码的简并性使得很多可能的遗传序列能编码相同的蛋白。另外，应当理解的是，在本发明范围内存在其他可能的嵌合 IL-13 疫苗设计，这些设计在非暴露区具有其他直向同源突变。

20

1.2 嵌合 IL-13 的制备

用一系列部分重叠的 DNA 寡核苷酸合成嵌合 IL-13(cIL-13)DNA 序列，所述寡核苷酸具有表 1 所示的序列 cIL-13-1 至 cIL-13-6。对所述寡聚体进行退火，并且通过 PCR 制备 IL-13 DNA，采用以下循环方案：94°C 1 分钟，随后进行 25 轮 94°C 30 秒，55°C 1 分钟，和 72°C 2 分钟。然后在 72°C 下进行 7 分钟，结束时冷却至 4°C。所述反应产物构成了预期大小为 361bp 的带，将其亚克隆到 T/A 克隆载体 pCR2.1 (Invitrogen, Groningen, Netherlands) 中，并且制备 pCR2.1-cIL-13。然后将来自 pCR2.1-cIL-13 的 BamH1 和 Xho1 cIL-13 消化片段亚克隆到 pGEX4T3 的 BamH1 和 Xho1 位点上(Amersham Pharmacia, Amersham, Bucks, UK)，产生 pGEX4T3-cIL-13/1。在对 pGEX4T3-cIL-13/1 构建体进行测

30

序时，我们发现了一个位于 GST 和 cIL-13 之间的额外的具有 39bp 的 DNA 序列（来自 pCR2.1 载体）。为了纠正它，我们使用 pGEX4T3-cIL-13/1 和引物 cIL-13Fnew 和 cIL-13R 重复进行 cIL-13 的 PCR。然后利用 BamH1 和 Xho1 限制位点将所获得的 PCR 产物重新克隆到 pGEX4T3 上，以便产生表达载体 pGEX4T3-cIL-13。通过双脱氧终止测序证实该构建体的序列。该载体编码一种遗传融合蛋白，该蛋白包括谷胱甘肽-S-转移酶和 cIL-13 (GST-cIL-13)。所述蛋白的这两部分是通过一个短的间隔片段连接的，该间隔片段包括凝血酶的识别位点。所述融合蛋白可以通过谷胱甘肽琼脂糖凝胶亲和层析方便地纯化，然后直接使用，或使用通过用凝血酶裂解生产的无 cIL-13 的制剂。

表 1.用于构建嵌合 IL-13 的寡核苷酸。

寡聚体	序列(5'-3')
cIL-13-1R (SEQ ID NO 10)	TGTGATGTTGACCAGCTCCTCAATGAGCTCCCTA AGGGTCAGAGGGAGAGACACAGATCTTGGCAC CGGCCC
cIL-13-2F (SEQ ID NO 11)	AGGAGCTGGTCAACATCACACAAGACCAGACTC CCCTGTGCAACGGCAGCATGGTATGGAGTGTGG ACCTGGC
cIL-13-3R (SEQ ID NO 12)	GCAATTGGAGATGTTGGTCAGGGATTCCAGGGC TGCACAGTACCCGCCAGCGGCCAGGTCCACACT CCATAC
cIL-13-4F (SEQ ID NO 13)	TGACCAACATCTCCAATTGCAATGCCATCGAGA AGACCCAGAGGATGCTGGGCGGACTCTGTAACC GCAAGGC
cIL-13-5R (SEQ ID NO 14)	AAACTGGGCCACCTCGATTTTGGTATCGGGGAG GCTGGAGACCGTAGTGGGGGCCTTGC GGTTACA GAGTCC
cIL-13-6F (SEQ ID NO 15)	AAATCGAGGTGGCCCAGTTTGTAAGGACCTGC TCAGCTACACAAAGCAACTGTTTCGCCACGGCC CCTTC

cIL-13F (SEQ ID NO 16)	CGCGGATTCGGGCCGGTGCCAAGATCTG
cIL-13R (SEQ ID NO 17)	CTCCGCTCGAGTCGACTTAGAAGGGGCCGTGGC GAAA
cIL-13Fnew (SEQ ID NO 18)	CGCGGATCCGGGCCGGTGCCAAGATCTG

将 pGEX4T3-cIL-13 表达载体转入大肠杆菌 BLR 菌株中 (Novagen, 由 Cambridge Bioscience 提供, Cambridge, UK)。在对数生长期, 通过向培养液中添加 0.5 mM IPTG, 在 37°C 下用 4 小时诱导 GST-cIL-13 表达。然后通过离心收获细菌, 并且通过以前所披露的用于纯化类似的 GST-人 IL-13 融合蛋白的方法 (McKenzie 等, 1993, Proc Natl Acad Sci 90: 3735-3739) 纯化 GST-cIL-13。

cIL-13 特性的表征

10 通过 SDS-PAGE 电泳分析纯化的 GST-cIL-13 样品。图 2 表示纯化的制剂含有 GST-cIL-13 的预期大小的蛋白。靠下面的带表示少量的 GST, 它是由在制备期间所述融合蛋白的部分裂解而产生的。

为了证实所纯化的蛋白是 GST-cIL-13, 通过 SDS-PAGE 分离样品, 吸印到 PVDF 膜上, 然后通过 Western 印迹分析 IL-13 的存在和 GST 免疫反应性。由于 cIL-13 包括来自人和鼠 IL-13 的序列, 预计它会被针对人 IL-13 或鼠 IL-13 的抗血清识别。在含有 0.05% Tween-20 的 TBS (50mM Tris hydrochloride, 138mM 氯化钠, 2.7mM 氯化钾, pH8.0) (TBST) 中, 在 4°C 下, 用 3% 牛血清白蛋白 (BSA) 封闭印迹, 在室温下 (RT) 与一级抗体一起摇晃培养 1 小时, 然后用 TBST 洗涤 4 次。添加二级抗体, 在室温下摇晃培养 1 小时。然后洗涤 4 次, 然后用 SuperSignal Chemiluminescent Reagent (Pierce, Rockford, Illinois, USA) 显影。

25 图 3 (注释见下文) 表示该分析的结果。分析表明, 所纯化的蛋白能被抗人 IL-13、鼠 IL-13 和 GST 的抗体识别, 因此证实了其预期结构。

泳道	样品	一级抗体
1	GST-cIL-13	抗 mIL-13
2	rhIL-13	抗 mIL-13
3	rmIL-13	抗 mIL-13
4	标记物	-
5	GST-cIL-13	抗 hIL-13
6	rhIL-13	抗 hIL-13
7	rmIL-13	抗 hIL-13
8	标记物	-
9	GST-cIL-13	抗 GST
10	rhIL-13	抗 GST
11	rmIL-13	抗 GST
12	GST	抗 GST

用于本实验的一级抗体是：抗-hIL-13，产品目录号 AF-213-NA, R & D Systems, Abingdon, Oxford, UK，用量为 $1 \mu\text{g/ml}$ ；抗-mIL-13，产品目录号 AF-413-NA, R & D Systems，用量为 $1 \mu\text{g/ml}$ ，和抗-GST，产品目录号 27-4590D, Pharmacia，以 1/200 的比例使用。在本实验中所使用的二级抗体是：HRP-缀合的抗-山羊 IgG，产品目录号 A5420, Sigma-Aldrich 有限公司，Poole, Dorset, UK，以 1/40,000 的比例使用。

所述蛋白样品是按例 2 所述方法制备的 GST-cIL-13，重组人 IL-13 (rhIL-13)，产品目录号 CH1-013, Cambridge Bioscience, Cambridge, UK，重组鼠 IL-13 (rmIL-13) 产品目录号 413-ML-025, R & D Systems，和 GST，它是按已知方法用由空的 pGEX4T3 载体转染过的大肠杆菌制备的(Sambrook 等, 1989, 2nd edition. Cold Spring Harbor Press: New York)。

15

1.3 嵌合 IL-13 的构象

为了证实溶液中的 GST-cIL-13 采用了类似于天然 IL-13 的构象，通过 ELISA 分析了 GST-cIL-13 和 cIL-13 样品（通过凝血酶裂解由

GST-cIL-13 制备)。在 4℃ 下用溶解在碳酸盐-碳酸氢盐缓冲液中的 cIL-13, GST-cIL-13, mL-13, hIL-13 或 gst 对 96 孔 Maxisorp 平板(Life Technologies Ltd, Paisley, UK)进行包衣过夜。然后在室温下用 3%BSA/TBST 封闭所述平板 1 小时,用 TBST 洗涤 3 次,在室温下与一级抗体一起培养 1 小时,然后用 TBST 洗涤 3 次。添加二级抗体培养 1 小时时间,用 TBST 洗涤 3 次,然后用邻苯二胺二氢氯化物过氧化物酶底物(OPD, Sigma Aldrich)显影 30 分钟。用于本实验中的一级和二级抗体如上文所述。如图 4 所示, GST-cIL-3 和 cIL-13 能够被抗人 IL-13 和鼠 IL-13 的抗体专一性识别。以上结果证实,所述嵌合过程没有明显改变所述蛋白的构象。

1.4 嵌合 IL-13 与受体的结合

为了证实 cIL-13 是否能结合任意一种已知的鼠 IL-13 受体 (mIL-13R1 或 mIL-13R2),进行了 ELISAs。在 4℃ 下用溶解在碳酸盐-碳酸氢盐缓冲液中的抗人 IgG(产品目录号 1-3382, Sigma Aldrich)对 96 孔 Maxisorp 平板进行包衣过夜。然后在室温下用 3%BSA/TBST 封闭平板 1 小时,用 TBST 洗涤 3 次,并且在室温下与 mIL-13R1-Fc 或 mIL-13R2-Fc (产品目录号分别为 491-IR-200 和 539-IR-100, R+D Systems)一起培养 1 小时。在洗涤之后,在室温下用 mL-13 或 cIL-13 或 GST-cIL-13 的稀释液培养平板 1 小时,再次洗涤,并且用生物素化的抗-mIL-13 (产品目录号 BAF413, R+D Systems)培养。然后再次洗涤,并且与链亲和素缀合的辣根过氧化物酶一起培养,用邻苯二胺二氢氯化物过氧化物酶对一起对所述平板显影 30 分钟。如图 5 所示, cIL-13 和 GST-cIL-13 都能结合任意一种 mIL-13 受体。上述结果再次证实所述嵌合过程没有明显改变所述蛋白的构象。

1.5 嵌合 IL-13 的生物活性

根据该蛋白在人肺成纤维细胞系 A549 中磷酸化 STAT6 的能力,评估 GST-cIL-13 的生物活性。所述细胞表达对 IL-4 和 IL-13 有反应的人 II 型 IL-4 受体。用 hIL-4, hIL-13 或 mL-13 刺激所述细胞能诱导信号传导蛋白 STAT6 的磷酸化。将存在于 RPMI (Life Technologies)中的

5x10⁵ A549 细胞铺平板到 60 毫米组织培养皿(Life Technologies)上, 并且生长到 70%的铺满度。然后在 37℃下用 2-150ng/ml 细胞因子或纯化的 cIL-13 培养细胞 15 分钟。由于 GST 融合配偶体的存在会改变细胞因子的生物活性, 所述嵌合 IL-13 是作为 GST-cIL-13 融合蛋白和通过凝血酶裂解从融合体中释放出的游离 cIL-13 形式分析的。作为对照, 还测试了 rmIL-13 和 GST。然后制备细胞裂解物, 并且使用兔抗-磷酸 STAT6 多克隆抗体 (NEB, Hitchin, Herts, UK. 产品目录号 9361 S) 通过 Western 印迹分析磷酸-STAT6 的存在。在 5%BSA/TBST(BSA 必须是购自 Sigma 公司的 A7906, 作为一级抗体, 它是磷酸专一性的, 0.1% Tween-20)中封闭印迹过夜, 在室温下以 1/1000 的比例添加一级抗体, 培养 1 小时, 然后用 TBST 洗涤 3 次。然后以 1/5000 的比例添加抗兔 HRP 缀合的二级抗体(A-4914, Sigma Aldrich), 在室温下培养 1 小时, 然后用 TBST 洗涤 4 次, 然后用 HRP 化学发光底物 ECL 试剂(Amersham Pharmacia)显影。该实验的结果如图 6 所示。

15 在每一个泳道中加载以下蛋白:

泳道	用以下物质处理的 A549 细胞裂解物
1	50ng/ml rmIL-13 (R&D 系统)
2	10ng/ml rmIL-13 (R&D 系统)
3	2ng/ml rmIL-13 (R&D 系统)
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	未处理
11	1μg/ml GST
12	0.25μg/ml GST
13	分子量标记

重组蛋白制剂如图 3 所示。

用 50 或 10ng/ml(而不是 2ng/ml)rmIL-13 处理 A549 细胞, 诱导了 STAT6 的磷酸化, 表明它具有生物活性。用 50 ng/ml(而不是 10 或 2ng/ml)cIL-13 处理 A549 细胞, 诱导了 STAT6 的磷酸化, 表明它具有生物活性。类似地, 150ng/ml GST-cIL-13(它在摩尔数量方面大体上等于 50ng/ml cIL-13)是具有生物活性的, 而 30 和 6ng/ml 的没有生物活性。因此, CIL-13 是该受体的刺激剂, 不过在上述实验条件下, 其生物活性比 mIL-13 低大约 5 倍。

10 1.6 用 cIL-13 免疫

然后用 cIL-13 和 GST-cIL-13 作为免疫原, 在 Balb/c 小鼠体内诱导抗小鼠 IL-13 的自身抗体的形成。在尾巴根处给 6-8 周大的雌性小鼠皮下(sc)注射 1 次大约 30 μ g 的溶解在完全弗氏佐剂 (CFA)中的蛋白。随后在相同部位进行 3 次加强免疫, 每次免疫包括溶解在用于加强免疫的不完全弗氏佐剂[IFA]中的大约 10 μ g 蛋白。每一个处理组包括 5 只动物, 并且按照表 2 所示方案进行免疫。

表 2

组	免疫
A	存在于 CFA/IFA 中的盐水对照 s/c
B	存在于 CFA/IFA 中的 30/10 μ g GST s/c
C	未免疫的天然小鼠
D	存在于 CFA/IFA 中的 30/10 μ g GST-hIL-13 s/c
E	存在于 CFA/IFA 中的 30/10 μ g cIL-13 s/c
F	存在于 CFA/IFA 中的 30/10 μ g GST-cIL-13 s/c

日期	处理
-12	预先放血
0	首次免疫
14	第一次加强免疫
27	尾部放血
42	尾部放血
49	第二次加强免疫
70	尾部放血
97	尾部放血
99	第三次加强免疫
113	尾部放血
140	尾部放血

血清样品是通过在表 2 所示的时间点上对尾静脉实施静脉穿刺获得的。在通过离心澄清之后,通过 ELISA 分析所述样品中对小鼠 IL-13, 人 IL-13 和 GST 有反应的专一性 IgG 的存在。A-D 组中的任何动物在任何时间点上都不具备抗小鼠 IL-13 抗体。B 组、D 组和 F 组中的所有动物都能产生对 GST 的强的 IgG 反应 (E 组动物也能产生对 GST 的强的抗体反应,因为在用于对这些小鼠免疫的 cIL-13 样品中残留有 GST)。在 F 组中的 5 只动物中的 5 个和 E 组的 5 只动物中的 4 个诱导了抗小鼠 IL-13 抗体反应。图 7(a 和 b)表示对 F 组动物之一和来自 E 组 7b 的动物之一的血清学分析(分别用 gst-cIL-13 免疫和用 cIL-13 免疫)。以上结果表明,用 GST-cIL-13 或 cIL-13 免疫能够破坏对 mL-13 的耐受性,产生小鼠抗-mIL-13 抗体。

在 A549/磷酸化-STAT6 测定中,测试了来自强的抗-mIL-13 IgG 反应的 2 只小鼠(F1d70 和 F5d97)的血清中和 rmIL-13 的生物活性的能力。在室温下,在无血清 RPMI 组织培养基中将 20ng/ml 或 10ng/ml rmIL-13(R & D Systems)与 1%血清一起培养 15 分钟,然后在 37°C 下与 A549 细胞一起培养 15 分钟。制备细胞裂解物,并且通过上文所披露的 Western 印迹分析分析磷酸 STAT6 的存在。作为负对照,从用 GST-

hIL-13 免疫的 Balb/c 小鼠体内获得了抗-hIL-13 血清，并且通过 ELISA 证实具有强的抗-hIL-13 IgG 反应，但是没有抗-mIL-13 抗体。作为正对照，将中和抗-mIL-13 抗体 (R & D Systems, 产品目录号 AF-413-NA) 掺入正常小鼠血清中，以便得到 1 μ g/ml 的最终浓度。

5

该实验的结果如图 8 所示，其中测试了以下成分：

泳道	细胞因子	抗体
1	20ng/ml rmIL-13	正常小鼠血清
2	10ng/ml rmIL-13	正常小鼠血清
3	0ng/ml rmIL-13	正常小鼠血清
4	20ng/ml rmIL-13	血清样品 F1d70
5	10ng/ml rmIL-13	血清样品 F1d70
6	0ng/ml rmIL-13	血清样品 F1d70
7	20ng/ml rmIL-13	抗 hIL-13 小鼠血清
8	10ng/ml rmIL-13	抗 hIL-13 小鼠血清
9	0ng/ml rmIL-13	抗 hIL-13 小鼠血清
10	分子量标记	-
11	0ng/ml rmIL-13	正常小鼠血清+抗 mIL-13
12	20ng/ml rmIL-13	血清样品 F5d97
13	10ng/ml rmIL-13	血清样品 F5d97
14	0ng/ml rmIL-13	血清样品 F5d97
15	20ng/ml rmIL-13	正常小鼠血清+抗 mIL-13
16	10ng/ml rmIL-13	正常小鼠血清+抗 mIL-13

10 用本发明的嵌合 IL-13 免疫原免疫能够诱导抗小鼠 IL-13 自身抗体的产生，这种抗体能中和小鼠 IL-13 的生物学活性(泳道 4、5、12、13)，其作用方式与外源添加的抗鼠类 IL-13 抗体相当(泳道 15、16)。这种活性不存在于正常小鼠血清中(泳道 1、2)，也不存在于来自用 GST-hIL-13 免疫过的动物血清中(泳道 7、8)。

以上数据提供了通过用 cIL-13 免疫，并因此诱导内源中和抗体活

性治疗患有 IL-13 依赖型病理学的哺乳动物的基础。

1.7 其他构建体

1.7.1 6 his 标记的 cIL-13 设计

5 GST-cIL-13 是细菌生产的蛋白，它是不溶性的，并且需要在体外增溶和重新折叠。体积排阻层析证实，所述重新折叠过程产生了若干种不同的折叠形式，这表明所述免疫反应的一部分是针对能产生不结合天然小鼠 IL-13 的不相关的抗体的形式的。

10 因此，这种候选物不可能产生可能的最有效中和抗小鼠 IL-13 抗体反应。

为此，业已将 6 his- cIL-13 克隆到一种哺乳动物表达载体上，哺乳动物表达的 6 his-cIL-13 是可溶性的，并且不需要在体外重新折叠。

15 1.7.2 图 12(SEQ ID NO 23 和 24)表示一种疫苗抗原，其中，产生了不同的类似突变。按照一种方案对蛋白序列编号，其中，在序列“GPVPR”中的甘氨酸残基是 1 号残基。划单下划线的序列相当于来自修正过的结构模型的推测的模型区。划双下划线的粗体残基表示被整合到所述小鼠序列上的突变的点；

- 11 小鼠 Leu 改变成 Val (大鼠)
- 20 21 小鼠 Ser 改变成 Thr (非直向同源)
- 63 小鼠 Tyr 改变成 Phe (非直向同源)
- 71 小鼠 Gly 改变成 Ala (狗/猪/牛)
- 100 小鼠 Ser 改变成 Thr (狗)
- 104 小鼠 Gln 改变成 Asn (非直向同源)
- 25 10 小鼠 His 改变成 Arg (非直向同源)

1.8 用于人类治疗

30 图 9 表示本发明的一种可能的疫苗抗原，它能诱导在人体内产生抗人 IL-13 抗体。可将其用于治疗以过量或不适当的 IL-13 为特征的疾病，例如哮喘。在相当于小鼠 IL-13 的序列上加下划线。所述构建体包括类似于小鼠 IL-13 的 12 个氨基酸替换，它们是：

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

图 13(SEQ ID NO 25)表示基于嵌合 IL-4 的用于人类的一种可能的
15 疫苗。它是嵌合人 IL-4 疫苗蛋白的一个例子。加下划线的氨基酸残基
包括 α 螺旋结构区，来自小鼠 IL-4，并且第 21 号氨基酸在第一个螺旋
中。普通符号(plain symbol)表示来自人 IL-4 的氨基酸残基。 α 螺旋区
的位置引自以下文献：Zuegg, J 等(2001) Immunol and Cell Biol 79:
332-339。

20

实施例 2: 对 gst-cIL-13 的免疫反应是小鼠 IL-13 专一性的，并且
不能与小鼠 IL-4 发生交叉反应。

由于小鼠 IL-13 在结构上类似于小鼠 IL-4，通过抗小鼠 IL-4 ELISA
和体外 mIL-4 中和生物测定分析来自 GST-cIL-13 免疫过的小鼠的血清
25 (业已证实它含有高效价的抗小鼠 IL-13 自身抗体)与小鼠 IL-4 的交叉
反应性。

2.1 抗小鼠 IL-4 ELISA.

在 4℃ 下，用溶解在碳酸盐-碳酸氢盐缓冲液中的 IL-4 单克隆抗体
30 (产品目录号 MAB404, R+D Systems) 对 96 孔平板进行包衣过夜。然
后在室温下用 3% BSA/TBST 封闭平板 1 小时，用 TBST 洗涤 3 次，并

且在室温下与小鼠 IL-4 (产品目录号 404-ML-005, R+D Systems) 一起培养 1 小时。在洗涤之后, 在室温下将平板与小鼠血清一起培养 1 小时, 再次洗涤, 并且与 HRP 缀合的抗小鼠 IgG 多克隆抗体 (产品目录号 A-9309, SIGMA) 一起培养。在进一步洗涤之后, 用邻苯二胺二氢氯化物过氧化物酶底物对所述平板进行显影 30 分钟。

所述血清中抗小鼠 IL-4 抗体的含量是以终点效价形式表示的。终点效价被定义为相当于 ELISA 背景读数 2 倍的血清稀释度。

小鼠	抗小鼠 IL-4 抗体 终点效价	抗小鼠 IL-13 抗 体终点效价
C2(在 4 × GST-cIL-13 疫苗剂量之后, 在第 125 天采集的血清样品)	1/900	1/80000

10 在该血清样品中检测到极低水平的小鼠 IL-4 交叉反应性。相反, 以前通过抗小鼠 IL-13 抗体 ELISA, 在该血清样品中测定了高的多的抗小鼠 IL-13 抗体终点效价。通过该 ELISA 测定的小鼠 IL-4 交叉反应性的水平预计不会在体内产生小鼠 IL-4 中和作用。通过体外小鼠 IL-4 生物测定评估该血清样品的小鼠 IL-4 中和能力。

15

2.2 体外小鼠 IL-4 中和生物测定

小鼠 IL-4 在体外能刺激 CTLL 细胞的增殖。因此, 在所述细胞中开发了一种测定方法, 以便评估来自该 GST-cIL-13 免疫过的小鼠的血清的小鼠 IL-4 中和能力。

20 为了测定小鼠血清中和小鼠 CTLL 细胞 (产品目录号 87031904, ECACC) 上的重组小鼠 IL-4 的生物活性的能力, 在 37°C 下, 在 96 孔组织培养平板(Invitrogen)上, 将 3 纳克/毫升重组小鼠与各种浓度的血清一起培养 1 小时。在该预培养期之后, 添加 CTLL 细胞。在潮湿的二氧化碳培养箱中, 在 37°C 下将含有各种血清稀释度、重组小鼠 IL-4 和
25 CTLL 细胞的测试混合物培养 70 小时。在培养的最后 4 小时期间添加 MTT 底物 (产品目录号 G4000, Promega), 然后用酸溶液溶解代谢的

兰色甲臆产物终止所述反应。在 570nm 波长下在 96 孔平板读数机中读出每一个孔中溶液的稀释值。

应当指出的是，该测定方法只能测定高于或相当于 1/100 的血清稀释度中的小鼠 IL-4 中和能力。低于 1/100 的血清稀释度能在 CTLL 细胞中诱导非专一性增殖作用。

血清中和小鼠 IL-4 生物活性的能力被表达为将特定数量的小鼠 IL-4 的生物活性中和 50% (= ND₅₀)所需的血清稀释度。血清样品越稀，其中和能力越强。

测试过的最高浓度的小鼠 C2 血清是 1/100 稀释度。它不能将 3ng/ml 的小鼠 IL-4 的生物活性中和 50%，因此，ND₅₀ 被表达为 < 1/100 稀释度。

小鼠	小鼠 IL-4 中和能力 (ND ₅₀)	小鼠 IL-13 中和能力 (ND ₅₀)
C2(在 4 × GST-cIL-13 疫苗剂量之后，在第 125 天采集的血清样品)	< 1/100	< 1/5300

在测试过的血清稀释度下，在该血清样品中未检测到小鼠 IL-4 中和能力。相反（在评估小鼠 IL-13 中和能力时），该血清样品能有效中和小鼠 IL-13 生物活性。

以上结果表明，尽管通过抗小鼠 IL-4 抗体 ELISA 在所述血清中能够检测到非常低水平的小鼠 IL-4 交叉反应性，但是没有相关的小鼠 IL-4 中和能力。

2.3 用新的小鼠 IL-13 中和生物测定评估小鼠血清样品的小鼠 IL-13 中和能力

以前的 GST-cIL-13 生物活性和小鼠 IL-13 中和能力结果是使用 STAT-6 磷酸化结果在 A549 细胞中产生的。该测定方法烦琐并且不容易产生定量结果。小鼠 IL-13 在体外能刺激 TF-1 细胞增殖。因此，在

所述细胞中开发了一种测定方法，以便评估来自 GST-cIL-13 免疫过的小鼠血清的小鼠 IL-13 中和能力。

2.4 体外小鼠 IL-13 中和生物测定

5 为了测定小鼠血清中和人 TF-1 细胞（自己获得的(obtained in-house)）上的重组小鼠 IL-13 的生物活性的能力，在 37°C 下，在 96 孔组织培养平板(Invitrogen)中，将 5 纳克/毫升重组小鼠 IL-13 与各种浓度的血清一起培养 1 小时。在该预培养期之后，添加 TF-1 细胞。在潮湿的二氧化碳培养箱中，在 37°C 下将含有各种血清稀释度、重组小鼠 IL-13
10 和 TF-1 细胞的测试混合物培养 70 小时。在培养的最后 4 小时期间添加 MTT 底物（产品目录号 G4000, Promega），然后用酸溶液溶解代谢的兰色甲臅产物终止所述反应。在 570nm 波长下在 96 孔平板读数机中读出每一个孔中溶液的稀释值。

应当指出的是，该测定方法只能测定高于或相当于 1/100 的血清
15 稀释度中的小鼠 IL-13 中和能力。低于 1/100 的血清稀释度能在 TF-1 细胞中诱导非专一性增殖作用。血清中和小鼠 IL-13 生物活性的能力被表达为将特定数量的小鼠 IL-13 的生物活性中和 50% (= ND₅₀)所需要的血清稀释度。血清样品越稀，其中和能力越强。

20 通过上述方法测定了 GST-cIL-13 免疫的小鼠的血清的小鼠 IL-13 中和能力。如下文所述，产生了强的 IL-13 中和反应。

小鼠（在 4 × GST-cIL-13 疫苗剂量之后，在第 125 天采集的血清样品）	小鼠 IL-13 中和能力 (ND ₅₀)
C1	1/1250
C2	1/5230
C3	1/523
C4	1/417
C5	1/1670

2.5 测定在“卵白蛋白刺激”小鼠哮喘模型中发生效力所需要的小鼠 IL-13 中和水平。

为了标定治疗哮喘所需要的 IL-13 自身疫苗的效力，在“卵白蛋白刺激/小鼠哮喘模型”中，在卵白蛋白刺激期间，用各种剂量的兔抗小鼠 IL-13 多克隆抗体治疗小鼠（通过腹膜内注射被动施用）。在该实验结束时测定模型参数，如呼吸道过敏反应(AHR)，杯状细胞组织转化(GCM)和肺炎性细胞含量。该模型中的效力与在小鼠血清中所获得的小鼠 IL-13 中和水平相关。将小鼠 IL-13 中和生物测定方法用于测定血清样品中小鼠 IL-13 中和水平。

治疗组（被动施用的兔抗小鼠 IL-13 抗体的剂量）	小鼠 IL-13 中和能力 (ND ₅₀)
最高剂量	1/4100
高剂量	1/2670
中等剂量	1/476
最低剂量	1/207

10 治疗组提供了最高的三种抗体剂量，所有治疗都采用类似方式进行的。上述所有三个组都表现出等于（对于 AHR 而言）或好于（对于 GCM 而言）用于本模型的标准治疗（地塞米松，通过腹膜内途径以 3 x 1.5mg/kg 的剂量施用）的效力。施用抗体的“最低剂量”表现出介于地塞米松和‘非治疗’正对照组之间的效力。

15 因此，在“中等剂量”治疗组中所获得的 IL-13 中和水平表示该动物模型所需要的 IL-13 自身疫苗的效力阈值。所述效力的阈值被定义为在哮喘模型中表现出 100%效力(= ED₁₀₀)所需要的小鼠血清中 IL-13 中和的最低水平。因此，1x ED₁₀₀ 等于 1/476 的 ND₅₀。

20 特定效力阈值的意义

上面业已定义了“卵白蛋白刺激”小鼠哮喘模型中有效所需要的 IL-13 中和水平。在小鼠 C1-3 和 C5 中由 GST-cIL-13 所诱导的 IL-13 中和水平超过了在所述哮喘模型中发生效力所需要的效力阈值。以上结果如图 11 所示。

25 因此，预计 GST-cIL-13 疫苗能够在小鼠哮喘模型中发生效力。

实施例 3: 与各种佐剂组合的 GST-cIL-13 的免疫原性特征

3.1 免疫方案

5 用 GST-cIL-13 作为免疫原, 在 Balb/c 小鼠体内诱导抗小鼠 IL-13 的自身抗体的形成。给 6-8 周大的雌性小鼠注射一次存在于佐剂中的大约 100 μ g 蛋白。随后进行 4 次加强免疫, 每一次免疫包括存在于佐剂中的 50 μ g 蛋白 (有关免疫原+佐剂制剂, 参见下文)。每一个治疗组包括 5 只动物, 按照下面表格中的方案进行免疫。

10 在规定的時間点上通过对尾静脉实施静脉穿刺获得血清样品。在通过离心澄清之后, 通过 ELISA 分析样品中对小鼠 IL-13 的专一性 IgG 反应的存在。

组	免疫
A	存在于 AS03 中的 GST-cIL-13 i/m
B	存在于明矾中的 GST-cIL-13 i/p
C	存在于“ImmunEasy”中的 GST-cIL-13 i/m
D	存在于 CFA/IFA 中的 GST-cIL-13 s/c
E	存在于 PBS 中的 GST-cIL-13 s/c
F	不免疫

日期	处理
-7	预先放血
0	首次免疫
21	第 1 次加强免疫
35	尾部放血
49	第 2 次加强免疫
63	尾部放血
77	第 3 次加强免疫
92	尾部放血
106	第 4 次加强免疫
125	尾部放血

3.2 免疫原+佐剂制剂

乳化佐剂 AS03 的制备:

将 Tween 80 溶解在磷酸缓冲的盐溶液(PBS)中, 得到溶解在 PBS
5 中的 2%的溶液。为了提供 100 毫升 2 倍浓度的乳液, 将 5 克 DL α 生育酚和 5 毫克角鲨烯重复涡旋搅拌混合。添加 90 毫升 PBS/Tween 溶液, 并且充分混合。然后使所得到的乳液通过一个注射器, 并最后用 M110S 微流化机微流化。所得到的油状液滴具有大约为 180 nm 的粒度。

10 用 1: 1 的比例混合佐剂和蛋白溶液, 短暂地螺旋搅拌(以中等速度混合 10 秒), 并且在室温下在轨道摇床上培养 10 分钟。进行短暂地涡旋搅拌, 然后通过肌肉途径在两个不同位点给每只小鼠注射和施用 100 μ l 总的悬浮液(即每只小鼠 2 x 50 μ l, 在每一个四头肌上注射一次), 在每次免疫之前制备新的悬浮液。

15

明矾

由 SIGMA 公司提供(产品目录号 A-1577)。用 PBS 制备 2mg/ml 的明矾悬浮液。以 1: 1 的比例混合佐剂和蛋白溶液, 进行短暂地涡旋搅拌, 并且在室温下轻柔摇晃培养 10 分钟。进行短暂地涡旋搅拌, 然后
20 通过腹膜内途径给每只小鼠注射和施用 100 μ l 总的悬浮液, 在每次免疫之前制备新的悬浮液。

CpG-ImmunEasy

由 Qiagen 公司提供(产品目录号 303101)。通过轻柔地涡旋搅拌混
25 合佐剂原液罐, 然后以 1: 1 的比例混合佐剂和蛋白, 通过用移液管轻柔地吸入和排出 5 次。在室温下培养 15 分钟。将移液管将所述混合物轻柔地吸入和排出 5 次, 并且通过肌肉途径在两个不同的部位给每只小鼠施用 100 μ l 悬浮液(即每只小鼠 2 x 50 μ l, 在每一个四头肌上注射一次), 在每一次免疫之前制备新的悬浮液。

30

CFA/IFA

由 SIGMA 公司提供(产品目录号 F-5881, F-5506)。以 1: 1 的比例、与预先混合的 CFA 配伍用于初次免疫, 或者与 IFA 配伍用于加强免疫。涡旋混合样品, 以便确保产生含有 CFA/IFA 的均匀的白色悬浮液。在使用之前在冰上保存至少 30 分钟, 并且在施用之前充分涡旋搅拌。

5

3.3 抗小鼠 IL-13 抗体反应

通过抗小鼠 IL-13 抗体检测 ELISA, 监测血清样品中抗小鼠 IL-13 抗体反应。

在 4℃ 下用溶解在碳酸盐-碳酸氢盐缓冲液中的抗小鼠 IL-13 单克隆抗体 (产品目录号 MAB, R+D Systems) 对 96 孔 Maxisorp 平板进行包衣过夜。然后在室温下用 3% BSA/TBST 封闭平板 1 小时, 用 TBST 洗涤 3 次, 并且在室温下与小鼠 IL-13 (产品目录号 413-ML-025, R+D Systems) 一起培养 1 小时。在洗涤之后, 在室温下将所述平板与小鼠血清一起培养 1 小时, 再次洗涤, 并且与 HRP 缀合的抗小鼠 IgG 多克隆抗体 (SIGMA, 产品目录号 A-9309) 一起培养。在再次洗涤之后, 用邻苯二胺二氢氯化物过氧化物酶底物对所述平板进行显影 30 分钟。

15

血清中的抗小鼠 IL-13 抗体的含量是以终点效价形式表示的。终点效价被定义为相当于 ELISA 背景读数两倍的血清稀释度。

小鼠	抗小鼠 IL-13 抗体终点效价			
	AS03	明矾	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

20

图 10 表示对于稀释度为 1/100 的血清样品来说, 在第 125 天, 各治疗组中抗小鼠 IL-13 抗体曲线。

用和 CpG 佐剂组合的 GST-cIL-13 免疫的所有 5 只小鼠, 都产生了强的抗小鼠 IL-13 自身抗体反应。它与其他的佐剂不同, 其中, 抗体反

应在每一个组中不太一致，实际上，某些小鼠产生非常弱的反应。

以上结果表明，CpG 佐剂在产生一致的高效价抗小鼠 IL-13 自身抗体反应方面与实验过的其他佐剂相比更为有效。

5 通过体外 IL-13 中和生物测定分析所述血清样品的 IL-13 中和能力。

3.4 IL-13 中和能力

10 为了测定小鼠血清中和人 TF-1 细胞(ATCC 产品目录号 CRL-2003)上的重组小鼠 IL-13 的生物活性的能力，将 5ng/ml 重组小鼠 IL-13 与各种浓度的血清一起在 37°C 下，在 96 孔组织培养平板(Gibco BRL)上培养 1 小时。在该预培养期之后，添加 TF-1 细胞。在 37°C 下，在潮湿的二氧化碳培养箱中，将含有各种血清稀释度、重组小鼠 IL-13 和 TF-1 细胞的测试混合物培养 70 小时。在培养的最后 4 小时添加 MTT 底物(产品目录号 G4000, Promega)，然后用酸溶液溶解代谢的兰色甲臞产物
15 终止所述反应。在 570nm 波长下，在 96 孔平板读数器上读出每一个孔中溶液的吸收值。

应当指出的是，该测定方法只能测定大于或等于 1/100 的血清稀释液中小鼠 IL-13 中和能力。低于 1/100 的血清稀释度能在 TF-1 细胞中诱导非专一性增殖作用。

20 血清中和小鼠 IL-13 生物活性的能力被表达为将 5ng/ml 小鼠 IL-13 的生物活性中和 50%(=ND₅₀)所需要的血清稀释度。血清样品越稀，其中和能力越强。

25 所测试过的小鼠 D5 血清的最高浓度为 1/100 的稀释度。它不能将 5ng/ml 小鼠 IL-13 的生物活性稀释 50%，因此，ND₅₀ 被表达为 < 1/100 稀释度。

小鼠(在第 125 天采集的血清样品)	小鼠 IL-13 中和能力 (ND ₅₀)
C1	1/1250
C2	1/5230
C3	1/523
C4	1/417

C5	1/1670
D5	< 1/100

5 在第 125 天从用与 CpG 佐剂组合的 GST-cIL-13 免疫的所有 5 只小鼠体内采集的血清样品，在体外生物测定中，都能有效中和小鼠 IL-13 的生物活性。相反，从小鼠 D5（用存在于 CFA/IFA 中的 GST-cIL-13 免疫过的）中采集的第 125 天的血清样品在测试过的所有稀释度下都不能中和小鼠 IL-13 的生物活性。

以上结果表明，与其他测试过的佐剂相比，CpG 佐剂在产生中和抗小鼠 IL-13 自身抗体反应方面更为有效。

<110> 葛兰素集团有限公司

<120> 疫苗

<130> PG4355

<160> 25

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变的表位

<400> 1

Leu Lys Glu Leu Ile Glu Glu Leu Ser Asn

1 5 10

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变的表位

<400> 2

Phe Cys Val Ala Leu Asp Ser Leu

1 5

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变的表位

<400> 3

Ala Ile Tyr Arg Thr Gln Arg Ile Leu His Gly

1 5 10

<210> 4

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变的表位

<400> 4

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

1 5 10

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> 未知

<220>

<223> 合成的免疫刺激寡核苷酸

<400> 5

tccatgacgt tctgacgtt

20

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> 未知

<220>

<223> 合成的免疫刺激寡核苷酸

<400> 6

tctcccagcg tgcgcat

18

<210> 7	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 未知	
<220>	
<223> 合成的免疫刺激寡核苷酸	
<400> 7	
accgatgacg tcgccggtga cggcaccacg	30
<210> 8	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 未知	
<220>	
<223> 合成的免疫刺激寡核苷酸	
<400> 8	
togtcgtttt gtcgttttgt cgtt	24
<210> 9	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 未知	
<220>	
<223> 合成的免疫刺激寡核苷酸	
<400> 9	
tccatgacgt tctgatgct	20
<210> 10	
<211> 72	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 用于鼠的嵌合 IL13 的 PCR 寡聚引物	
<400> 10	
tgtgatgttg accagctcct caatgagctc octaagggtc agagggagag acacagatct	60

tggcaccggc cc	72
<210> 11	
<211> 73	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 用于鼠的嵌合 IL13 的 PCR 寡聚引物	
<400> 11	
aggagctggt caacatcaca caagaccaga ctcccctgtg caacggcagc atggtatgga 60	
gtgtggacct ggc	73
<210> 12	
<211> 72	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 用于鼠的嵌合 IL13 的 PCR 寡聚引物	
<400> 12	
gcaattggag atgttggtca gggattccag ggotgcacag taccogccag oggccagtc 60	
cacactccat ac	72
<210> 13	
<211> 73	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 用于鼠的嵌合 IL13 的 PCR 寡聚引物	
<400> 13	
tgaccaacat ctccaattgc aatgcatcg agaagaccca gaggatgctg ggcggactct 60	
gtaaccgcaa ggc	73
<210> 14	
<211> 72	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	

<223> 用于鼠的嵌合 IL13 的 PCR 寡聚引物

<400> 14

aaactgggcc acctcgattt tggatoggg gaggctggag accgtagtgg ggccttgcc 60
gttacagagt cc 72

<210> 15

<211> 71

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于鼠的嵌合 IL13 的 PCR 寡聚引物

<400> 15

aatcgaggt ggcccagttt gtaaaggacc tgctcagcta cacaaagcaa ctgtttgcc 60
acggcccctt c 71

<210> 16

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于鼠的嵌合 IL13 的 PCR 寡聚引物

<400> 16

cgcggattcg ggccggtgcc aagatctg 28

<210> 17

<211> 37

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于鼠的嵌合 IL13 的 PCR 寡聚引物

<400> 17

ctccgctcga gtcgacttag aaggggccgt ggcgaaa 37

<210> 18

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于鼠的嵌合 IL13 的 PCR 寡聚引物

<400> 18

cgcggatccg ggccggtgcc aagatctg

28

<210> 19

<211> 336

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于鼠的嵌合 IL13

<400> 19

gggcccgtgc caagatctgt gtctctccct ctgaccotta gggagctcat tgaggagctg 60
 gtcaacatca cacaagacca gactcccctg tgcaacggca gcatggtatg gagtgtggac 120
 ctggccgctg ggggtaactg tgcagccctg gaatecctga ccaacatctc caattgcaat 180
 gccatcgaga agaccagag gatgetgggc ggactctgta accgcaaggc cccactacg 240
 gtctccagcc tccccgatac caaaatcgag gtggcccagt ttgtaaagga cctgctcagc 300
 tacacaaage aactgtttcg ccaaggcccc ttctaa 336

<210> 20

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于鼠的嵌合 IL13

<400> 20

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

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

<210> 21
 <211> 399
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 用于人的嵌合 IL13

<400> 21
 atggcgcttt tgttgaccac ggteattgct ctcaactgoc ttggcggett tgcctcccca 60
 ggccctgtgc ctccctetac agcccttaag gagcttattg aggagctgag caacatcacc 120
 cagaaccaga aggctccgct ctgcaatggc agcatggttt ggagcatcaa cctgacagct 180
 ggcatgtttct gtgtagccct ggattecctg atcaacgtgt caggctgcag tgccatctac 240
 aggaccaga ggatattgca tggtttctgc ccgcacaagg tctcagctgg gcagttttcc 300
 agcttgcattg tccgagacac caaaatcgaa gtagcccact ttataacaaa actgctctta 360
 catttaaga aactttttog cgaggacgg ttcaactga 399

<210> 22
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 用于人的嵌合 IL13

<400> 22
 Met Ala Leu Leu Leu Thr Thr Val Ile Ala Leu Thr Cys Leu Gly Gly
 1 5 10 15
 Phe Ala Ser Pro Gly Pro Val Pro Pro Ser Thr Ala Leu Lys Glu Leu
 20 25 30
 Ile Glu Glu Leu Ser Asn Ile Thr Gln Asn Gln Lys Ala Pro Leu Cys
 35 40 45
 Asn Gly Ser Met Val Trp Ser Ile Asn Leu Thr Ala Gly Met Phe Cys
 50 55 60
 Val Ala Leu Asp Ser Leu Ile Asn Val Ser Gly Cys Ser Ala Ile Tyr
 65 70 75 80
 Arg Thr Gln Arg Ile Leu His Gly Phe Cys Pro His Lys Val Ser Ala
 85 90 95
 Gly Gln Phe Ser Leu His Val Arg Asp Thr Lys Ile Glu Val Ala
 100 105 110

His Phe Ile Thr Lys Leu Leu Leu His Leu Lys Lys Leu Phe Arg Glu
 115 120 125
 Gly Arg Phe Asn
 130

<210> 23
 <211> 396
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 用于鼠的嵌合 IL13

<400> 23
 atggcgctct gggtgactgc agtcctgget cttgcttgcc ttgggtgtct ogccgcccc 60
 gggcgggtgc caagatctgt gtctctccct gtgaccetta aggagcttat tgaggagctg 120
 accaacatca cacaagacca gactccctg tgcaacggca gcatggtatg gagtgtggac 180
 ctggccgctg ggggttctg ttagccctg gattccctga ccaacatctc caattgcaat 240
 gccatcttca ggaccagag gatattgcat gccctctgta accgcaaggc cccactacg 300
 gtctccagcc tcccogatac caaaatcgaa gtagcccaact ttataacaaa actgctcacc 360
 tacacaaaga acctgttctg ccggcgcccc ttctaa 396

<210> 24
 <211> 131
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 用于鼠的嵌合 IL13

<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> 人工序列

<220>

<223> 用于人的嵌合 IL13

<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

```

5      GGGCCGGTGCCAAGATCTGTGTCTCTCCCTCTGACCCTTAGGGAGCTCATTGAGGAGCTG
1      -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
      G P V P R S V S L P L T L R E L I E E L 60

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

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

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

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

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

```

图 1

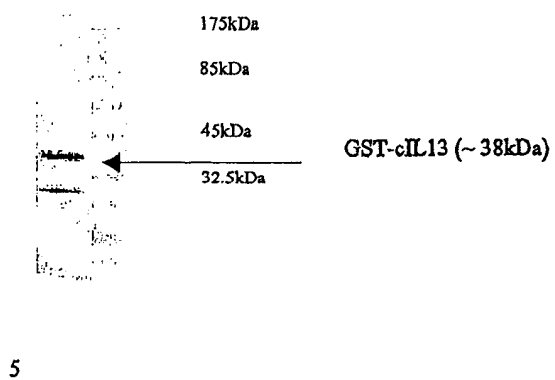


图 2

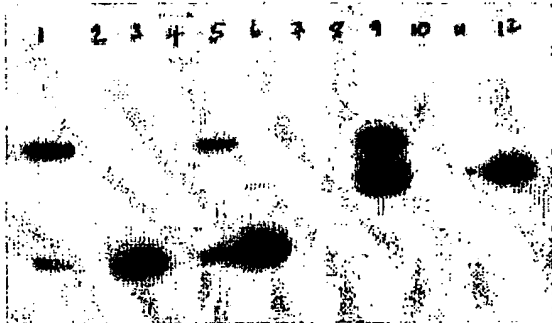


图 3

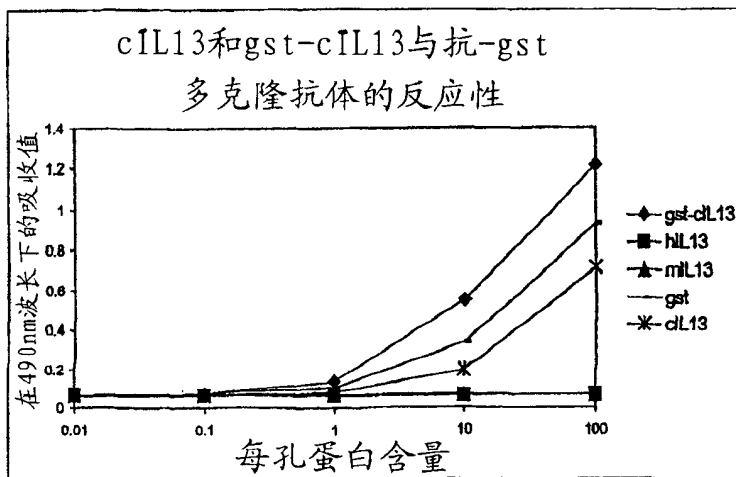
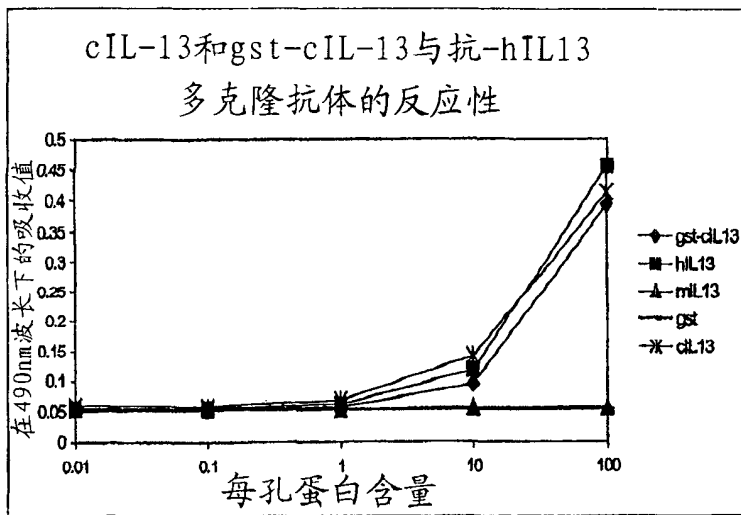
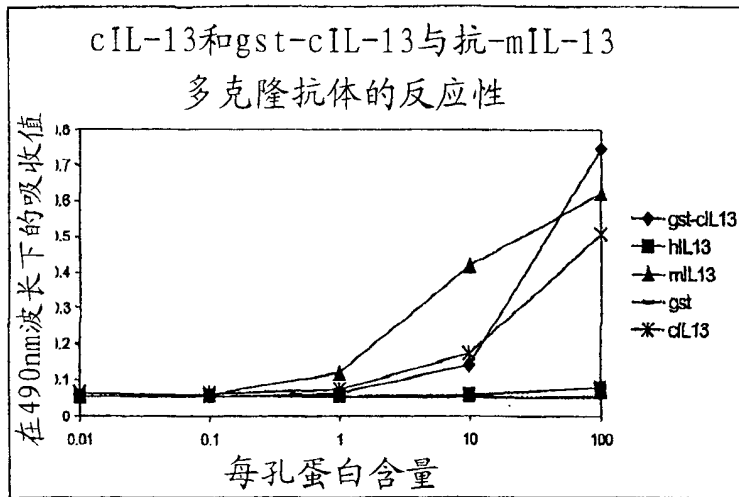
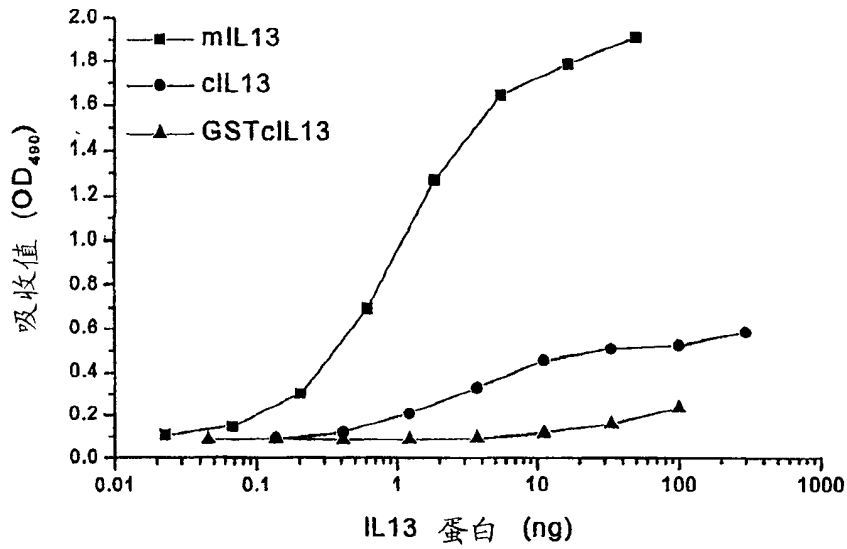


图 4

嵌合 IL13 蛋白与 mIL13R α 1-Fc 的结合



嵌合 IL13 蛋白与 mIL13R α 2-Fc 的结合

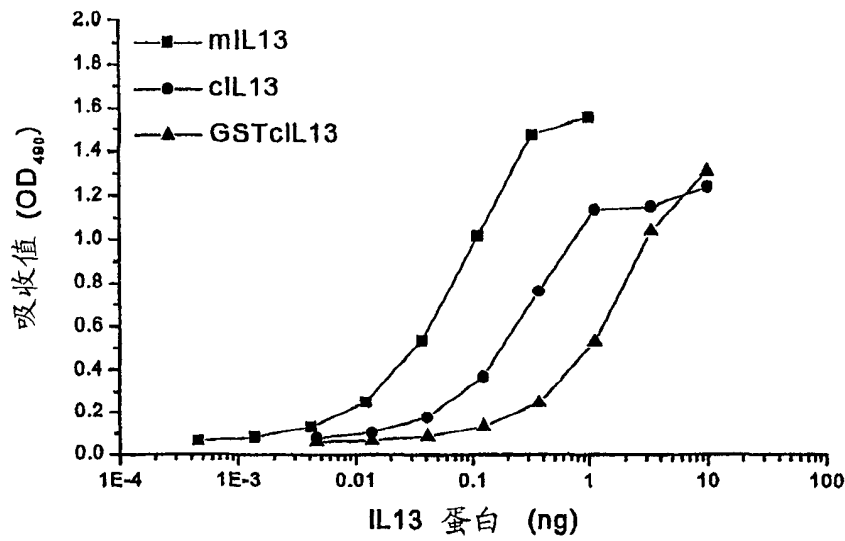


图 5

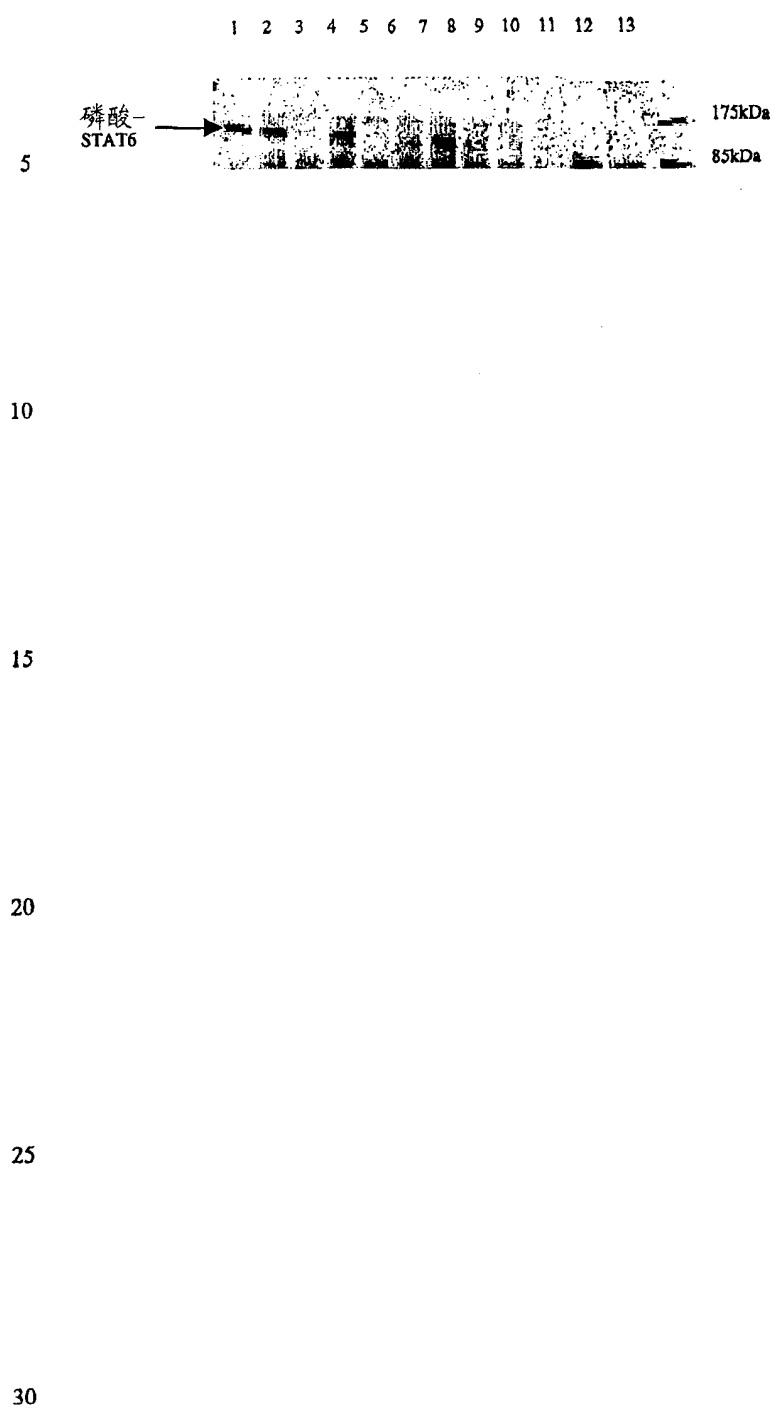


图 6

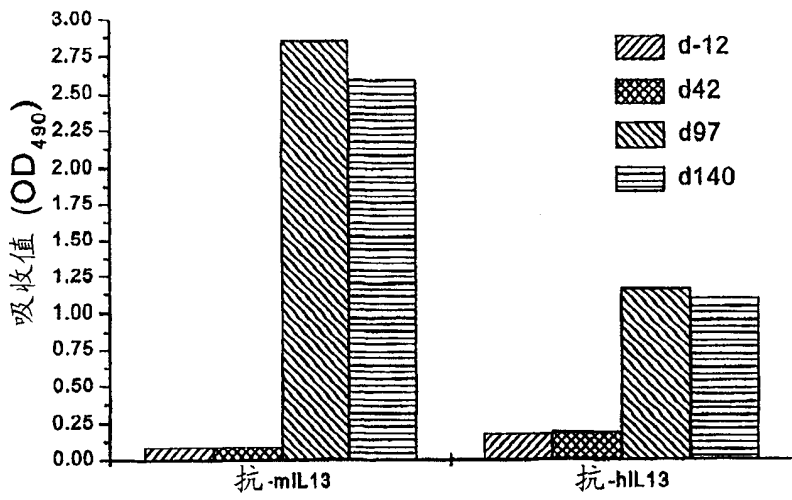


图 7a

5

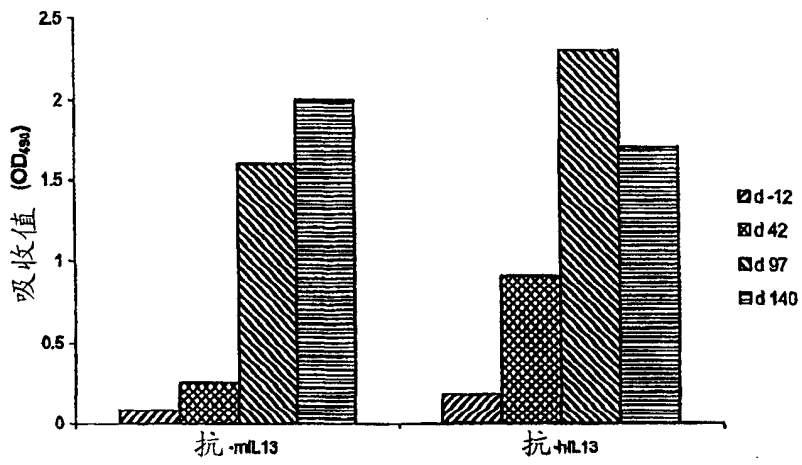


图 7b

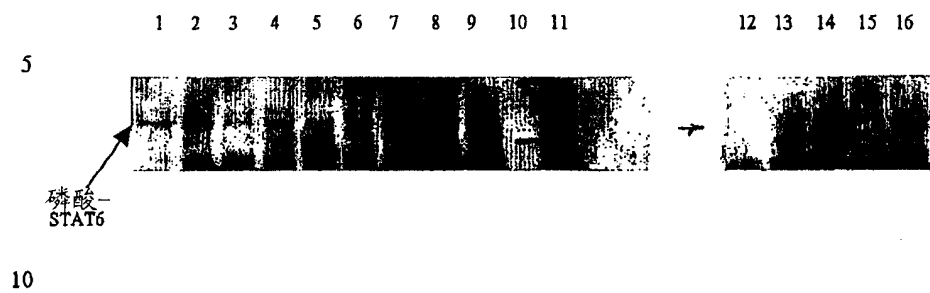


图 8

```

5      ATGGCGCTTTTGTGACCACGGTCATTGCTCTCACTTGCCTTGGCGGCTTTGCCTCCCCA
1      -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
      M A L L L T T V I A L T C L G G F A S P                               60

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

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

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

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

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

35     CATTAAAGAAACTTTTTGCGGAGGGACGGTTCAACTGA
361    -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
      H L K K L F R E G R F N *                               399

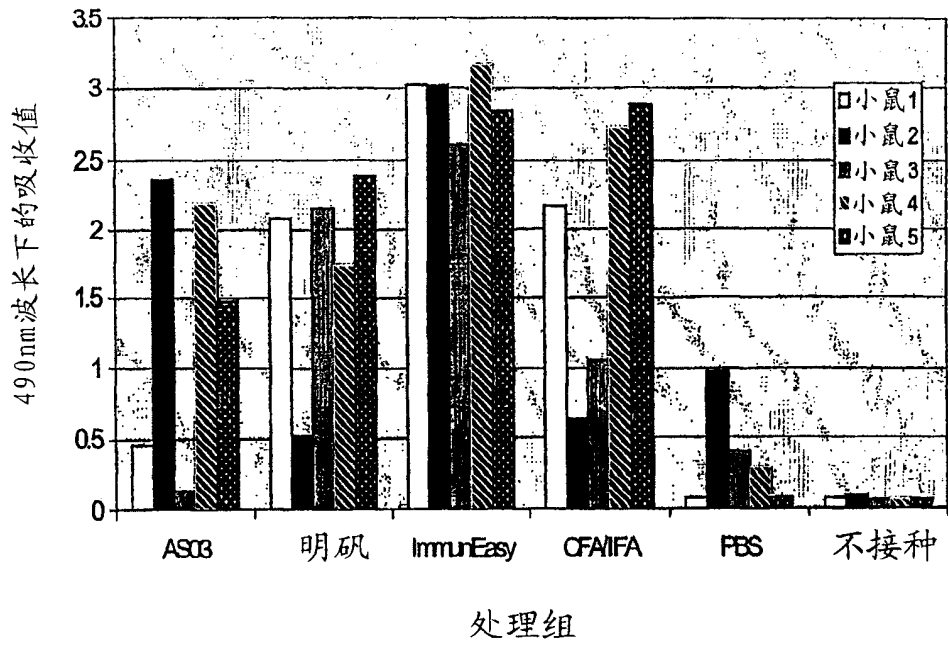
```

40

45

50

图 9

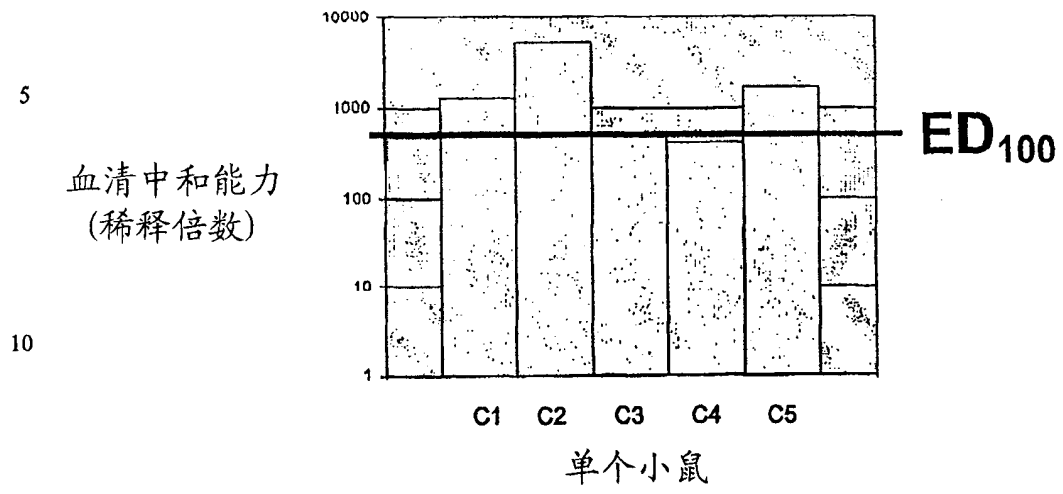


5

10

15

图 10



15

20

25

30

图 11

```

                    atggegctctgggtgactgcagtcctggctcttgcttgccttggtggtctcgccgcccc
5      1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
-19  M A L W V T A V L A L A C L G G L A A P      60
                                GGGCCGGTGCCAAGATCTGTGTCTCTCCCTGTGACCCTTAAGGAGCTTATTGAGGAGCTG
10     61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
      1  G P V P R S V S L P V T L K E L I E E L      120
                                ACCAACATCACACAAGACCAGACTCCCCTGTGCAACGGCAGCATGGTATGGAGTGTGGAC
15    121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
      21 T N I T Q D Q T P L C N G S M V W S V D      180
                                CTGGCCGCTGGCGGGTTCTGTGTAGCCCTGGATTCCCTGACCAACATCTCCAATTGCAAT
20    181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
      41 L A A G G F C V A L D S L T N I S N C N      240
                                GCCATCTTCAGGACCCAGAGGATATTGCATGCCCTCTGTAACCGCAAGGCCCCCACTACG
25    241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
      61 A I F R T Q R I L H A L C N R K A P T T      300
                                GTCTCCAGCCTCCCGATACCAAATCGAAGTAGCCCACTTTATAACAAAACCTGCTCACC
30    301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
      81 V S S L P D T K I E V A H F I T K L L T      360
                                TACACAAAGAACCTGTTTCGCCGGGCCCTTCTAA
35    361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 396
101  Y T K N L F R R G P F *      112

```

图 12


```

5      -23  ---+-----+-----+  0
      MGLTSQLLPPLFFLLACAGNFVHG

      1  ---+-----+-----+  24
      HKCDKNHLEIIGILNEVTGKTL

10     25  -----+-----+-----+  48
      CTELTVTDIFAASKNTTSELVCR

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

15     73  -----+-----+-----+  96
      NSSVLMELQRLPRAFRCLDGLNSC

      97  ---+-----+-----+  120
      PVKEANQSSLKDFLESLSIMQMD

20     121 ----- 126
      YSKCSS

25
  
```

图 13