

發明專利說明書

200407162

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號： 92125745

※ 申請日期： 97.8.8 ※IPC 分類： A61K39/395

壹、發明名稱：(中文/英文)

疫苗

VACCINE

貳、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

英商葛蘭素集團有限公司

GLAXO GROUP LIMITED

代表人：(中文/英文)

彼得 約漢 吉第絲

PETER JOHN GIDDINGS

住居所或營業所地址：(中文/英文)

英國米德賽克斯郡格林福德市柏克力大道葛蘭素大廈

GLAXO WELLCOME HOUSE BERKELEY AVENUE,

GREENFORD MIDDLESEX UB6 0NN ENGLAND

國 籍：(中文/英文)

英國 UNITED KINGDOM

參、發明人：(共 2 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 克萊爾 艾希曼

CLAIRE ASHMAN

2. 強納森 亨利 艾利斯

JONATHAN HENRY ELLIS

住居所地址：(中文/英文)

1. 英國賀佛雪郡史帝芬格市古奈斯伍德路葛蘭素史密斯克林公司
史帝芬格部

STEVENAGE, GLAXOSMITHKLINE, GUNNELS WOOD ROAD,
STEVENAGE, HERTFORDSHIRE, SG1 2NY, UNITED
KINGDOM

2. 英國賀佛雪郡史帝芬格市古奈斯伍德路葛蘭素史密斯克林公司
史帝芬格部

STEVENAGE, GLAXOSMITHKLINE, GUNNELS WOOD ROAD,
STEVENAGE, HERTFORDSHIRE, SG1 2NY, UNITED
KINGDOM

國 籍：(中文/英文)

1. 英國 UNITED KINGDOM

2. 英國 UNITED KINGDOM

肆、聲明事項：

☐ 本案係符合專利法第二十條第一項☐第一款但書或☐第二款但書規定之期間，其日期為： 年 月 日。

☒ 本案申請前已向下列國家（地區）申請專利：

1.英國；2002年08月30日；0220212.5

2.英國；2003年02月28日；0304672.9

3.

4.

5.

☒ 主張國際優先權(專利法第二十四條)：

【格式請依：受理國家（地區）；申請日；申請案號數 順序註記】

1.英國；2002年08月30日；0220212.5

2.英國；2003年02月28日；0304672.9

3.

4.

5.

☐ 主張國內優先權(專利法第二十五條之一)：

【格式請依：申請日；申請案號數 順序註記】

1.

2.

☐ 主張專利法第二十六條微生物：

☐ 國內微生物 【格式請依：寄存機構；日期；號碼 順序註記】

☐ 國外微生物 【格式請依：寄存國名；機構；日期；號碼 順序註記】

☐ 熟習該項技術者易於獲得，不須寄存。

玖、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於經分離之免疫原及其在能以中和IL-13達到治療效果之疾病上之治療用途，諸如COPD、氣喘及異位性失調症，諸如枯草熱、接觸性過敏及異位性皮膚炎，最佳免疫原係用以治療氣喘。明確言之，本發明係關於以免疫原(其包括天然的或突變性胺基酸IL-13，及插入在IL-13序列中或與IL-13連結或存於載體聚肽中之外來T-輔助子抗原決定子)疫苗接種哺乳動物提升其對抗IL-13之免疫反應，以中和IL-13之生物效應。本發明另外提供包括可編碼本發明免疫原之聚核苷酸之DNA疫苗，除此之外，本發明係關於包括此種免疫原之醫藥組合物，及其在醫藥上之用途，及該等製備之方法。

【先前技術】

COPD(慢性阻塞性肺疾病)是一種描述呼吸道疾病的廣泛名詞，其所顯示的症狀與氣喘相似，並可用相同的藥物治療。COPD的特徵是為慢性、進行式且大半為不可逆的氣流阻塞。致使個體染病的成因尚未得知，但90%的病例係認為由吸煙造成。該疾病的症狀包括咳嗽、慢性支氣管炎、呼吸急促及respiratory infections，最後該疾病會導致嚴重的失能及死亡。

氣喘是種慢性肺部疾病，係下呼吸道發炎所造成，特徵是週期性呼吸問題。病患的氣道即使在沒有病徵的情況下，一直處在敏感且腫脹狀態，或是具有某種程度的發炎現

象。發炎會造成氣道狹窄、減少進出肺部的氣流、造成呼吸困難及發出氣喘聲、胸腔窘迫及咳嗽。氣喘是因過敏原(例如塵蟎、花粉、黴菌)、刺激物(例如煙、香氣、臭味)、呼吸道感染、運動及乾燥天氣所引起之超敏感作用。這些刺激物會刺激氣道，而使得氣道的內層細胞腫脹而變的更為發炎，而後黏液會阻塞氣道，氣道週邊的肌肉緊縮，導致呼吸困難及壓迫，而氣喘的症狀出現。

異位性失調症係指一群遺傳性，且常同時發生的過敏症狀(包括氣喘)，諸如枯草熱及異位性皮膚炎。異位性皮膚炎是種侵襲皮膚的慢性疾病。在異位性皮膚炎中，皮膚變的相當的癢且會發炎，造成紅、腫、龜裂、滲出液體、硬化及脫皮。雖然異位性皮膚炎常侵襲嬰兒及幼童，但會持續至成人時期，或是在往後的人生當中首度出現。大多數的例子中，會有一段疾病惡化的時間稱之為惡化期或急性期，而後當皮膚改善或完全痊癒的一段時間則稱之為舒緩期。許多患有異位性皮膚炎的孩童當其年齡增長時，雖然係處在該疾病的永久性舒緩期，但是他們的皮膚仍常為乾燥狀態且易受刺激。環境因子會使天生遺傳有異位性疾病性狀之個體在人生的任何時間裡出現異位性皮膚炎的症狀。異位性皮膚炎常被稱為"溼疹"，溼疹是多種皮膚炎的通稱，異位性皮膚炎是多種溼疹中最為常見者。數種溼疹具有非常相似的症狀。

異位性皮膚炎侵襲皮膚的方式會隨著搔癢及所產生的皮膚感染型態而改變。某些患病會皮膚泛紅、脫皮，皮膚的

免疫系統會變的非常活化，其他人的皮膚則因為持續性的搔癢及磨損而變厚及變得如皮革狀硬韌，此情況稱為苔蘚化，另外有些人在其皮膚上會產生丘疹，或隆起的突出物。當丘疹被搔癢後，可能會破裂(表皮抓破)，而變的粗糙並受感染。

許多因子及環境狀態會使異位性皮膚炎惡化，進一步的刺激已經過度活化的皮膚免疫系統，惡化癢-搔癢的循環週期，而增加了對皮膚的傷害。這些惡化因子可以分為兩種主要類別：刺激物(諸如羊毛或合成性纖維、粗糙或不合身的衣物、肥皂及清潔劑、某些香水及化妝品、氯、礦物油、某些溶劑、灰塵及塵土)及過敏原(諸如花粉、狗或貓毛，及塵蟎過敏原)。情緒因子及某些感染亦會影響異位性皮膚炎。

假若正處在異位性皮膚炎的急性期，可用數種方法治療該症狀。雖然在某些嚴重的情況下亦可使用全身性的投藥方式，但是局部性腎上腺皮脂類固醇乳膏是最常作為治療之用。有些時候可使用成藥，但在許多情況下，醫師會開給較強的腎上腺皮脂類固醇乳膏或藥膏。常用的腎上腺皮脂類固醇處方實例為潑尼松。重複或長期使用局部性腎上腺皮脂類固醇的副作用包括皮膚薄化、感染、抑制生長(對孩童)及在皮膚上產生伸展皺紋。治療皮膚感染的抗生素可以藥膏直接施用於皮膚上，但通常以口服方式更為有效。利用紫外光A或B波長，或兩者之光療法(以光治療)可有效的治療較長孩童(超過12歲)及成人患有之輕度至中度的皮膚炎。在成人中，免疫抑制性藥物(諸如環孢素)亦可用以

治療經其他治療方式失敗之嚴重性異位性皮膚炎。環孢素的副作用包括高血壓、噁心、嘔吐、腎臟問題、頭痛、顫抖或麻木，並可能會增加罹患癌症及感染的風險。

因為現存的治療法無法滿足醫藥所需及其副作用，因此有必要針對一般性，及特別是氣喘及異位性皮膚炎等異位性疾病開發出替代性的療法。

IL-13是與IL-4極為相關之Th2-型細胞激素。近來一些報告業已界定出IL-13在卵白蛋白模式中驅動過敏性氣喘病變上所扮演的角色(Wills-Karp等人，1998，科學282：2258-2261；Grunig等人，1998，科學282：2261-2263)。在此研究中，將可與IL-13鍵結及中和之可溶性IL-13受體注射至事先經卵白蛋白致敏的老鼠體中，治療組中經乙醯膽鹼再激作用後所產生之氣道高-反應性會減低。組織學分析顯示治療組的老鼠已反轉發現於控制組中之杯狀細胞組織變形作用。在相對應實驗中，基因轉植老鼠中過度表現或將蛋白質植入野生型老鼠的氣管中會使得肺部IL-13含量上升。在此兩組實驗中，均會發現氣道高-反應性、嗜伊紅性白血球侵襲及黏液的產生增加(Zhu等人，1999，臨床研究雜誌103：779-788)。

人類IL-13成熟形式的序列為SEQ ID NO. 1，如圖1所示。

老鼠IL-13成熟形式的序列為SEQ ID NO. 2，如圖2所示。

數種哺乳動物及非人類靈長類之IL-13的序列示於圖3及圖4 (SEQ ID NOs. 3至9)。

由於單株抗體各種因生產、投藥及耐受性相關之問題，

因此主要焦點是在指導病患自身免疫系統之方法，以便利用疫苗接種的方法產生適當專一性之內因性抗體。然而，哺乳動物通常在血清中不會具有針對自體蛋白之高效價抗體，因為免疫系統有均衡機制會避免這些抗體的形成。一些類似重症肌無力的疾病說明這些"耐受性"機制的重要性，此病患的自體抗體會對抗骨骼肌肉的菸鹼性乙醯膽鹼受體，造成了虛弱無力及疲勞(Drachman, 1994, 新英格蘭醫學雜誌 330: 1797-1810)。

一些已設計之技術的主要目的係打破對自體抗原的"耐受性"。其中一種技術係以化學方式將自體蛋白(或其所衍生的肽)交錯連結至具有高度免疫力的載體蛋白上，諸如透孔螺血藍蛋白("抗體：實驗室手冊"Harlow, E及Lane D. 1988。冷泉灣印行)。

載體蛋白上之變異體的技術與構築編碼包括載體蛋白(例如，肝炎B中心蛋白)及自體蛋白兩者之融合蛋白之基因有關(肝炎B病毒之中心蛋白係為具有免疫力的肽之載體，生物化學 380 (3): 277-83, 1999)。融合基因可直接以部分之核酸疫苗投用。另一種方式是，其先在試管內於適當的宿主中表現，純化該基因產物，而後在含或不含有佐劑的情況下，以慣用的疫苗投藥。

另一種方式是 Dalum及其同事所揭示者，其中是在標的分子中插入一個第二類MHC-限制性抗原決定子，他們證明使用此方法可誘發出對抗泛激素(Dalum等人, 1996, 免疫學雜誌 157: 4796-4804; Dalum等人, 1997, 分子免疫學 34

：1113-1120)及細胞激素TNF (Dalum等人，1999，自然生物技術17：666-669)之抗體，結果是所有的T細胞輔助(蛋白)必須係來自此單一抗原決定子或來自所接合的序列。此方法亦揭示於歐洲專利案EP 0 752 886 B1、世界專利案WO 95/05849及WO 00/65058中。

用以中和數種細胞激素的處理療法是已知的，包括疫苗接種。世界專利案WO 00/65058揭示一種反調節細胞激素IL-5的方法，及其在治療氣喘上的用途。在此研究中，利用一些技術將IL-5序列修飾成具有免疫力，其中所揭示者為另帶有外來T-細胞抗原決定子之IL-5免疫原，然其仍維持IL-5 B細胞的抗原決定子。世界專利案WO 01/62287在許多的可能性抗原中揭示IL-13在過敏或氣喘疫苗上的用途。世界專利案WO 00/06937中揭示功能失活之細胞激素衍生物在疫苗抗原上的用途。嵌合式IL-13免疫原揭示於共同申請之專利申請案WO 02/070711中。

據此仍有需要針對氣喘提出改良的免疫處理療法，及用以提升中和抗-IL-13免疫反應之改良免疫原。

【發明內容】

本發明提供包括經修飾的"自體"IL-13免疫原之醫藥組合物，其中該IL-13免疫原修飾成包括外來T-細胞輔助子抗原決定子。該醫藥組合物較佳作為人類治療用途，且在此組合物中，IL-13序列為人類序列或其他能夠產生辨識人類IL-13之免疫反應之序列；且該T-細胞輔助子抗原決定子對人類自體蛋白而言是外來物。較佳的是T-輔助子抗原決定

子對其他族群之其他IL-13序列而言亦為外來物，然而，動物醫藥產物不排除係以(例如)上述人類疫苗之相似方式製得之犬類或其他獸醫物種之醫藥產物。

本發明組合物包括IL-13元素及用以提供T-細胞輔助(蛋白)之額外元素。

【實施方式】

IL-13元素

IL-13元素以其最概略的形式而言，是指任何能夠驅動一辨識及中和IL-13生物效應之免疫反應之序列，較佳的IL-13為人類IL-13。

在本發明專利說明書中，可使用完整的IL-13序列，或具有功能性相等之片段。據此，本專利說明書中所指IL-13包括完整的序列或其片段或其截短物。

IL-13元素包括天然的IL-13序列或其突變形式。據此，IL-13序列可使用(例如)天然的人類IL-13或其片段。

在本發明另一具體實例中，免疫原包括嵌合式IL-13序列，其包括以來自它種哺乳動物IL-13序列中相同位置所發現之相等胺基酸取代一或多個人類序列胺基酸之取代突變作用。在本專利說明書之人類疫苗免疫原中，嵌合式序列的目標係使介於免疫原及人類天然IL-13間的胺基酸序列之差異達到最大，而仍能保持兩個組成間最大形狀及架構相似性。藉由取代發現於預期自表面遮蔽區域中之胺基酸可達此目的。最佳係以發現於相同位置之它種哺乳動物IL-13之胺基酸來取代胺基酸，如此，所達到的序列差異性對免

疫原的整體形狀/架構具有最低的改變。

本發明一個主旨係提供一人類IL-13免疫原，其包括的取代突變作用區域與阿爾法螺旋區域有關，該取代作用係以發現於相同位置之異種哺乳動物IL-13序列之胺基酸來取代人類胺基酸。

最佳的是在多處IL-13序列上具有取代突變作用，其中至少兩或多個的突變位置係與包括取自異種之非-人類哺乳動物之胺基酸取代作用有關，更佳者，該取代作用係與取自3或多個異種之非-人類哺乳動物之胺基酸有關，而最佳之取代作用係與取自4或多個異種之非-人類哺乳動物之胺基酸有關。

較佳地，該取代作用不會發生在至少六個高度物種間保守區域：3PVP、12ELIEEL、19NITQ、28LCN、32SMVWS、50SL、60AI、64TQ、87DTKIEVA、99LL、106LF。

本發明免疫原較佳之IL-13元素為人類嵌合式IL-13序列，其與天然人類IL-13具有相似的結構形狀，然當投與人類時，其具有足夠的胺基酸序列差異性可增進其免疫力，其特徵在於該嵌合式IL-13免疫原具有人類IL-13序列，包括：

(a) 至少兩個下列阿爾法螺旋區域中具有取代突變作用：PSTALRELIEELVNIT、MYCAALES LI、KTQRMLSGF或AQFVKDLLLHLKKLFRE，

(b) 在下列高度物種間保守的區域中，包括至少六個區域未突變：3PVP、12ELIEEL、19NITQ、28LCN、32SMVWS、50SL、60AI、64TQ、87DTKIEVA、99LL、106LF，及

- (c) 視情況在任何所餘之胺基酸包括一突變作用，
- (d) 其中a、b或c處所進行的任何取代作用為結構性保守取代作用。

所列胺基酸字首前數字係指人類IL-13成熟型態的胺基酸序列的位置數字，其中第一個殘基"G"為數字2。

上述嵌合式IL-13元素(a)背景中，較佳至少有兩處，更佳至少三處，而最佳所有四處的阿爾法螺旋區域包括至少一個取代突變作用。(b)背景中較佳至少7處，更佳至少8處，更佳至少9處，更佳至少10處，而最佳所有11處的區域均未突變。

上述嵌合式IL-13元素中包括取自非-人類IL-13序列中相同位置之胺基酸的這些取代作用或突變作用較佳大於50%，更佳者包括取自非-人類哺乳動物IL-13序列中之相同位置之胺基酸之取代作用大於60，或70或80百分比，最佳者，每一取代作用或突變作用包括取自非-人類哺乳動物IL-13序列中相同位置之胺基酸。

另外在嵌合式人類IL-13元素背景中，較佳者這些取代作用或突變作用50%以上發生在預期係人類IL-13阿爾法螺旋結構區域中，更佳者60，或70或80以上百分比之取代作用或突變作用發生在預期係人類IL-13阿爾法螺旋結構區域中，最佳者，每一取代作用或突變作用均發生在預期係人類IL-13阿爾法螺旋結構區域中。

另外在嵌合式IL-13元素背景中，較佳人類IL-13序列包括介於2及20個間之取代作用，更佳者介於6及15個間之取代

作用，而最佳者為13個取代作用。

在人類IL-13疫苗例子中，IL-13免疫原可以同系的IL-13序列為基礎(諸如老鼠IL-13序列)，其中以老鼠B-細胞抗原決定子(表面暴露區域)取代相等之人類序列。在本具體實例中，除了在嵌合式序列的末端或中間所加入的雜混T-細胞抗原決定子(諸如P2或P30)外，老鼠"骨價"提供外來的T-細胞抗原決定子。

較佳嵌合式人類IL-13免疫原包括人類IL-13序列，其中胺基酸序列包括保守性取代作用，或其特徵係存於非-人類物種IL-13序列中相同位置處之胺基酸的取代作用，存在於下列13處至少6處：8T、11R、18V、49E、62K、66M、69G、84H、97K、101L、105K、109E、111R。最佳者，此嵌合式人類IL-13免疫原包括至少6處(較佳為所有位置)經下列取代：

位置	取代作用	物種
8	T->S	合成性
11	R->K	豬、牛、狗、老鼠、沙鼠 、狒狒、恆河猴、狨猴
18	V->A	合成性
49	E->D	牛、老鼠、沙鼠
62	K->R	牛、狗、老鼠、大老鼠
66	M->I	老鼠、沙鼠、大老鼠
69	G->A	牛、豬、狗
84	H->R	狗、恆河猴、狒狒
97	K->T	老鼠
101	L->V	狒狒、恆河猴
105	K->R	合成性
109	E->Q	狨猴
111	R->T	狨猴

包括上述所列每一取代作用之嵌合式 IL-13 是較佳的 IL-13 元素(免疫原 1, SEQ ID NO. 10), 示於圖 5 中。其他更佳 IL-13 元素為免疫原 11 (SEQ ID NO. 20, 參考圖 15)、免疫原 12 (SEQ ID NO. 21, 參考圖 16)及免疫原 13 (SEQ ID NO. 22, 參考圖 17)。

IL-13 元素視情況亦可另外包括破壞免疫原生物活性之突變作用, 下列取代作用可用以鈍化人類 IL13 生物活性: E 12 取代為 I、S 或 Y; E 12 取代為 K; R 65 取代為 D; S 68 取代為 D; R 108 取代為 D。

本發明某些方面, 具免疫力之天然 IL-13 序列片段可用以(例如)展現肝炎 B 中心顆粒中或上述嵌合式免疫原背景之具免疫力之肽。在這些背景中, 具有免疫力之人類 IL-13 序列片段較佳含有人類 IL-13 序列之 B-細胞抗原決定子, 而較佳至少為一或多個下列短序列:

GPVPPSTA

ITQNQKAPLCNGSMVWSINLTAGM

INVSGCS

FCPHKVSAGQFSSLHVRDT

LHLKKLFREGRFN

本發明聚肽可以突變(例如取代胺基酸、插入胺基酸或刪除胺基酸)進一步修飾, 以便加入所要的特性(諸如加入一可以輔助純化作用或增加免疫力的序列標誌), 或去除不想要的特性(諸如在受體上不想要的促進性活性)或穿膜區域

。明確言之，本發明明確地揭示可易化純化作用之融合部分(諸如聚組織胺標誌)或可增進表現作用之GST表現部分。較佳的標誌或表現部分為融合至IL-13分子C-端之人類IgG1免疫球蛋白FC。

其他突變作用可發生在IL-13分子序列中，由於物種間高度的保守性，這些區域以外是未發生突變作用的。較佳此種突變作用為保守性取代作用。"保守性取代作用"係指以具有相似特性的另一個胺基酸來取代胺基酸，如此熟識技藝者可預期聚肽的二級結構及親水特性實質上並未改變。

例如，某些胺基酸可取代蛋白質結構中其他胺基酸，而不會明顯地失去與結構相互反應鍵結能力，諸如，例如，抗體的抗原-鍵結區域或受質分子上的鍵結位置。因為蛋白質相互反應能力及蛋白質特性界定了蛋白質的生物功能活性，因此蛋白質序列中可以進行某些胺基酸序列取代作用(及當然其係在DNA編碼序列的基礎上)，及可獲得具有相似特性之蛋白質。因此本發明意欲涵蓋在所揭示組合物之肽序列或編碼未明顯失去其生物可用性或活性之肽之相對應DNA序列上所進行之各種變化。

在進行這些變化時，要考量胺基酸的親水指數。技藝中一般已知曉親水胺基酸指數賦予蛋白質相互反應生物性功能的重要性(Kyte及Doolittle, 1982，該文獻一併併入本專利說明書參考)。咸已認為胺基酸的相對親水特性提供了所得蛋白質的二級結構，其進而界定出該蛋白質與其他分子(例如，酵素、受質、受體、DNA、抗體、抗原，及類似物)

之相互作用。根據胺基酸的疏水性及電價特性，每一胺基酸業已設定一親水指數(Kyte及Doolittle, 1982)。這些數值為：異白胺酸(+4.5)；纈胺酸(+4.2)；白胺酸(+3.8)；苯丙胺酸(+2.8)；半胱胺酸/胱胺酸(+2.5)；甲硫胺酸(+1.9)；丙胺酸(+1.8)；甘胺酸(-0.4)；蘇胺酸(-0.7)；絲胺酸(-0.8)；色胺酸(-0.9)；酪胺酸(-1.3)；脯胺酸(-1.6)；組胺酸(-3.2)；穀麩胺酸(-3.5)；穀麩醯胺(-3.5)；天冬胺酸(-3.5)；天冬醯胺(-3.5)；離胺酸(-3.9)；及精胺酸(-4.5)。

技藝中已知，可以另種具有相似親水指數或指標之胺基酸取代某些胺基酸，且所產生的蛋白質仍具有相似的生物活性，換言之，仍可獲得生物性功能相等的蛋白質。在進行這些改變時，取代之胺基酸親水性指標較佳在 ± 2 之內， ± 1 內者特佳，而 ± 0.5 內者尤佳。技藝中咸已知曉類似胺基酸的取代作用可根據親水特性有效的進行。美國專利案U.S. 4,554,101(其完整內容明確地一併併入本專利說明書參考)揭示蛋白質的最大局部平均親水性(由其鄰近的胺基酸之親水性決定)與蛋白質的生物特性有關聯性。

一如美國專利案U. S. 4,554,101所詳述，胺基酸殘基所設定的親水性數值如下：精胺酸(+3.0)；離胺酸(+3.0)；天冬胺酸(+3.0 $\pm$ 1)；穀麩胺酸(+3.0 $\pm$ 1)；絲胺酸(+0.3)；天冬醯胺(+0.2)；穀麩醯胺(+0.2)；甘胺酸(0)；蘇胺酸(-0.4)；脯胺酸(-0.5 $\pm$ 1)；丙胺酸(-0.5)；組胺酸(-0.5)；半胱胺酸(-1.0)；甲硫胺酸(-1.3)；纈胺酸(-1.5)；白胺酸(-1.8)；異白胺酸(-1.8)；酪胺酸(-2.3)；苯丙胺酸(-2.5)；色胺酸(-3.4)。咸已

知曉一胺基酸可取代另一具有相似親水性數值之胺基酸，而仍可獲得生物相等性(明確言之，免疫學相等性)之蛋白質。在此變化中，取代之胺基酸親水性指標較佳在 ± 2 之內， ± 1 內者特佳，而 ± 0.5 內者尤佳。

如上所述，因此胺基酸取代作用通常係以胺基酸側鏈取代基的相對相似性為基礎，例如，其疏水性、親水性、電價、大小及類似者。考量前述各種特性之可作為範例之取代作用係熟識技藝者所熟知的，包括有：精胺酸與離胺酸、穀麩胺酸與天冬胺酸；絲胺酸與蘇胺酸；麩胺醯胺與天冬醯胺；及纈胺酸、白胺酸與異白胺酸。這些是較佳的保守性取代作用。

根據胺基酸殘基的極性、電價、溶解性、疏水性、親水性及/或雙性特性，可進一步的進行胺基酸取代作用。例如，負電價胺基酸包括天冬胺酸及穀麩胺酸；正電價的胺基酸包括離胺酸及精胺酸；具有相似親水性數值之不帶電的極性基團胺基酸包括白胺酸、異白胺酸及纈胺酸；甘胺酸及丙胺酸；天冬醯胺及穀麩醯胺；及絲胺酸、蘇胺酸、苯丙胺酸及酪胺酸。其他類代表保守性變化的胺基酸包括(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；及(5) phe、tyr、trp、his。

提供T-細胞輔助(蛋白)之元素

與IL-13元素結合以製備本發明免疫原係提供外來T-細胞輔助(蛋白)之元素。最佳者，T-細胞輔助子抗原決定子

不僅對人類序列而言係外來物，對任何來自非-人類哺乳動物之IL-13序列亦為外來物。較佳所用的T-細胞輔助子抗原決定子為小分子，且係利用合成性、重組性或分子生物方法，加在或取代IL-13序列中間或末端。另一種方式是，T-細胞輔助子抗原決定子經由IL-13聚肽的化學偶合作用可加至包括T-細胞輔助子抗原決定子之載體蛋白質上。IL-13序列，或其功能相等片段亦可與T-細胞輔助子抗原決定子結合於一融合蛋白質上，其中此兩個係以重組方式製備在一起，例如，併入IL-13序列之肝炎B中心蛋白質。

本發明主旨中，係使用小的T-細胞輔助子抗原決定子，"外來T-細胞輔助子抗原決定子"或"T-細胞抗原決定子"是一種肽，其能夠鍵結至MHC II分子，並刺激動物物種中的T-細胞。較佳的外來T-細胞抗原決定子為雜混抗原決定子，換言之，可以鍵結動物物種或族群中多個不同MHC II分子之抗原決定子(Panina-Bordignon等人，歐洲免疫學雜誌1989, 19: 2237-2242; Reece等人，免疫學雜誌1993, 151: 6175-6184; 世界專利案95/07707)。

為使本發明免疫原在複雜不同基因背景的人類族群中能有臨床效果，較佳者包括數種外來T-細胞抗原決定子，雜混抗原決定子亦可為達此相同效果的另一個方式，包括天然存在之T-細胞抗原決定子，諸如來自破傷風類毒素者(例如，P2及P30抗原決定子)、白喉類毒素、感冒病毒血凝素(HA)，及惡性瘧原蟲CS抗原。用於本發明最佳的T-細胞抗原決定子為來自破傷風類毒素之P2及P30。

文獻中已經揭示一些雜混T-細胞抗原決定子，包括世界專利案WO 98/23635；Southwood等人，1998，免疫學雜誌，160：3363-3373；Sinigaglia等人，1988，自然336：778-780；Rammensee等人，1995，免疫遺傳學，41：4，178-228；Chicz等人，1993，實驗醫學雜誌，178：27-47；Hammer等人，1993，細胞74：197-203；及Falk等人，1994，免疫遺傳學，39：230-242。雜混T-細胞抗原決定子亦可為人工的序列，諸如"PADRE"(世界專利案WO 95/07707)。

異質性T-細胞抗原決定子較佳選自由可鍵結能表現一種以上人類MHC II分子之個體之抗原決定子，例如，明確言之，所包括的P2及P30抗原決定子係來自破傷風類毒素，Panina- Bordignon歐洲免疫學雜誌19 (12)，2237 (1989)。在較佳的具體實例中，異質性T-細胞抗原決定子為來自破傷風毒素之P2及P30。

P2抗原決定子具有QYIKANSKFIGITE序列，及對應破傷風毒素胺基酸830-843。

P30抗原決定子(破傷風毒素殘基947-967)具有FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE序列，可視情況將FNNFTV序列刪除。其他普遍的T抗原決定子可源自於惡性瘧原蟲之環孢蛋白，特別是具有DIEKKIAKMEKASSVFNVVNS序列之378-398區域(Alexander J, (1994)免疫學1 (9), 751- 761)。另一個抗原決定子係源自麻疹病毒融合蛋白殘基288-302，具有LSEIKGVIVHRLEGV序列(Partidos CD, 1990，遺傳病毒學雜誌71 (9) 2099-2105)。另一種抗原決定子源自肝炎

B病毒表面抗原，特別是具有FFLLTRILTIPQSLD序列的胺基酸。

另一組抗原決定子源自白喉毒素，有四種此種肽(胺基酸271-290、321-340、331-350、351-370)序列係位於毒素B片段的T區域中，而所餘的2種則是位在R區域(411-430、431-450)：

PVFAGANYAAWAVNVAQVI
VHHNTEEIIVAQSIALSSLMV
QSIALSSLMVAQAIPLVGEL
VDIGFAAYNFVESIINLFQV
QGESGHDIKITAENTPLPIA
GVLLPTIPGKLDVNKSKTHI

(Raju R., Navaneetham D., Okita D., Diethelm-Okita B., McCormick D., Conti-Fine B. M. (1995)歐洲免疫學雜誌25：3207-14)。

提供T-細胞輔助(蛋白)特佳元素是稱之為"CPC" (clyta-P2-clyta)的融合部分，其揭示於PCT/EP03/06096中。

最佳的外來T-細胞輔助子抗原決定子為無法被宿主免疫系統所忍受之"外來物"，且其非為源自或選自它種物種(非-接種者)IL-13序列之序列。

在本發明主旨中，係將天然的自體IL-13偶合至帶有免疫力載體之T-輔助子抗原決定子上，該共軛作用可以技藝中所熟識的方法為之。據此，例如，以直接共價偶合而言，其可利用碳二亞胺、戊二醛或(N-[γ -馬來亞胺丁鹽氧基]琥

珀醯亞胺酯，市售物慣用的異性雙功能連結子(諸如CDAP及SPDP(根據使用說明書))。偶合反應後，利用透析方法、過濾方法、分液方法等可將免疫原輕易地分離及純化。

本發明免疫原所使用的載體類型係熟識技藝者所熟知的。本發明可用之載體種類包括(未完全詳列)：透孔螺血藍蛋白(KLH)、血清白蛋白(諸如牛血清白蛋白(BSA))、失活細菌毒素(諸如破傷風或白喉毒素(TT及DT))，或其重組片段(例如，TT的片段C的區域1，或DT的易位區域)，或肺結核毒素純化蛋白衍生物(PPD)。另一種方式是，IL-13可直接共軛至脂小體載體上，其可另外再包括能夠提供T-細胞輔助(蛋白)之免疫原。IL-13與載體分子較佳的比例為1：1至20：1，而較佳每個載體應帶有介於3-15個IL-13分子。

在本發明一具體實例中，較佳的載體為源自嗜血感冒桿菌之蛋白質D(歐洲專利案EP 0 594 610 B1)。蛋白質D是種源自嗜血感冒桿菌的IgD-鍵結蛋白質，業經Forsgren申請專利(世界專利案WO 91/18926，核准歐洲專利案EP 0 594 610 B1)。在某些情況下，例如，在重組免疫原表現系統中，可利用蛋白質D的片段，例如，蛋白質D 1/3rd(包括蛋白質D的N-端100-110胺基酸(德國專利案GB 9717953.5))。

另一種較佳展現IL-13，或其具有免疫力片段之方法是為重組融合分子。例如，歐洲專利案0 421 635B揭示使用嵌合式嗜肝DNA病毒(hepadnavirus)中心抗原顆粒在類似病毒顆粒中展現外來肽序列。據此，本發明免疫原包括由B型肝炎病毒中心抗原組成之嵌合式顆粒中所展現之IL-13

，另外，重組性融合蛋白可包括IL-13及載體蛋白，諸如感冒病毒的NS1。任何重組性表現蛋白質均可為本發明一部分，編碼該免疫原的核酸亦為本發明的主旨。

較佳免疫原

上述段落中，已揭示IL-13元素及可提供T-細胞輔助(蛋白)元素之較佳定義。以本發明的組合而言，本發明意欲揭示源自IL-13元素部分之每一個別較佳元素與源自可提供T-細胞輔助(蛋白)部分之每一個別較佳元素之組合。特佳者係為免疫原1、11、12或13，及一載體蛋白或雜混T-細胞輔助子抗原決定子之組合。較佳的載體蛋白或雜混T-細胞輔助子抗原決定子包括蛋白D、CPC、P2或P30。

後文明確地揭示較佳的元素組合，以形成較佳的免疫原。

當IL-13元素為天然的人類IL-13，而提供T-細胞輔助(蛋白)之元素為雜混T-細胞抗原決定子時，較佳的實例包括：免疫原2(參考圖6，SEQ ID NO. 11)，其包括在蛋白質中插入P30(畫底線者)之人類IL-13(取代人類IL-13阿爾法螺旋C及D間的環狀區域)。

免疫原3(圖7，SEQ ID NO. 12)為在N-端帶有P30之人類IL-13免疫原。

免疫原4(圖8，SEQ ID NO. 13)為在蛋白質中插入p30之老鼠IL-13(取代老鼠IL-13阿爾法螺旋C及D間的環狀區域)，此為一個老鼠版的IL-13自體疫苗之實例。p30區域畫有底線。

免疫原5(圖9，SEQ ID NO. 14)為在N-端帶有p30的老鼠

IL13。此為一個老鼠版的IL-13自體疫苗之實例。p30區域畫有底線，且位於成熟老鼠IL-13蛋白序列的N-端。

所提供的IL-13元素為嵌合式IL-13免疫原之特別實例包括：

免疫原6(圖10，SEQ ID NO. 15)。此為老鼠版之疫苗形式之實例，其中"人類骨架"序列移植至老鼠B-細胞表面暴露抗原決定子，在其N-端帶有P30。

其他較佳的免疫原係以人類嵌合式IL-13"免疫原1"(SEQ ID NO. 10)為基礎，例如，免疫原1較佳係以N-端融合至載體"CPC"上，形成免疫原7(SEQ ID NO. 16，參考圖11)，或以N-端融合製蛋白質D上(蛋白質融合區域相對免疫原8(SEQ ID NO. 17，參考圖12)所包含之胺基酸S20至T127，係嗜血性感冒桿菌蛋白D序列的胺基酸(nb，編碼蛋白質D的DNA序列為最理想的密碼)；或以N-端融合至P30以產生免疫原9(SEQ ID NO. 18，參考圖13)。免疫原9較佳另外包括E121突變作用，以消除任何IL-13的生物活性，而產生免疫原10(SEQ ID NO. 19，參考圖14)。

免疫原1至10所示的蛋白質及DNA序列並無驅動將產物分泌出細胞時所需的胺基酸或DNA序列之訊號序列，較佳地，因此，該等序列可進一步提供一訊號序列。在DNA疫苗背景中，特佳地該訊號序列為包括非人類來源之T-細胞抗原決定子之序列，以便另外提供T-細胞輔助(蛋白)。所揭示的較佳序列中均無終止密碼，因為可用以表現融合有其他分子之蛋白(例如免疫球蛋白Fc，6His)，以幫助產製或

純化作用。

本專利說明書中所用編號系統遵守IL-13領域的正常編號實務，"GPVPP"中的G係為第2個殘基，而所剩下的胺基酸則依序編號之。

設計疫苗的方法

本發明一個重要的主旨，係提供一種設計疫苗之方法，該疫苗係用以治療罹患或易染可以中和IL-13活性治療之疾病，此等疾病包括COPD、氣喘及異位性失調症，諸如枯草熱、接觸性過敏及異位性皮膚炎。

本專利說明書中所揭示的方法包括兩個主要步驟：1.設計一嵌合式IL-13免疫原，及2.與IL-13免疫原結合，其為T-細胞抗原決定子的來源，對任何人類自體抗原決定子而言是外來物，且對任何哺乳動物IL-13序列而言亦為外來物。

在本專利說明書中，該方法包括：

(a) 取出人類IL-13的序列，並鑑定出預期可形成阿爾法螺旋結構的區域，及

(b) 突變位於這些阿爾法螺旋區域的人類IL-13序列，用保守性取代作用，或以發現於異種物種IL-13序列中相同位置處之胺基酸取代人類序列上的胺基酸，及

(c) 接合或插入一T-細胞抗原決定子來源，該來源對任何人類自體抗原決定子而言是外來物，對任何哺乳動物IL-13序列而言亦為外來物。

本方法主旨的一般性原理係設計一嵌合式序列，其在免疫原及人類天然IL-13間具有最大序列差異性，但仍保持兩

個組成間最大的形狀及架構相似性。藉由取代發現於預期自表面遮蔽區域中之胺基酸可完成此嵌合式免疫原。最佳係以發現於相同位置之它種哺乳動物IL-13之胺基酸來取代胺基酸，如此，所達到的序列差異性對免疫原的整體形狀/架構具有最低的改變。

據此，設計嵌合式IL-13免疫原較佳的方法包括下列步驟：

1. 從它處收集IL13序列，並利用諸如Clustal或Pileup等工具將其排列在一起，
2. 避免收集序列中必須不能的改變位置上發生突變，特別是3PVP、12ELIEEL、19NITQ、28LCN、32SMVWS、50SL、60AI、64TQ、87DTKIEVA、99LL、106LF，
3. 在所餘的序列中，較佳的突變作用發生在螺旋區域中(PSTALRELIEELVNIT、MYCAALES LI、KTQRMLSGF、AQFVKDLLLHLKKLFRE)，
4. 3或4未說明的區域視情況可含有突變作用，
5. 考量在其他物種相同位置IL13分子所發生的殘基，或其為化學保守性者來選擇突變作用。

分子模型可用來選擇特佳的取代作用，其因空間碰撞等影響分子整體形狀的可能性較低。

因此，本發明係提供一種製備人類嵌合式IL-13免疫原之方法，該免疫原與天然的人類IL-13具有相似的架構形態，然當其投與人類時，具有足夠的胺基酸序列差異性可促進其免疫力，該方法步驟包括：

(a) 取出人類IL-13序列，並在至少下列兩個阿爾法螺旋區

域進行至少一個取代突變作用：PSTALRELIEELVNIT、MYCAALES LI、KTQRMLSGF或AQFVKDLLLHLKKLFRE，

(b) 在下列高度物種間保守的區域中，包括至少六個區域未經突變：3PVP、12ELIEEL、19NITQ、28LCN、32SMVWS、50SL、60AI、64TQ、87DTKIEVA、99LL、106LF，

(c) 視情況突變任何其他位置之胺基酸，及

(d) 結合T-細胞抗原決定子來源，該來源對任何人類自體抗原決定子是外來物，其對任何哺乳動物IL-13序列而言亦為外來物，

本方法特徵在於步驟a、b或c所進行的任何取代作用皆為結構性保守性之取代作用。

步驟(a)背景中，較佳至少有兩處，更佳至少三處，而最佳所有四處的阿爾法螺旋區域包括至少一個取代突變作用。步驟(b)背景中較佳至少7處，更佳至少8處，更佳至少9處，更佳至少10處，而最佳所有11處的區域均未經突變。

另一種方式是，本發明提供一種用以製備人類嵌合式IL-13免疫原之方法，該免疫原與天然人類IL-13具有相似的架構形態，然當其投與人類時，具有足夠的胺基酸序列差異性可促進其免疫力，該方法包括下列步驟：

(a) 排列異種物種的IL-13胺基酸序列，

(b) 鑑定出高變異性及高保守性的區域，

(c) 取出人類IL-13序列，在高變異區進行突變作用，用保守性取代作用，或以發現於異種物種IL-13序列中相同位置處之胺基酸取代人類序列上的胺基酸，及

(d) 結合 T-細胞抗原決定子來源，該來源對任何人類自體抗原決定子而言是外來物，對任何哺乳動物 IL-13 序列而言亦為外來物。

在本發明相關主旨，亦提供一種用以製備人類嵌合式 IL-13 免疫原之方法，其包括下列步驟：

- (a) 排列異種物種的 IL-13 胺基酸序列，
- (b) 鑑定出高變異性及高保守性的區域，
- (c) 取出人類 IL-13 序列，在高變異區進行突變作用，用保守性取代作用，或以發現於異種物種 IL-13 序列中相同位置處之胺基酸取代人類序列上的胺基酸，及
- (d) 結合 T-細胞抗原決定子來源，該來源對任何人類自體抗原決定子而言是外來物，對任何哺乳動物 IL-13 序列而言亦為外來物。

在這些所有的方法中，較佳地這些取代作用或突變作用 50% 以上包括取自非-人類 IL-13 序列中相等位置之胺基酸，更佳者高於 60、或 70 或 80 百分比之取代作用包括取自非-人類哺乳動物 IL-13 序列中之相等位置之胺基酸，最佳者，每一取代作用或突變作用包括取自非-人類哺乳動物 IL-13 序列中相等位置之胺基酸。

另外在用以設計嵌合式人類免疫原之方法背景中，較佳這些取代作用或突變作用 50% 以上發生在預期係人類 IL-13 阿爾法螺旋結構區域中，更佳者 60，或 70，或 80 以上百分比之取代作用或突變作用發生在預期係人類 IL-13 阿爾法螺旋結構區域中，最佳者，每一取代作用或突變作用均發

生在預期係人類IL-13阿爾法螺旋結構區域中。

另外在用以設計嵌合式人類免疫原之方法背景中，較佳免疫原包括介於2及20個間之取代作用，更佳者介於6及15個間之取代作用，而最佳者為13個取代作用。

最佳地，在所有上述的這些方法中是在多處IL-13序列上具有取代突變作用，其中至少兩或多個的突變位置係與包括取自異種之非-人類哺乳動物之胺基酸取代作用有關，更佳者，該取代作用係與取自3或多個異種之非-人類哺乳動物之胺基酸有關，而最佳之取代作用係與取自4或多個異種之非-人類哺乳動物之胺基酸有關。

本發明亦提供一種源自上述任何方法之免疫原，當該免疫以適當方式調配成疫苗投與人類接種者時，其具有免疫力。

(例如)以適當的疫苗接種療程投用所得自體背景之聚肽，並觀察誘發能夠鍵結蛋白的抗體可證實本發明聚肽是成功的設計。利用重組性或純化天然蛋白的ELISA技術，或以檢測蛋白質在敏感性細胞或組織中的效果可評估此鍵結作用。特佳的評估方法是觀察蛋白質活性在完整宿主中的因果相關性現象，並測定是否存在本發明方法調控該現象所誘發之抗體。據此，本發明蛋白質可以誘發對抗物種天然抗原(源自於該物種)之抗體。

最為成功的設計可以用於實驗中(諸如本專利說明書所述之實例2)，並在至少50%疫苗接種個體中誘發出超過ED100之抗-IL-13中和免疫反應。

疫苗調配物

本發明疫苗調配物可以是以蛋白質為基礎之疫苗，其最常與一佐劑共同調配，另一種是該疫苗可為DNA或聚核苷酸疫苗形式的疫苗。

本發明聚肽免疫原係由本發明聚核苷酸所編碼。利用基因密碼，熟識技藝者可輕易地定出編碼聚肽之聚核苷酸序列。一旦定出所需的核酸序列，可根據實例中所述製備出所要序列之聚核苷酸，熟識技藝者可輕易地修正需要之參數，諸如引子及PCR條件。咸欲了解，因為基因密碼的退化性，熟識技藝者咸欲了解編碼本發明聚肽可能超過一種聚核苷酸。本發明聚核苷酸亦包括編碼分泌訊號肽之區域。

本發明聚核苷酸典型是RNA(例如，mRNA)，或DNA(例如，基因體DNA、cDNA或合成性DNA)。較佳聚核苷酸為DNA，特佳者為cDNA。

本發明另外提供一種包括本發明聚核苷酸之表現載體，其為核酸構築體，除此之外，該核酸構築體包括有需要之適當起始子、啟動子、促進子及其他的元素(諸如，例如聚腺苷酸訊號)，其位於正確的方向，以便在哺乳動物細胞中可以進行蛋白質表現。

啟動子可為真核細胞啟動子(例如CD68啟動子、Gal1、Gal10或NMT1啟動子)、原核啟動子(例如Tac、Trc或Lac)，或病毒啟動子(例如巨細胞病毒啟動子、SV40啟動子、多角蛋白啟動子、P10啟動子或呼吸融合病毒LTR啟動子)。較佳的啟動子為病毒啟動子，特佳者是當啟動子為巨細胞

病毒極早期啟動子，並視情況包括來自HCMV IE基因之基因外子1。

轉錄調控元素包括促進子(例如肝炎B表面抗原3'未轉譯區域、CMV促進子)；基因內子(例如，CD68基因內子，或CMV基因內子A)或調控區域(例如，CMV 5'未轉譯區域)。

聚核苷酸較佳係以人工方式連結至核酸構築體上的啟動子上，如此當構築體插入至哺乳動物細胞中時，即可表現聚核苷酸而產生所編碼的聚肽。

核酸構築體骨價可為RNA或DNA，例如質體DNA、病毒DNA、細菌DNA，細菌人工染色體DNA、酵母菌人工染色體DNA、合成性DNA。核酸構築體亦可能為人工核酸，例如硫代磷酸RNA或DNA。較佳的構築體為DNA，當其為質體DNA時尤佳。

本發明另外提供一表現本發明表現載體之宿主細胞，此細胞包括暫時性或較佳為穩定的高等真核細胞株(諸如諸如哺乳動物細胞或昆蟲細胞，其係利用(例如)桿狀病毒表現系統)、低等真核細胞(諸如酵母菌)或原核細胞(諸如細菌細胞)。經插入編碼本發明聚肽之載體而修飾之特別細胞實例包括哺乳動物細胞HEK293T、CHO、HeLa、NS0及COS細胞。所選擇的較佳細胞株不僅穩定，且可讓聚肽進行進行成熟的醣化作用。在轉型卵細胞可完成表現作用。本發明聚肽可在基因轉植性非-人類動物的細胞中表現，較佳者為老鼠或表現至大型哺乳動物的乳汁中，諸如山羊、綿羊及牛。表現本發明聚肽之基因轉植性非人類動物為本

發明範疇之內。本發明聚肽亦可表現於非洲爪蟾的卵細胞中。

本發明亦包括醫藥組合物或疫苗組合物，其包括有效治療量之本發明聚核苷酸或核酸構築體或聚肽，其可視情況與醫藥學上可接受之載劑組合使用，較佳係與醫藥學上可接受賦形劑組合使用，諸如磷酸緩衝性鹽溶液(PBS)、食鹽溶液、葡萄糖、水、甘油、乙醇、脂小體或其組合。另一種方式是疫苗組合物可包括有效治療量之本發明構築體，其係調配至金屬珠粒上，較佳為黃金珠粒。本發明疫苗組合物亦可包括佐劑，諸如，例如具體實例中之咪喹莫特(imiquimod)、吐卡瑞索(tucarecol)或鋁鹽。

較佳地，佐劑係與本發明免疫原同時投用，在較佳的具體實例中，係調配在一起。本發明意欲包括之此種佐劑有(但不侷限於此，且不排除其他藥劑者)：合成性咪唑喹啉(諸如咪喹莫特(imiquimod)[S-26308、R-837]，(Harrison等人'單獨使用或與醣化蛋白疫苗組合使用以減少HSV疾病的復發'，疫苗 19：1820-1826，(2001))；及瑞斯奎莫(resiquimod)[S-28463、R848](Vasilakos等人'免疫反應修飾劑 R848 佐劑活性：與 CpG ODN 比較'，細胞免疫學 204：64-74 (2000))、在抗原展現細胞及 T-細胞表面上持續表現的羧基及胺的西福鹽基，諸如吐卡瑞索(Rhodes, J.等人'以共同刺激性西福鹽基形成藥物之免疫系統之治療有效性'，自然 377：71-75 (1995))、細胞激素、化學激素及共同刺激性分子、Th1 誘導子(諸如珈瑪干擾素、IL-2、IL-12、IL-15 及 IL-18)

、Th2誘導子(諸如IL-4、IL-5、IL-6、IL-10)及其他化學激素及共同刺激性基因(諸如MCP-1、MIP-1阿爾法、MIP-1貝它、RANTES、TCA-3、CD80、CD86及CD40L)、其他免疫刺激性標的配位基(諸如CTLA-4及L-選擇凝集素、細胞凋零刺激蛋白及肽(諸如Fas、(49)、以合成性脂質為基礎之佐劑(諸如發克斯凡汀(Vaxfectin)，(Reyes等人，'發克斯凡汀(Vaxfectin)促進抗原專一性抗體效價並維持對質體DNA免疫作用之Th1類型免疫反應'，疫苗19：3778-3786)、角鯊烯、阿爾法-生育醇、聚山梨酸酯80、DOPC及膽固醇、內毒素、[LPS]、Beutler, B.，'內毒素，'類鐸受體4及天生免疫性之傳入途徑'，微生物學現今觀念3：23-30(2000))；CpG寡-及二核苷酸，Sato, Y等人，'有效皮膚內基因免疫作用所需之免疫刺激性DNA序列'，科學273(5273)：352-354(1996)。Hemmi, H.等人，'類鐸受體辨識細菌DNA'，自然408：740-745，(2000)及其他具效力配位基驅動鐸受體產生Th1-誘發細胞激素(諸如合成性分枝桿菌脂蛋白、分枝桿菌蛋白p19、肽聚糖、磷壁酸及脂質A。

引發主要Th1類型反應之某些較佳佐劑包括(例如)脂質A衍生物，諸如單磷酸鹽基脂質A，或較佳為3-去-O-鹽基化磷酸鹽基脂肪A。MPL[®]佐劑可購自Corixa公司(西雅圖，WA；參考，例如美國專利案US 4,436,727；4,877,611；4,866,034及4,912,094)。含CpG-寡核苷酸(其中CpG二核苷酸未甲基化)亦可誘發顯著的Th1反應，此寡核苷酸是為人所熟知的，並揭示於(例如)世界專利案WO 96/02555、WO 99/33488

及美國專利案 US 6,008,200 及 5,856,462 中。免疫刺激性 DNA 序列亦揭示於(例如)Sato 等人，科學 273: 352, 1996 中。另一種較佳的佐劑包括皂苷，諸如 Quil A，或其衍生物，包括 QS21 及 QS7 (Aquila 生物醫藥公司，Framingham, MA)；七葉素；洋地黃皂苷；或滿天星 (Gypsophila) 或白藜 (Chenopodium quinoa) 皂苷。

明確言之，佐劑包括免疫刺激性 CpG 寡核苷酸，諸如揭示於世界專利案 WO 96102555 中者。典型地免疫刺激性寡核苷酸的長度介於 8-100 鹼基之間，且包括通式 $X_1 \text{ CpG } X_2$ ，其中 X_1 及 X_2 為核苷酸鹼基，且 C 及 G 未甲基化。

本發明疫苗中所用較佳的寡核苷酸較佳含有兩或多個二核苷酸 CpG 中心，其較佳被至少三或多個(較佳至少六或多個)核苷酸分開。本發明寡核苷酸典型地為去氧核苷酸。在一較佳具體實例中，寡核苷酸的中間核苷酸為二硫代磷酸，或更加者為硫代磷酸鍵結，雖然磷酸二酯及其他中間核苷酸鍵結係為包括混有中間核苷酸鍵結(例如，混合硫代磷酸/磷酸二酯)之寡核苷酸之本發明範疇內。可使用能穩定寡核苷酸之其他中間核苷酸鍵結。產生硫代磷酸寡核苷酸或二硫代磷酸的方法揭示於美國專利案 US 5,666,153、US 5,278,302 及世界專利案 WO 95/26204 中。

較佳的寡核苷酸實例具有下列的序列，該序列較佳含有硫代磷酸修飾中間核苷酸鍵結。

寡核苷酸 1: TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT (CpG 1826)

寡核苷酸 2: TCT CCC AGC GTG CGC CAT (CpG 1758)

寡核苷酸3： ACC GAT GAC GTC GCC GGT GAC GGC ACC
ACG

寡核苷酸4： TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT (CpG
2006)

寡核苷酸5： TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT (CpG 1668)

另一種CpG寡核苷酸可包括上述較佳的序列，其中其具有不連貫的刪除或加成作用。

本發明所用之CpG寡核苷酸可以技藝中所熟知的方法合成(例如，歐洲專利案EP 468520中所揭示者)，利用自動合成儀可方便地合成出此等寡核苷酸。用於老鼠且含有CpG寡核苷酸之佐劑調配物可購自Qiagen公司，商品名為"ImmunEasy"。CpG中較佳的佐劑係以約1：1重量比比例吸附至氫氧化鋁之OLIGO 1、2、3、4或5。人類所用者較佳為OLIGO 4。

較佳是CpG與揭示於世界專利案WO 00/62800及WO 00/09159中之皂苷(諸如QS21)組合使用。

治療方法

本發明提供特異性疾病之新穎治療法，其包括疫苗中能夠產生對抗IL-13之免疫反應之免疫原。最值得注意的是本發明提供一種治療罹患或易感COPD、氣喘或異位性皮膚炎之方法，其包括投與該個體根據本發明之疫苗，藉此提升該個體之血清中和抗-IL-13免疫反應，藉此舒緩或消除COPD、氣喘或異位性皮膚炎的症狀。

另外亦提供本發明免疫原在製備治療氣喘醫藥上的用途

，另外本發明亦提供治療氣喘之方法，其包括投與有需要此治療之個體本發明說明書所揭示之醫藥組合物或疫苗。

較佳地醫藥組合物係可提升對抗IL-13免疫反應之疫苗，所提升之免疫反應較佳為抗體反應，最佳者為IL-13中和抗體免疫反應。

本發明亦提供：

- 一種表現載體，其包括本發明聚核苷酸，且可表現本發明聚肽；
- 一種宿主細胞，其包括本發明表現載體；
- 一種製備本發明聚肽之方法，該方法包括在適合獲得表現該聚肽及分離該聚肽的條件下，維持本發明宿主細胞；
- 一種疫苗組合物，其包括本發明聚肽或聚核苷酸及醫藥學上可接受之載劑。

本發明治療方法提供一種治療氣喘的方法，其包括一或多項下列的臨床效果：

1. 減少氣道過度-反應性(AHR)
2. 減少黏液過度的分泌及杯狀細胞組織變形
3. 減少氣道表皮細胞下的纖維化
4. 減少嗜伊紅白血球數目
5. 減少吸入性腎上腺皮脂類固醇(ICS)的使用需要，其亦為以IL13自體疫苗成功治療的一個特徵。

本發明組合物可為預防及治療兩者之用途。本發明提供根據本發明聚肽及聚核苷酸在醫藥上的用途。本發明另外

提供本發明聚肽及聚核苷酸在製備用以治療過敏、呼吸疾病(諸如氣喘及COPD)、蠕蟲感染相關性疾病、肝臟纖維化或硬化等疾病之醫藥上之用途。

本發明亦提供一種疫苗接種的方法，其包括投與病患有效量之疫苗組合物，並激發起病患對該疫苗組合物之免疫反應。

本發明亦提供本專利說明書所揭示之疫苗組合物，以用以疫苗接種哺乳動物對抗IL-13媒介之疾病，諸如過敏、呼吸疾病、蠕蟲感染相關疾病、肝臟纖維化及硬化。能夠引發對抗IL-13之中和反應之疫苗組合物因此可作為治療人類氣喘治療之用，特別是過敏性氣喘。咸亦已應用於某些蠕蟲感染相關疾病(Brombacher, 2000生物分析22:646-656)及IL-13的產生與纖維化有關之疾病上(Chiaramonte等人，1999，臨床研究雜誌104:777-785)，諸如慢性阻塞性肺疾病(COPD)及肝硬化。

本發明治療方法提供一種治療異位性皮膚炎之方法，其包括一或多項下列的臨床效果：

1. 減少皮膚刺激
2. 減少搔癢及抓傷
3. 減少慣用療法之需求
4. 倘適用減少局部腎上腺皮脂類固醇之使用需求。理想的IL13自體疫苗使ICS類固醇治療可能是多餘的，雖然減少ICS'使用頻率'或'所需劑量'亦視為有效的結果。

本發明亦提供治療或預防IL-13媒介之疾病、與其有關之

症狀或疾病之方法，其包括投與有效含量之根據本發明蛋白質、聚核苷酸、載體或醫藥組合物。投與醫藥組合物可以一或多劑個別劑量形式為之，例如，"首劑-追加接種"疫苗接種療程。在某些情況下，"首劑"疫苗接種可經顆粒媒介DNA傳送根據本發明聚核苷酸，較佳係併入至一質體衍生之載體中，而利用投與包括相同聚核苷酸序列之重組性病毒載體進行"追加接種"，或以併以佐劑之蛋白質追加接種。

本發明提供藉由投與宿主本發明疫苗，以產生抗自體IL-13抗體反應之方法。

本發明疫苗組合物可以各種的方式投用，例如，經黏膜(諸如經口及鼻腔)；肺臟，肌肉內、皮下或皮膚內途徑。當所投用之抗原係以蛋白質為基礎之疫苗時，疫苗典型地係與佐劑調配之，且可冷凍乾燥，在注射之前復水使用。此種組合物可以注射用組合物(例如，無菌懸浮液，較佳為等張性質)投與個體。典型地，此種組合物可以肌肉內方式投要，但其他的投藥途徑也可能。

一種皮膚內投藥之技術與顆粒擊打有關(其亦稱為'基因槍'技術，揭示於美國專利案US 5371015)。蛋白質可與醣類調配形成小顆粒，或將編碼抗原之DNA塗覆在惰性顆粒(諸如黃金珠粒)上，並加速至足以使其穿透過受體(例如，皮膚)之速度，例如，利用噴射裝置於高壓下將其釋放出來。(塗覆本發明核酸疫苗構築體之顆粒及蛋白質糖類顆粒與負載此顆粒之裝置一樣係屬本發明範疇內)。其他投用核酸

構築體或含有該等構築體之組合物可包括以揭示於美國專利案US 5,697,901之超音波、電刺激法、電穿孔法及顯微種植法直接投與受體。

亦可利用基因療法中特異的傳送載體投用本發明核酸構築體，例如，Verme等人，自然1997, 389: 239-242中討論的基因治療法，病毒及非病毒兩種系統均可使用。以病毒為基礎之系統包括以反轉錄病毒、慢病毒、腺病毒、腺病毒相關病毒、疱疹病毒及牛痘病毒為基礎之系統。非病毒基礎之系統包括直接投用核酸及以脂小體為基礎之系統。例如，載體可被脂小體包覆或載入聚乳酸-甘醇酸共聚物(PLG)顆粒中。本發明核酸構築體亦可以轉型宿主細胞投用之，此種細胞包括從個體所回收的細胞。核酸疫苗構築體可引入至試管內之此等細胞中，而後再將該等轉型細胞回種至個體體中。本發明核酸構築體藉由同質性重組作用可整合至存於細胞中的核酸上，若有需要，轉型細胞可在試管內生長，而一或多個所得細胞可用於本發明上。利用已知的手術或顯微手術(例如，移植，顯微注射等)可將細胞放置在病患適當的位置上。適當的細胞包括樹突狀細胞。

投用疫苗組合物之含量各異，端視接種哺乳動物之物種種類及重量、欲治療/欲對抗之疾病狀態、所採用的疫苗接種步驟(換言之，單劑投藥相對重複劑量投藥)、投藥的途徑及所選擇佐劑化合物的效價及劑量而定。根據這些變數，醫藥或獸醫從事人員可輕易地定出適當的劑量含量，但

是(例如)當疫苗為核酸時，則劑量為0.5-5微克/公斤的核酸構築體或含該等物質之組合物。明確言之，劑量可隨著投藥的途徑而有所不同，例如，當黃金珠粒以皮膚內途徑投藥時，總劑量較佳介於1微克-10奈克之間，尤佳者，總劑量介於10微克及1奈克之間。當直接投用核酸構築體時，總劑量通常較高，例如，介於50微克及1或更多毫克之間。上述劑量是為平均個案之實例。

在蛋白質疫苗中，每一疫苗劑量中蛋白質含量係選自於可誘發典型疫苗接種者免疫保護性反應，但不會有明顯副作用的含量，此含量端視所採用的專一性免疫原及其如何展現而定，一般而言，咸預期每一劑量包括1-1000微克之蛋白質，較佳1-500微克，較佳為1-100微克，最佳者為1-50微克。利用觀察疫苗接種個體中適當免疫反應之標準研究方法來確認特定疫苗的最佳含量。在第一次疫苗接種後，個體可在足夠的間隔時間接種一或多劑之追加疫苗，此一疫苗調配物可為初次接種或追加接種之療程；可全身性投藥，例如，經皮、皮下或肌肉內途徑，或例如以鼻腔內或經口途徑施用至黏膜表現上。

當然，理所當然具有較高或較低劑量範圍之個別實例，且該等劑量範圍皆屬本發明範疇內。

本疫苗組合物可以一次為基礎投用或重複投用(例如)介於1及7次之間，較佳介於1及4次之間，時間間隔約1天及約18個月之間，較佳為1個月。此可視情況根據病患餘生以介於1及12個月之固定間隔調整，在一個具體實例中，病患以

初次追加疫苗之療程法接種不同形式之抗原，據此，例如，第一次抗原係以DNA為基礎之疫苗投用，而後則是投用以蛋白質佐劑為基礎之調配物。然而，此治療療程另可根據所關注動物大小及物種種類、所投用之核酸疫苗及/或蛋白質組合物含量、投藥途徑、所用任何佐劑化合物之效價及劑量及其他因子而加以變化，該等因子是熟識獸醫或醫藥從事人員所熟知的。

在此專利說明書整篇文中，"包括"及"包含"或變化詞句(諸如"comprising"，"comprises"，"including"，"includes"等)不僅包括未明確詳述之整體或元素的内容物，且同時包括其他如"組成"具有排他性之字義。

一如本專利說明書所揭示，本發明係關於經分離聚肽及經分離聚核苷酸。在本發明背景中"經分離"一詞意欲表達非處天然狀態之聚肽或聚核苷酸，在此範圍內，其業經至少純化至某種程度，或(例如)以重組性方法或機械合成作用合成。因此，"經分離"包括與其他生物或非-生物物質組合之聚肽或聚核苷酸之可能性，諸如，細胞、細胞懸浮液或細胞片段、蛋白質、肽、表現載體、有機或無機溶劑，或其他適當物質，但排除發現於自然界之聚核苷酸狀態。

本發明以下列實例(但不侷限於此)舉例說明。

實例 1，方法學

下述方法採用下列的命名法：

1. 帶有插入在蛋白質上(取代介於老鼠IL13阿爾法螺旋

C及D間的環狀區區)之破傷風毒素p30抗原決定子之老鼠IL13構築體(mIL-13)稱之為mIL13p30CD。

2. 在N-端帶有p30的老鼠IL13構築體稱為mIL13p30。

3. N-端帶有p30之新穎嵌合式IL13設計構築體稱為cIL13new。

IL-13次選殖/修飾作用

以合成方式製備編碼含有源自插入CD環之破傷風毒素p30之mIL-13的基因(mIL13CD)。所合成的基因包含5'KpnI限制酶切割位置及3'BamHI限制酶切割位置。而後次選殖介於Kpn I及Bam HI間pCDN片段(編碼DHFR)(Aiyer等人, 1994)。插入一FC融合物進一步地修飾所得之中間物, 利用位置引導插入性突變作用精確地以順讀方式於IL-13的3'端序列終止密碼後插入人類IgG1 FC (Geisser等人2001)。此有兩個步驟: 1. IgG1 FC係以cDNA模板、pCDN-FC, 利用下列引子(正向: 5'..CAACTGTTTCGCCACGGCCCCCTTCCTGGAGGTCCTGTTCGGTGGACCAGGATCCGAGCCCCAAATCGGCCGAC...3'及反向: 5'...CTAGGTAGTTGGTAACCGTTAACGG...3')以KOD矯正讀寫聚合酶(Novagen)進行PCR反應催化增幅而得。2. 所得PCR產物經電泳膠片純化, 以250奈克為標的片段, 利用含有50奈克之mIL-13 CD-pCDN及2.5單位之Pfu Turbo之QuickChange套組(Stratagene)進行位置引導突變作用。突變作用步驟包括在95°C 30秒、55°C 30秒及68°C 16分鐘共18次循環。突變作用步驟終了後, 以10單位Dpn I消化反應物, 去除原始的甲基化野生型模板的DNA。使用1微升

最終消化反應物轉型100微升Epicurian化學處理之勝任大腸桿菌細胞(Stratagene)。以限制酶消化作用篩選重組的選殖體，利用IL-13正向引子及pCDN反向引子全向跨越FC區域者則確定係為陽性選殖體序列。最終的質體，pCDNmIL13CDFC可編碼C-端FC融合物，其可以PreScission蛋白酶切割位置去除FC。轉錄作用係在CMV啟動子的控制下，所插入的完整序列示於圖18 (SEQ ID NO. 23)。

pCDNmIL13p30FC的構築方式完全與上述構築pCDNmIL13CDFC的方式相同，只要用一個成熟蛋白質N端(而非在CD環上)上具有p30抗原決定子之基因取代mIL13CD合成基因即可。使用相同的正向及反向引子，可產生出位置引導突變作用時所要插入至pCDNmIL13p30之FC區域的標的片段。所插入的完整序列示於圖19 (SEQ ID NO. 24)。

pCDNcIL13newFC係利用編碼cIL13new分子之合成基因及下列正向引子(5'..AACCTGTTTCGCCGCGGCCCCCTTCC TGGAGGTCCTGTTTCGGTGGACCAGGATCCGAGCCCAAAT CGGCCGAC...3'，(SEQ ID NO. 25))及上述相同的反向引子構築而成，以產生位置引導突變作用時所要插入至pCDNcIL13new之FC區域的標的片段。所插入的完整序列示於圖20 (SEQ ID NO. 26)。

用老鼠嵌合式IL-13以位置引導作用取代pCDNmIL13CDFC中的mIL13CD可構築出pCDNIL13oldFC(參考世界專利案02/070711)。位置引導取代作用一如位

置引導插入作用所述。CIL13是利用下列引子(正向：5'...GTGTCTCTCCCTCTGACCC TTAGG...3' (SEQ ID NO. 27) 及反向：5'...CAGTTGCTTTGTGTAGCTGAGCAG...3' (SEQ ID NO. 28)自6His-cIL13以PCR增幅而得，以產生置換至pCDNmIL13的標的片段。此可產生一個精確融合至編碼於5'端IL-13訊號序列及編碼於3'端PreScission-FC區域之融合物。所插入的完整序列示於圖21 (SEQ ID NO. 29)。

在所有的18至21的圖示中，畫有雙底線胺基酸殘基者表示為分泌訊號序列(在表現流程中去除且會從宿主細胞分泌出來)、單底線殘基、Precission蛋白酶位置及斜體殘基為Fc融合部分。

產生穩定的CHO E1A選殖體

質體穩定的表現在DHFR陰性、可表現E1A的細胞株中(CHO E1A, ACC317)。將細胞以 1×10^7 細胞/毫升的密度重新懸浮於冷的磷酸緩衝蔗糖液中，移植至Gene Pulser槽中，並在GenePulser (Biorad)儀器中以400伏特及25uFd條件，以15微克經Not I直線化質體電擊化。經電擊的細胞接種至內含1X核苷完全培養液之96個槽孔的培養盤中(每個槽孔為 2.5×10^3 活細胞)。48小時後，培養液換成不含有核苷的新鮮培養液，細胞其後在不含有核苷的條件下篩選3-4週之久。利用FC-電話學冷光偵測步驟(Yang, 等人, 1994)於Origen分析儀(IGEN)，監控條件培養液中FC表現，自96槽孔培養盤中篩選出陽性選殖體。將陽性細胞株於不含核苷完全培養液中增幅至數公升，發酵作用係在34°C下進行

10-11天，收集條件培養液，經0.2微米過濾膜過濾，進行FC純化作用。

純化作用：

CHO培養液加至ProSep-A高能力樹脂(Bioprocessing有限公司)捕抓老鼠IL13CD/Fc。用0.1 M甘胺酸pH=3.0沖堤老鼠IL13CD/Fc、以1 M HEPES pH=7.6中和，並以25 mM磷酸鈉0.15 M氯化鈉pH=7 (Spectra/Por[®] 7膜，MWCO：8000)透析。從3.8公升的CHO培養液中所得之總產量為644毫克老鼠IL13CD/Fc，其他IL13/Fc融合蛋白以相似的方法製備之。

研究疫苗接種之前，利用Precission蛋白酶將這些分子的Fc部分切割並去除，所得疫苗製劑包括圖18至21中所示為原來之這些胺基酸殘基(換言之，既非畫線也非斜體者)。

參考文獻

Aiyer, N, Baker, E, Wu, H-L, Nambi, P, Edwards, RM, Trill, JJ, Ellis, C, Bergsma, DJ. (1994)：人類AT1受體為單倍基因：在穩定細胞株中的特徵。分子及細胞生化學131：75-86。

Geiser, M, Cebe, R, Drewello, D, 及 Schmitz, R (2001)：未使用限制酵素及DNA接合酶將PCR片段整合至選質載體中任何特定位置中。生物技術61：88-92。

Yang, H, Leland, JK, Yost, D, Massey, RJ (1994)：電化學冷光：一種新穎診斷及研究工具。生物技術，12：193-194。

實例 2，抗-IL13 疫苗在老鼠氣喘模式中的功效

老鼠氣喘模式

卵白蛋白再激老鼠氣喘模式是例行性於活體內用以評估氣喘治療法功效者。用 2 劑腹膜內劑量(兩劑間隔 7 天)之卵白蛋白致敏老鼠，建立老鼠對於卵白蛋白的敏感性。而後給與 3 劑鼻腔內劑量的卵白蛋白產生氣喘外觀，經此步驟的老鼠對於痙攣原 5HT 呈現高含量的氣道過度反應性，肺發炎現象(最為明顯的是肺臟組織的嗜伊紅白血球症及支氣管-肺泡灌洗液體)，及肺臟氣道表皮大量杯狀細胞組織變形(及相關黏液高度分泌)。此外觀模擬人類氣喘發生所見現象(相似的老鼠氣喘模式揭示於科學 1998，282 冊，2258-2261 頁及 2261-2263 頁中)。此模式亦揭示於世界專利案 WO 02/070711。

抗-IL13 疫苗治療

在卵白蛋白再激老鼠氣喘模式中評估兩種抗-IL13 疫苗治療方法之功效，老鼠已事先以卵白蛋白(Sigma 英國公司，Poole, Dorset)致敏。兩者係以揭示於世界專利案 WO 02/070711 中之老鼠嵌合式 IL13 分子為基礎，其表現及純化成帶有 GST 之融合蛋白。本專利說明書命名為 gst-cIL13。

1. 疫苗 1=gst-cIL13+'ImmunEasy'佐劑(Qiagen，目錄編號 303101)。

2. 疫苗 2=gst-cIL13+包括膽固醇與 10 微克 3-去-O-醯基化單磷酸醯基脂肪 A (3D-MPL)及 10 微克 QS21 皂苷組合之脂小體(參考歐洲專利案 EP0822831B1，SmithKline Beecham

Biologicals S.A.)。

陰性疫苗治療控制組亦包括在內。

3. 疫苗1之陰性控制組=gst+'ImmunEasy'佐劑。

4. 疫苗2之陰性控制組=gst+包括膽固醇與10微克3-去-O-醯基化單磷酸醯基脂肪A (3D-MPL)及10微克QS21皂苷組合之脂小體(參考歐洲專利案EP0822831B1, SmithKline Beecham Biologicals S.A.)。

老鼠經卵白蛋白致敏後接種4劑的疫苗，每劑疫苗間隔4週共12週之久。而後老鼠用卵白蛋白進行再激，並評估氣喘的外觀狀態。

其他功效研究之控制治療組

A. 地塞美松(Dexamethasone)(Sigma英國公司, Poole, Dorset)在此老鼠氣喘模式中是例行性所使用之黃金-標準類固醇治療法。在卵白蛋白再激期間，以腹腔內投藥途徑給予老鼠3劑1.5毫克/公斤地塞美松。

B. 在此老鼠氣喘模式中，陽性控制治療組係以被動免疫方式投與抗-老鼠IL-13多株抗體(事先於眷養兔子中所製備之純化藥劑蛋白A)。在卵白蛋白再激期間，投與事先已證明可在此老鼠氣喘模式產生完全抗-IL13功效之抗體劑量(=3劑0.5毫升之儲備藥劑，末端效價為 2×10^5 ，詳細內容參考世界專利案WO 02/070711 A1)。

C. 利用鹽水在陰性控制治療組中建立此模式所產生最大的外觀(Fresenius Kabi, Warrington, 英國公司)。在卵白蛋白再激期間，以鼻腔內途徑投與老鼠3劑鹽水，鹽水治療證

明在此模式中並無功效，因此，會產生最為嚴重的氣喘外觀。

D. 為比較氣喘模式外觀與'未誘發氣喘外觀'基礎線，一組治療只以卵白蛋白致敏，不給予卵白蛋白再激劑量，這些老鼠呈現正常的肺部生理狀態。

用抗-IL13疫苗免疫老鼠，或以被動免疫投與抗-IL13多株抗體後所產生之血清IL13中和作用能力

在老鼠氣喘模式的終了，利用老鼠IL13-誘發TF-1細胞增生分析法(揭示於世界專利案WO 02/070711)分析經疫苗或被動免疫抗-IL13多株抗體之治療老鼠取出血清樣品之IL13中和能力。此分析方法產生的中和測量值稱為 ND_{50} ，其代表在TF-1細胞增生分析法中，能夠減少50% 5奈克/毫升老鼠IL13生物活性之最大老鼠血清的稀釋度。

我們先前的據數亦證明，在此老鼠氣喘模式中，利用被動免疫方式投與中和抗-IL13抗體之最大功效與血清 ND_{50} 數值具有相關性，約為1/476。此重要的中和作用含量我們稱為 ED_{100} (具有100%功效所需的有效中和劑量)，通常表示血清中和能力係與此含量有關。例如，具有 ND_{50} 1/952之血清樣品具有 $2.0 \times ED_{100}$ 之中和能力，具有 ND_{50} 1/238之血清樣品具有 $0.5 \times ED_{100}$ 之中和能力。

此實驗所得之血清IL13中和能力示於圖22中，以 ED_{100} 的倍數繪圖。

以嵌合式IL13疫苗或以被動免疫方式投與抗-IL13多株抗體之所有老鼠產生血清中和能力超過 $1 \times ED_{100}$ 。因此，

咸預期在這些治療組中之老鼠在氣喘模式中可接受完全抗-IL13所驅動的益處。

氣道過度-反應(AHR)數據

吸入痙攣原所得反應數據曲線用以測定氣道對支氣管括約肌刺激物的反應。這些曲線包括兩個主要部分：

1. 超敏感性-劑量反應曲線(DRC)左邊偏移曲線
2. 過度反應性-DRC的斜率增加及/或水平反應減少

這些部分一起產生通稱名詞'支氣管或氣道過度反應性'(BHR或AHR)，此典型定義為'針對支氣管括約肌刺激物所反應出之氣道窄化容易度及程度之增加'。

以一劑5HT的痙攣原再激有意識的老鼠，而後利用全身體箱計裝置(Buxco, Sharon, CT)測定對呼吸氣流及體積參數的效應而求出AHR。自此分析之較佳的讀值參數為測量所增加之脈動(PENH)。圖23所示係從此實驗中以5HT痙攣原(濃度為3毫克/毫升)所得曲線數值之PENH區域的AHR數據。數據點係所指治療組的平均值及標準平均差。

疫苗治療及以被動免疫方式投用抗-IL-13多株抗體在減少AHR程度上與地塞美松的效果一樣。陰性疫苗治療組並未減少AHR。

肺發炎數據

評估氣管-肺泡灌洗液體(BAL)中肺發炎細胞含量。嗜伊紅白血球、巨嗜細胞、淋巴球及嗜中性白血球的平均數目對所接受的治療方式作圖(圖24)。

疫苗治療及以被動免疫方式投用抗-IL-13多株抗體在減

少BAL流體中嗜伊紅白血球數量上與地塞美松的效果一樣。有趣的是，陰性治療控制組gst+'ImmunEasy'亦顯然可有效的減少BAL嗜伊紅白血球數量，此可能是因為'ImmunEasy'佐劑中CpG成分(已知是具有原-Th1活性之免疫調控化合物)活性所造成的。

杯狀細胞組織變形及黏液超分泌數據

含有杯狀細胞的黏液正常下不會高頻率地出現在老鼠氣道表皮。在此氣喘模式中，經卵白蛋白致敏及再激後，由於表皮層的組織變形，氣道表皮會密佈含有杯狀細胞之黏液。

固定作用後，每隻動物肺臟的代表性樣品以石蠟組織學方式處理之。切出5微米切片，並先以 α -澱粉酶(Sigma英國公司，Poole, Dorset)消化處理，並以ABPAS (Alcian blue periodic acid Schiff's reagent，BDH-默克)染色，以進行氣道杯狀細胞的組織學評估(Propath英國公司，Hereford，英國所撰之製備組織學)。

利用下述6-項半定量計分系統，經ABPAS染色之肺臟切片針對杯狀細胞數目給予數值，所得結果示於圖25中。

杯狀細胞的計分系統

分數	觀察現象
0	沒有杯狀細胞
1	非常少量的杯狀細胞
2	少量的杯狀細胞
3	中等數量之杯狀細胞
4	大量的杯狀細胞
5	非常大量的杯狀細胞

注意的是計分系統非為直線，數值2或3與表皮所存在的杯狀細胞數目差異相當明顯。

某些處理組的代表切片如圖 26A 為 gst-cIL13+'ImmunEasy'；圖 26B 為 gst-'ImmunEasy'；圖 27A 為 gst-cIL13+含有與 10 微克 3-去-O-醯基化單磷酸醯脂肪 A (3D-MPL)及 10 微克 QS21 皂苷之膽固醇之脂小體(參考歐洲專利案 EP 0822831B1，SmithKline Beecham Biologicals S.A.)；圖 27B 為 gst+含有與 10 微克 3-去-O-醯基化單磷酸醯脂肪 A (3D-MPL)及 10 微克 QS21 皂苷之膽固醇之脂小體(參考歐洲專利案 EP 0822831B1，SmithKline Beecham Biologicals S.A.)；圖 28 為地塞美松；圖 29 為最大的氣喘外觀特徵。

以疫苗處理或以被動免疫方式投與抗-IL13 多株抗體兩者均明顯地減少了氣道表皮中黏液中杯狀細胞的數量，比起鹽水處理組(最大的外觀特徵)，此杯狀細胞數目的減少與所有抗-IL13 處理組相當的明顯($p < 0.01$)。陰性控制疫苗則無功效。地塞美松處理組在研究中對杯狀細胞組織變形(GCM)則有非常低的功效。

總結

在老鼠氣喘模式中，抗-IL13 疫苗處理對消除氣喘性外觀特徵上非常有效果，抗-IL13 疫苗對治療 AHR 及嗜伊紅白血球症上與地塞美松效果一樣，對於治療杯狀細胞組織變形及黏液超分泌上則優於地塞美松。

實例3，杯狀細胞組織變形與血清IL13中和能力含量的關聯性

某些動物接種抗-IL13疫苗後血清中IL13所達到的中和抗體含量低於 $1.0 \times ED_{100}$ ，為了測定這些動物是否會有任何辨識的利益(謹記 ED_{100} 的定義是最大的利益)，以卵白蛋白再激動物，並測定GCM的程度。下列的數據表示杯狀細胞組織變形數值與經接種疫苗後在血清中所誘發之IL13中和能力抗體的含量之關係。

杯狀細胞的計分系統

分數	觀察現象
0	沒有杯狀細胞
1	非常少量的杯狀細胞
2	少量的杯狀細胞
3	中等數量之杯狀細胞
4	大量的杯狀細胞
5	非常大量的杯狀細胞

杯狀細胞數據示於下表1及圖30中：

表 1

老鼠	GCM分數	中和能力
A1	2.5	0.41
2	3	0.3
4	3.5	0.31
8	3.5	0.21
9	3.5	0
10	2	0.8
11	1.5	0.36
12	3	0.37
14	3	0
15	2.5	0.3
16	2.5	0.34
18	3	0
20	3.5	0
C30	3	0
31	3	0.21
33	3	0
34	4	0
35	3.5	0
36	3	0
38	3	0.24
41	2.5	0.36
42	3	0.34
43	3.5	0
45	3	0
46	1.5	0.8
47	2.5	0.31
48	2	0.26

此分析中只包括產生血清IL13中和能力低於 $1 \times ED_{100}$ 之老鼠，因為根據定義，血清IL13能力等於或高於 $1 \times ED_{100}$ 者之動物對杯狀細胞組織變形會達到最大抑制性。

數據顯示血清IL13中和能力與杯狀細胞組織變形具有關聯性($R^2=0.52$)，較高的IL13中和能力含量，則杯狀細胞組織變形較低。

這些數據與實例3所得數據，同時證實 ED_{100} 測量值可作為抗-IL13治療對抗氣喘外觀特徵功效上之預測工具。任何的疫苗、抗體、可溶性受體或其他IL13中和處理均可以下列評估之：

1. 以所要的劑量及頻率，給予受體IL13中和處理。
2. 抽取血清樣品。
3. 分析血清樣品，將其稀釋，以IL13生物分析法(諸如TF1增生分析法)測定血清樣品中的IL13 ND_{50} 。選定生物分析法，測定出抑制5奈克/毫升老鼠IL13之50%特定效果之最大血清稀釋度。以對抗人類IL13的處理而言，仍可使用TF1生物分析法，但刺激的細胞激素則為人類IL13，使用的濃度範圍為3-6奈克/毫升。
4. 將所得 ND_{50} 除以1/476，產生 ED_{100} 倍數。
5. 若此倍數等於或高於1.0，則IL13中和處理則被認為在氣喘外觀特徵上具有最大功效。
6. 若此倍數低於1.0，例如，0.2或更低，則認為沒有明顯的功效。
7. 假若倍數介於這些限值之間，而可見某些程度的功效，

但其非最大功效，表示此處理是有改善的。

此步驟可用以作為選擇最大功效所需的劑量之指引，假若，經初期給予數劑藥劑後，血清IL13中和能力未達至少等於 $1.0 \times ED_{100}$ 的程度時，則可再給予劑量使中和能力達到此程度。

實例 4，與各種佐劑組合之抗-IL13蛋白疫苗之免疫力

此研究係為探討 gst-cIL-13 免疫原 (有 / 或無額外的雜混 T-細胞抗原決定子 P30) 與數種不同佐劑組合之免疫力。

gst-cIL13 蛋白免疫力研究

BalbC 老鼠首次疫苗接種溶於佐劑之 100 微克 gst-cIL13，而後追加接種溶於佐劑之 50 微克 gst-cIL13。以四週為基礎進行疫苗接種，每次疫苗接種後 2 週，自老鼠取出血清樣品 (以監控在血清樣品中這些抗體所產生的 IL13 中和能力)。
gst-cIL-13 免疫原與四種不同的佐劑組合：

A 組	吸附在氫氧化鋁上之 CpG-2006
B 組	CpG-1826
C 組	CFA 首次接種 / IFA 追加接種
D 組	氫氧化鋁

CpG-2006 及 CpG-1826 是包含未甲基化 CG 二核苷酸的寡核苷酸，在文獻中熟知係用以處理免疫刺激活性。CFA/IFA 分別代表完全或不完全福氏佐劑。

血清樣品中這些抗體所產生的 IL13 中和能力係以老鼠 IL13 生物分析法測定之 (TF-1 細胞增生分析法)。下表所示

為接種4劑後99天的結果(以ED₁₀₀的倍數表示)。數據亦以圖31的圖形呈現。在此圖形及其後相似的圖形中，每一點代表一隻動物的血清IL13中和能力測定值。其血清中和能力低於分析方法敏感度閾值($<0.2 \times \text{ED}_{100}$)的動物未畫點於圖形上。

IL13中和能力

以ED₁₀₀表示

BalbC老鼠

佐劑處理

	A	B	C	D
1	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
2	2.7	<0.2	<0.2	<0.2
3	0.5	<0.2	<0.2	<0.2
4	<0.2	1.4	<0.2	<0.2
5	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2

與gst-cIL13蛋白組合之佐劑A(吸附在氫氧化鋁上之CpG(2006))在產生中和抗-IL13抗體反應上最具效果。以氫氧化鋁或CFA/IFA佐劑組合之gst-cIL13蛋白處理之老鼠並未偵測到中和抗-IL13抗體反應。

p30-cIL13蛋白質

研究 1

此研究中係使用不同形式的IL13疫苗。此為另一種嵌合式IL13分子，其在N端上包含源自於破傷風毒素之p30抗原決定，其係由質體pCDNcIL13newFC(圖20)所編碼，其作為

疫苗研究之製備方法如實例1中所述。名為p30-cIL13之完全處理分子如下所述。

五隻CD-1老鼠首次疫苗接種併有佐劑之40微克p30-cIL13，而後追加接種40微克p30-cIL13。以四週為基礎進行疫苗接種，每次疫苗接種後2週，自老鼠取出血清樣品(以監控所存抗-老鼠IL13抗體的含樣及在血清樣品中這些抗體所產生的IL13中和能力)。亦分析三隻未接種疫苗的CD-1老鼠的血清樣品，以作為陰性控制組。

組別 佐劑

A ImmuneasyTM(購自Qiagen公司)

B 包括與10微克3-去-O-醯基化單磷酸醯基脂肪A(3D-MPL)及10微克QS21皂苷組合之膽固醇之脂小體(參考歐洲專利案EP0822831B1，SmithKline Beecham Biologicals S.A.)。

C 未接種

利用ELISA測定抗-老鼠IL13抗體含量(血清樣品稀釋1/100)。下表所示為接種3次疫苗後63天的結果(以490奈米吸收值表示)，數據亦繪成圖32表示，其中每一條柱代表單一隻老鼠的數據。

ELISA數據

在490奈米處的吸收值
老鼠

	1	2	3	4	5
A	2.654	2.377	2.0995	1.5925	2.4125
B	2.81	2.398	n/a	2.6775	2.95
C	0.049	0.0595	0.1095		

(n/a=沒有可用樣品)

兩種與p30-cIL13蛋白組合之佐劑在CD-1老鼠中均可提升抗-IL13抗體反應。

以老鼠IL13生物分析法(TF-1細胞增生分析法)測定血清樣品中這些抗體所產生的IL13中和能力。下表所示為接種3次疫苗後63天的結果(以ED₁₀₀的倍數表示)，數據亦繪成圖33表示。

IL13中和能力
以ED₁₀₀表示

CD-1老鼠	A	B
1	0.755	4.444
2	<0.2	2.963
3	<0.2	n/a
4	<0.2	11.429
5	<0.2	3.077

與p30-cIL13蛋白組合之佐劑B在產生中和抗-IL13抗體反應上最具效果，5隻老鼠中有4隻所產生的有效抗-IL13中

和抗體反應超過 $1 \times ED_{100}$ 。與之相較，當以與ImmunEasy佐劑(佐劑A)組合之p30-cIL13處理時，只有1隻老鼠會產生中和抗-IL13抗體反應。

研究 2

含有 3D-MPL 及 QS21 之油狀乳化佐劑之 p30-cIL13 蛋白

五隻 CD-1 老鼠首次疫苗接種併有佐劑之 40 微克 p30-cIL13，而後追加接種 40 微克 p30-cIL13。以四週為基礎進行疫苗接種，每次疫苗接種後 2 週，自老鼠取出血清樣品(以監控所存抗-老鼠 IL13 抗體的含樣及在血清樣品中這些抗體所產生的 IL13 中和能力)。亦分析三隻未接種疫苗的 CD-1 老鼠的血清樣品，以作為陰性控制組。

組別 佐劑

A ImmunEasyTM

B 水包油乳化液(油相：1：1體積比角鯊烯：阿爾法生育醇混合物，膽固醇+TWEEN 80TM表面活性劑)+10微克 3D-MPL 及 10 微克 QS21)(詳細內容參考世界專利案 WO 99/11241，(說成 SB62c'))

C 未接種

利用 ELISA 測定抗-老鼠 IL13 抗體含量(血清樣品稀釋 1/100)。下表所示為接種 3 次疫苗後 63 天的結果(以 490 奈米吸收值表示)，數據亦繪成圖 34 表示。

ELISA 數據

在 490 奈米處的吸收值
老鼠

	1	2	3	4	5
A	2.654	2.377	2.0995	1.5925	2.4125
B	2.8165	2.906	2.9035	n/a	3.081
C	0.049	0.0595	0.1095		

兩種與 p30-cIL13 蛋白組合之佐劑在 CD-1 老鼠中均可提升抗 -IL13 抗體反應。

以老鼠 IL13 生物分析法 (TF-1 細胞增生分析法) 測定血清樣品中這些抗體所產生的 IL13 中和能力。下表所示為接種 3 次疫苗後 63 天的結果 (以 ED₁₀₀ 的倍數表示)，數據亦繪成圖 35 表示。

IL13 中和能力
以 ED₁₀₀ 表示

CD-1 老鼠	A	B
1	0.755	3.077
2	<0.2	9.524
3	<0.2	3.333
4	<0.2	n/a
5	<0.2	1.176

與 p30-cIL13 蛋白組合之佐劑 B 在產生中和抗 -IL13 抗體反應上最具效果，5 隻老鼠中有 4 隻所產生的有效抗 -IL13 中

和抗體反應超過 $1 \times \text{ED}_{100}$ 。與之相較，當以與ImmunEasy佐劑(佐劑A)組合之p30-cIL13處理時，只有1隻老鼠會產生中和抗-IL13抗體反應。

研究 3

含有油狀乳化佐劑之p30-cIL13蛋白(沒有免疫刺激物)

五隻CD-1老鼠首次疫苗接種併有佐劑之40微克p30-cIL13，而後追加接種40微克p30-cIL13。以四週為基礎進行疫苗接種，每次疫苗接種後2週，自老鼠取出血清樣品(以監控所存抗-老鼠IL13抗體的含樣及在血清樣品中這些抗體所產生的IL13中和能力)。亦分析三隻未接種疫苗的CD-1老鼠的血清樣品，以作為陰性控制組。

組別 佐劑

A ImmunEasy™

B 水包油乳化液(油相：1：1體積比角鯊烯：阿爾法生育醇混合物，膽固醇+TWEEN 80™表面活性劑)(詳細內容參考世界專利案WO 9517210)

C 未接種

利用ELISA測定抗-老鼠IL13抗體含量(血清樣品稀釋1/100)。下表所示為接種3次疫苗後63天的結果(以490奈米吸收值表示)，數據亦繪成圖36表示，其中每一條柱代表單一隻老鼠的數據。

ELISA數據

在490奈米處的吸收值
老鼠

	1	2	3	4	5
A	2.654	2.377	2.0995	1.5925	2.4125
B	n/a	3.038	1.5625	n/a	n/a
C	0.049	0.0595	0.1095		

兩種與 p30-cIL13 蛋白組合之佐劑在 CD-1 老鼠中均可提升抗 -IL13 抗體反應。

以老鼠 IL13 生物分析法 (TF-1 細胞增生分析法) 測定血清樣品中這些抗體所產生的 IL13 中和能力。下表所示為接種 3 次疫苗後 63 天的結果 (以 ED₁₀₀ 的倍數表示)，數據亦繪成圖 37 表示。

IL13 中和能力
以 ED₁₀₀ 表示

CD-1 老鼠	A	B
1	0.755	n/a
2	<0.2	0.32
3	<0.2	0.69
4	<0.2	n/a
5	<0.2	n/a

與 p30-cIL13 蛋白組合之佐劑 B 在產生中和抗 -IL13 抗體反應上最具效果，5 隻老鼠中有 2 隻可產生的抗 -IL13 中和抗體反應。與之相較，當以與 ImmunEasy 佐劑 (佐劑 A) 組合之

p30-cIL13處理時，只有1隻老鼠會產生中和抗-IL13抗體反應。

總結

P30免疫原會明顯增加基因背景不同之CD-1老鼠品系中免疫反應的能力，據此推測此免疫原的用途不侷限於具有單一免疫背景之動物，而P30亦應可在基因背景不同人類臨床背景上獲得有益的效果。

【圖式簡單說明】

圖1人類IL-13成熟形式的序列為SEQ ID NO. 1。

圖2老鼠IL-13成熟形式的序列為SEQ ID NO. 2。

圖3數種哺乳動物及非人類靈長類之IL-13的序列(SEQ ID NO. 3至9)。

圖4數種哺乳動物及非人類靈長類之IL-13的序列(SEQ ID NO. 3至9)。

圖5較佳的IL-13元素(免疫原1，SEQ ID NO. 10)。

圖6較佳的實例免疫原2 (SEQ ID NO. 11)。

圖7較佳的實例免疫原3 (SEQ ID NO. 12)。

圖8較佳的實例免疫原4 (SEQ ID NO. 13)。

圖9較佳的實例免疫原5 (SEQ ID NO. 14)。

圖10較佳的實例免疫原6 (SEQ ID NO. 15)。

圖11較佳的實例免疫原7 (SEQ ID NO. 16)。

圖12較佳的實例免疫原8 (SEQ ID NO. 17)。

圖13較佳的實例免疫原9 (SEQ ID NO. 18)。

圖14較佳的實例免疫原10 (SEQ ID NO. 19)。

圖 15較佳的實例免疫原 11 (SEQ ID NO. 20)。

圖 16較佳的實例免疫原 12 (SEQ ID NO. 21)。

圖 17較佳的實例免疫原 13 (SEQ ID NO. 22)。

圖 18 SEQ ID NO. 23。

圖 19 SEQ ID NO. 24。

圖 20 SEQ ID NO. 26。

圖 21 SEQ ID NO. 29。

圖 22在疫苗治療組及以被動免疫方式投用抗 IL-13之治療老鼠所產生的平均血清 IL13中和能力。

圖 23以 5HT 痙攣原(濃度為 3 毫克/毫升)所得曲線數值之 PENH區域的 AHR數據。

圖 24評估氣管-肺泡灌洗液體(BAL)中肺發炎細胞含量。

圖 25經 ABPAS 染色之肺臟切片針對杯狀細胞數目給予數值所得結果。

圖 26 某些處理組的代表切片，圖 26A 為 gst-cIL13+'ImmunEasy'；及圖 26B 為 gst-'ImmunEasy'。

圖 27A 為 gst-cIL13+含有與 10 微克 3-去-O-醯基化單磷酸醯脂肪 A (3D-MPL)及 10 微克 QS21 皂苷之膽固醇之脂小體。

圖 27B 為 gst+含有與 10 微克 3-去-O-醯基化單磷酸醯脂肪 A (3D-MPL)及 10 微克 QS21 皂苷之膽固醇之脂小體。

圖 28經地塞美松處理之切片。

圖 29最大的氣喘外觀特徵。

圖 30 杯狀細胞組織變形 (GCM)計分與血清中所產生之 IL13中和程度的相關性。

圖 31 不同佐劑對 gst-cIL13 免疫力的效果。

圖 32 佐劑對 p30-cIL13 免疫力的效果，血清樣品稀釋 100 倍。

圖 33 佐劑對 p30-cIL13 免疫力的效果。

圖 34 佐劑對 p30-cIL13 免疫力的效果，血清樣品稀釋 100 倍。

圖 35 佐劑對 p30-cIL13 免疫力的效果。

圖 36 佐劑對 p30-cIL13 免疫力的效果，血清樣品稀釋 100 倍。

圖 37 佐劑對 p30-cIL13 免疫力的效果。

序列表

<110> 強納森 亨利 艾利斯
克萊爾 艾希曼

<120> 疫苗

<130> PG4938

<140> TW 092123745

<141> 2003-09-28

<150> GB 0220212.5
GB 0304672.9

<151> 2002-08-30
2003-02-28

<160> 29

<170> FastSEQ 視窗版本 4.0

<210> 1
<211> 112
<212> PRT
<213> 人類 IL-13

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

<210> 2
<211> 111
<212> PRT
<213> 老鼠 IL-13

<400> 2
Gly Pro Val Pro Arg Ser Val Ser Leu Pro Leu Thr Leu Lys Glu Leu
1 5 10 15
Ile Glu Glu Leu Ser 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 Phe Cys Val
35 40 45
Ala Leu Asp Ser Leu Thr Asn Ile Ser Asn Cys Asn Ala Ile Tyr Arg
50 55 60
Thr Gln Arg Ile Leu His 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 His Phe Ile Thr
85 90 95
Lys Leu Leu Ser Tyr Thr Lys Gln Leu Phe Arg His Gly Pro Phe
100 105 110

<210> 3
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 猪 IL-13

<400> 3
 Gly Pro Val Pro Pro His Ser Thr Ala Leu Lys Glu Leu Ile Glu Glu
 1 5 10 15
 Leu Val Asn Ile Thr Gln Asn Gln Lys Thr Pro Leu Cys Asn Gly Ser
 20 25 30
 Met Val Trp Ser Val Asn Leu Thr Thr Ser Met Gln Tyr Cys Ala Ala
 35 40 45
 Leu Glu Ser Leu Ile Asn Ile Ser Asp Cys Ser Ala Ile Gln Lys Thr
 50 55 60
 Gln Arg Met Leu Ser Ala Leu Cys Ser His Lys Pro Pro Ser Glu Gln
 65 70 75 80
 Val Pro Gly Lys His Ile Arg Asp Thr Lys Ile Glu Val Ala Gln Phe
 85 90 95
 Val Lys Asp Leu Leu Lys His Leu Arg Met Ile Phe Arg His Gly
 100 105 110

<210> 4
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 牛 IL-13

<400> 4
 Ser Pro Val Pro Ser Ala Thr Ala Leu Lys Glu Leu Ile Glu Glu Leu
 1 5 10 15
 Val Asn Ile Thr Gln Asn Gln Lys Val Pro Leu Cys Asn Gly Ser Met
 20 25 30
 Val Trp Ser Leu Asn Leu Thr Ser Met Tyr Cys Ala Ala Leu Asp
 35 40 45
 Ser Leu Ile Ser Ile Ser Asn Cys Ser Val Ile Gln Arg Thr Lys Lys
 50 55 60
 Met Leu Asn Ala Leu Cys Pro His Lys Pro Ser Ala Lys Gln Val Ser
 65 70 75 80
 Ser Glu Tyr Val Arg Asp Thr Lys Ile Glu Val Ala Gln Phe Leu Lys
 85 90 95
 Asp Leu Leu Arg His Ser Arg Ile Val Phe Arg Asn Glu Arg Phe Asn
 100 105 110

<210> 5
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 犬 IL-13

<400> 5
 Ser Pro Val Thr Pro Ser Pro Thr Leu Lys Glu Leu Ile Glu Glu Leu
 1 5 10 15
 Val Asn Ile Thr Gln Asn Gln Ala Ser Leu Cys Asn Gly Ser Met Val
 20 25 30
 Trp Ser Val Asn Leu Thr Ala Gly Met Tyr Cys Ala Ala Leu Glu Ser
 35 40 45
 Leu Ile Asn Val Ser Asp Cys Ser Ala Ile Gln Arg Thr Gln Arg Met

```

      50              55              60
Leu Lys Ala Leu Cys Ser Gln Lys Pro Ala Ala Gly Gln Ile Ser Ser
65              70              75              80
Glu Arg Ser Arg Asp Thr Lys Ile Glu Val Ile Gln Leu Val Lys Asn
      85              90              95
Leu Leu Thr Tyr Val Arg Gly Val Tyr Arg His Gly Asn Phe Arg
      100              105              110

```

<210> 6
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 大鼠 IL-13

```

<400> 6
Gly Pro Val Arg Arg Ser Thr Ser Pro Pro Val Ala Leu Arg Glu Leu
1              5              10              15
Ile Glu Glu Leu Ser Asn Ile Thr Gln Asp Gln Lys Thr Ser Leu Cys
      20              25              30
Asn Ser Ser Met Val Trp Ser Val Asp Leu Thr Ala Gly Gly Phe Cys
      35              40              45
Ala Ala Leu Glu Ser Leu Thr Asn Ile Ser Ser Cys Asn Ala Ile His
      50              55              60
Arg Thr Gln Arg Ile Leu Asn Gly Leu Cys Asn Gln Lys Ala Ser Asp
65              70              75              80
Val Ala Ser Ser Pro Asp Thr Lys Ile Glu Val Ala Gln Phe Ile
      85              90              95
Ser Lys Leu Leu Asn Tyr Ser Lys Gln Leu Phe Arg Tyr Gly His
      100              105              110

```

<210> 7
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 狒狒(cynomolgus) IL-13

```

<400> 7
Ser Pro Val Pro Pro Ser Thr Ala Leu Lys Glu Leu Ile Glu Glu Leu
1              5              10              15
Val Asn Ile Thr Gln Asn Gln Lys Ala Pro Leu Cys Asn Gly Ser Met
      20              25              30
Val Trp Ser Ile Asn Leu Thr Ala Gly Val Tyr Cys Ala Ala Leu Glu
      35              40              45
Ser Leu Ile Asn Val Ser Gly Cys Ser Ala Ile Glu Lys Thr Gln Arg
      50              55              60
Met Leu Asn Gly Phe Cys Pro His Lys Val Ser Ala Gly Gln Phe Ser
65              70              75              80
Ser Leu Arg Val Arg Asp Thr Lys Ile Glu Val Ala Gln Phe Val Lys
      85              90              95
Asp Leu Leu His Leu Lys Lys Leu Phe Arg Glu Gly Gln Phe Asn
      100              105              110

```

<210> 8
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 恒河猴(rhesus) IL-13

<400> 8

```

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

```

<210> 9

<211> 112

<212> PRT

<213> 狨猴(marmoset) IL-13

<400> 9

```

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

```

<210> 10

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工人类 IL-13 疫苗免疫原

<400> 10

```

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

```

Ser Leu Arg Val Arg Asp Thr Lys Ile Glu Val Ala Gln Phe Val Thr
 85 90 95
 Asp Leu Leu Val His Leu Lys Arg Leu Phe Arg Gln Gly Thr Phe Asn
 100 105 110

<210> 11
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工人類 IL-13 疫苗免疫原

<400> 11
 Gly Pro Val Pro Pro Ser Thr Ala Leu Arg Glu Leu Ile Glu Glu Leu
 1 5 10 15
 Val Asn Ile Thr Gln Asn Gln Lys Ala Pro Leu Cys Asn Gly Ser Met
 20 25 30
 Val Trp Ser Ile Asn Leu Thr Ala Gly Met Tyr Cys Ala Ala Leu Glu
 35 40 45
 Ser Leu Ile Asn Val Ser Gly Cys Ser Ala Ile Glu Lys Thr Gln Arg
 50 55 60
 Met Leu Gly Gly Phe Cys Pro His Lys Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser
 65 70 75 80
 Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu Asp Thr
 85 90 95
 Lys Ile Glu Val Ala Gln Phe Val Lys Asp Leu Leu Leu His Leu Lys
 100 105 110
 Lys Leu Phe Arg Glu Gly Arg Phe Asn
 115 120

<210> 12
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工人類 IL-13 疫苗免疫原

<400> 12
 Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser
 1 5 10 15
 Ala Ser His Leu Glu Gly Pro Val Pro Pro Ser Thr Ala Leu Arg Glu
 20 25 30
 Leu Ile Glu Glu Leu Val Asn Ile Thr Gln Asn Gln Lys Ala Pro Leu
 35 40 45
 Cys Asn Gly Ser Met Val Trp Ser Ile Asn Leu Thr Ala Gly Met Tyr
 50 55 60
 Cys Ala Ala Leu Glu Ser Leu Ile Asn Val Ser Gly Cys Ser Ala Ile
 65 70 75 80
 Glu Lys Thr Gln Arg Met Leu Gly Gly Phe Cys Pro His Lys Val Ser
 85 90 95
 Ala Gly Gln Phe Ser Ser Leu His Val Arg Asp Thr Lys Ile Glu Val
 100 105 110
 Ala Gln Phe Val Lys Asp Leu Leu Leu His Leu Lys Lys Leu Phe Arg
 115 120 125

Glu Gly Arg Phe Asn
130

<210> 13
<211> 123
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工人類 IL-13 疫苗免疫原

<400> 13
Gly Pro Val Pro Arg Ser Val Ser Leu Pro Leu Thr Leu Lys Glu Leu
1 5 10 15
Ile Glu Glu Leu Ser 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 Phe Cys Val
35 40 45
Ala Leu Asp Ser Leu Thr Asn Ile Ser Asn Cys Asn Ala Ile Tyr Arg
50 55 60
Thr Gln Arg Ile Leu His Gly Leu Cys Asn Arg Lys Phe Asn Asn Phe
65 70 75 80
Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu
85 90 95
Glu Asp Thr Lys Ile Glu Val Ala His Phe Ile Thr Lys Leu Leu Ser
100 105 110
Tyr Thr Lys Gln Leu Phe Arg His Gly Pro Phe
115 120

<210> 14
<211> 132
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工人類 IL-13 疫苗免疫原

<400> 14
Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser
1 5 10 15
Ala Ser His Leu Glu Gly Pro Val Pro Arg Ser Val Ser Leu Pro Leu
20 25 30
Thr Leu Lys Glu Leu Ile Glu Glu Leu Ser Asn Ile Thr Gln Asp Gln
35 40 45
Thr Pro Leu Cys Asn Gly Ser Met Val Trp Ser Val Asp Leu Ala Ala
50 55 60
Gly Gly Phe Cys Val Ala Leu Asp Ser Leu Thr Asn Ile Ser Asn Cys
65 70 75 80
Asn Ala Ile Tyr Arg Thr Gln Arg Ile Leu His Gly Leu Cys Asn Arg
85 90 95
Lys Ala Pro Thr Thr Val Ser Ser Leu Pro Asp Thr Lys Ile Glu Val
100 105 110
Ala His Phe Ile Thr Lys Leu Leu Ser Tyr Thr Lys Gln Leu Phe Arg
115 120 125
His Gly Pro Phe
130

<210> 15
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工人類 IL-13 疫苗免疫原

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

<210> 16
 <211> 249
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工人類 IL-13 疫苗免疫原

<400> 16
 Tyr Val His Ser Asp Gly Ser Tyr Pro Lys Asp Lys Phe Glu Lys Ile
 1 5 10 15
 Asn Gly Thr Trp Tyr Tyr Phe Asp Ser Ser Gly Tyr Met Leu Ala Asp
 20 25 30
 Arg Trp Arg Lys His Thr Asp Gly Asn Trp Tyr Trp Phe Asp Asn Ser
 35 40 45
 Gly Glu Met Ala Thr Gly Trp Lys Lys Ile Ala Asp Lys Trp Tyr Tyr
 50 55 60
 Phe Asn Glu Glu Gly Ala Met Lys Thr Gly Trp Val Lys Tyr Lys Asp
 65 70 75 80
 Thr Trp Tyr Tyr Leu Asp Ala Lys Glu Gly Ala Met Gln Tyr Ile Lys
 85 90 95
 Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Gly Val Met Val Ser Asn
 100 105 110
 Ala Phe Ile Gln Ser Ala Asp Gly Thr Gly Trp Tyr Tyr Leu Lys Pro
 115 120 125
 Asp Gly Thr Leu Ala Asp Arg Pro Glu Gly Pro Val Pro Pro Ser Ser
 130 135 140

```

Ala Leu Lys Glu Leu Ile Glu Glu Leu Ala Asn Ile Thr Gln Asn Gln
145          150          155          160
Lys Ala Pro Leu Cys Asn Gly Ser Met Val Trp Ser Ile Asn Leu Thr
          165          170          175
Ala Gly Met Tyr Cys Ala Ala Leu Asp Ser Leu Ile Asn Val Ser Gly
          180          185          190
Cys Ser Ala Ile Glu Arg Thr Gln Arg Ile Leu Ser Ala Phe Cys Pro
          195          200          205
His Lys Val Ser Ala Gly Gln Phe Ser Ser Leu Arg Val Arg Asp Thr
          210          215          220
Lys Ile Glu Val Ala Gln Phe Val Thr Asp Leu Leu Val His Leu Lys
225          230          235          240
Arg Leu Phe Arg Gln Gly Thr Phe Asn
          245

```

<210> 17

<211> 220

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工人類 IL-13 疫苗免疫原

<400> 17

```

Ser Ser His Ser Ser Asn Met Ala Asn Thr Gln Met Lys Ser Asp Lys
1      5      10      15
Ile Ile Ile Ala His Arg Gly Ala Ser Gly Tyr Leu Pro Glu His Thr
          20      25      30
Leu Glu Ser Lys Ala Leu Ala Phe Ala Gln Gln Ala Asp Tyr Leu Glu
          35      40      45
Gln Asp Leu Ala Met Thr Lys Asp Gly Arg Leu Val Ile His Asp
50      55      60
His Phe Leu Asp Gly Leu Thr Asp Val Ala Lys Lys Phe Pro His Arg
65      70      75      80
His Arg Lys Asp Gly Arg Tyr Tyr Val Ile Asp Phe Thr Leu Lys Glu
          85      90      95
Ile Gln Ser Leu Glu Met Thr Glu Asn Phe Glu Thr Gly Pro Val Pro
          100     105     110
Pro Ser Ser Ala Leu Lys Glu Leu Ile Glu Glu Leu Ala Asn Ile Thr
          115     120     125
Gln Asn Gln Lys Ala Pro Leu Cys Asn Gly Ser Met Val Trp Ser Ile
130     135     140
Asn Leu Thr Ala Gly Met Tyr Cys Ala Ala Leu Asp Ser Leu Ile Asn
145     150     155     160
Val Ser Gly Cys Ser Ala Ile Glu Arg Thr Gln Arg Ile Leu Ser Ala
          165     170     175
Phe Cys Pro His Lys Val Ser Ala Gly Gln Phe Ser Ser Leu Arg Val
          180     185     190
Arg Asp Thr Lys Ile Glu Val Ala Gln Phe Val Thr Asp Leu Leu Val
          195     200     205
His Leu Lys Arg Leu Phe Arg Gln Gly Thr Phe Asn
210     215     220

```

<210> 18

<211> 133

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工人類 IL-13 疫苗免疫原

<400> 18

```

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

```

<210> 19

<211> 133

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工人類 IL-13 疫苗免疫原

<400> 19

```

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

```

<210> 20

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工人類 IL-13 疫苗免疫原

<400> 20

```

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

```

<210> 21

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工人類 IL-13 疫苗免疫原

<400> 21

```

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

```

<210> 22

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工人類 IL-13 疫苗免疫原

<400> 22

```

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

```

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

<210> 23
<211> 1260
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工人類 IL-13 疫苗免疫原

<400> 23
aaccgtcaga tcgcctggag acgccatcga attcgggtacc gccaccatgg cgctctgggt 60
gactgcagtc ctggctcttg cttgccttg tggtctcgcc gcccagggc cgggtgccacg 120
ttctgtgtct ctccctctga cccttaagga gcttattgag gagctgagca acatcacaca 180
agaccagact cccctgtgca acggcagcat ggtatggagt gtggacctgg ccgctggcgg 240
gttctgtgta gccctggatt ccctgaccaa catctccaat tgcaatgcca tctaccgtac 300
ccagcgtatt ttgcatggcc tctgtaaccg caagttaa aatattaccg ttagcttttg 360
gttgctgtgt cctaaagtat ctgctagtca tttagaagat accaaaatcg aagtagccca 420
ctttattaca aaactgctca gctacacaaa gcaactgttt cgccacggcc ccttcctgga 480
ggtcctgttc cagggaccag gatccgagcc caaatcgcc gacaaaactc acacatgccc 540
accgtgccc gcacctgaac tcttggggg accgtcagtc ttctcttcc ccccaaaacc 600
caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca tgcgtgggtg tggacgtgag 660
ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc 720
caagacaaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac cgtgtggtca gcgtcctcac 780
cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag tgcaaggctc ccaacaaagc 840
cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca 900
ggtgtacacc ctgccccat cccgggagga gatgaccaag aaccagggtca gcctgacctg 960
cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc 1020
ggagaacaac tacaagacca cgctcccgt gctggactcc gacggctcct tcttctctta 1080
tagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt 1140
gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa 1200
atgagtgtag atccgttaac ggttaccaac tacctagga tccgttaacg gttaccaact 1260

<210> 24
<211> 1260
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工人類 IL-13 疫苗免疫原 13

<400> 24
aaccgtcaga tcgcctggag acgccatcga attcgggtacc gccaccatgg cgctctgggt 60
gactgcagtc ctggctcttg cttgccttg tggtctcgcc gcccattta ataattttac 120
cgtttagcttt tggttgcgtg ttcctaaagt atctgctagt catttagaag ggccgggtgc 180

acgttctgtg	tctctccctc	tgacccttaa	ggagcttatt	gaggagctga	gcaacatcac	240
acaagaccag	actccctgt	gcaacggcag	catggtatgg	agtgtggacc	tggccgctgg	300
cgggttctgt	gtagccctgg	attccctgac	caacatctcc	aattgcaatg	ccatctaccg	360
taccagcgt	atthttgcatg	gcctctgtaa	ccgcaaggcc	cccactacgg	tctccagcct	420
ccccgatacc	aaaatcgaag	tagcccactt	tattacaaaa	ctgctcagct	acacaaagca	480
actgtttcgc	cacggccctc	tcctggaggt	cctgttccca	ggaccaggat	ccgagcccaa	540
atcggccgac	aaaactcaca	catgcccacc	gtgcccagca	cctgaactcc	tgggggggacc	600
gtcagtcttc	ctcttccccc	caaaacccaa	ggacaccctc	atgatctccc	ggacccttga	660
ggtcacatgc	gtggtggtgg	acgtgagcca	cgaagaccct	gaggtcaagt	tcaactggta	720
cgtggacggc	gtggaggtgc	ataatgccaa	gacaaagccg	cgggaggagc	agtacaacag	780
cacgtaccgt	gtggtcagcg	tcctcaccgt	cctgcaccag	gactggctga	atggcaagga	840
gtacaagtgc	aaggtctcca	acaaagccct	cccagccccc	atcgagaaaa	ccatctccaa	900
agccaaaggg	cagccccgag	aaccacaggt	gtacàccctg	cccccatccc	gggaggagat	960
gaccaagaac	caggtcagcc	tgacctgcct	ggtcaaaggc	ttctatccca	gcgacatcgc	1020
cgtggagtgg	gagagcaatg	ggcagccgga	gaacaactac	aagaccacgc	ctcccgtgct	1080
ggactccgac	ggctccttct	tcctctatag	caagctcacc	gtggacaaga	gcaggtggca	1140
gcaggggaac	gtcttctcat	gctccgtgat	gcatgagget	ctgcacaacc	actacacgca	1200
gaagagcctc	tcctgtcttc	cgggtaaatg	agtgtagatc	cgttaacggt	taccaactac	1260

<210> 25
<211> 72
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 25
aacctgtttc gccgcggccc cttcctggag gtccgtgttcg gtggaccagg atccgagccc 60
aaatcggccg ac 72

<210> 26
<211> 1260
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工人类 IL-13 免疫原

<400> 26
aacctgcaga tcgcctggag acgccatcga attcgggtacc gccaccatgg cgctctgggt 60
gactgcagtc ctggctcttg cttgccttgg tgggtctcgcc gcccatttta ataattttac 120
cgttagcttt tggttgcgtg ttcctaaagt atctgctagt catttagaag ggccggtgcc 180
acgttctgtg tctctccctg tgacccttaa ggagcttatt gaggagctga ccaacatcac 240
acaagaccag actccctgt gcaacggcag catggtatgg agtgtggacc tggccgctgg 300
cgggttctgt gtagccctgg attccctgac caacatctcc aattgcaatg ccatcttccg 360
taccagcgt atthttgcatg ccctctgtaa ccgcaaggcc cccactacgg tctccagcct 420
ccccgatacc aaaatcgaag tagcccactt tattacaaaa ctgctcacct acacaaagaa 480
cctgtttcgc cgcgccctc tcctggaggt cctgttccag ggaccaggat ccgagcccaa 540
atcggccgac aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca cctgaactcc tgggggggacc 600
gtcagtcttc ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggacccttga 660
ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta 720
cgtggacggc gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag 780
cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga 840
gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagccccc atcgagaaaa ccatctccaa 900
agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggaggagat 960
gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc 1020

cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct 1080
ggactccgac ggctccttct tcctctatag caagctcacc gtggacaaga gcagggtggca 1140
gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca 1200
gaagagcctc tcctgtctc cgggtaaatg agtgtagatc cgttaacggt taccaactac 1260

<210> 27
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 27
gtgtctctcc ctctgaccct tagg 24

<210> 28
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 28
cagttgcttt gtgtagctga gcag 24

<210> 29
<211> 1200
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工人类 IL-13 免疫原

<400> 29
aaccgtcaga tcgcctggag acgccatcga attcgggtacc gccaccatgg cgctctgggt 60
gactgcagtc ctggctcttg cttgccttgg tggctctcgcc gcccacagggc cgggtgccacg 120
ttctgtgtct ctccctctga cccttaggga gctcattgag gagctgggtca acatcacaca 180
agaccagact cccctgtgca acggcagcat ggtatggagt gtggacctgg ccgctggcgg 240
gtactgtgca gccctggaat ccctgaccaa tatttccaat tgcaatgcc a tcgagaagac 300
ccagaggatg ctgggcggac tctgtaaccg caaggccccc actacggtct ccagcctccc 360
cgataccaaa atcgagggtg cccagtttgt aaaggacctg ctcagctaca caaagcaact 420
gtttcgccac ggcccccttc tggaggctct gttccaggga ccaggatccg agcccaaactc 480
ggccgacaaa actcacacat gccacccgtg ccagcacct gaactcctgg ggggaccgtc 540
agtcttcctc ttccccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccggg cccctgaggt 600
cacatgcgtg gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt 660
ggacggcgtg gaggtgcata atgccaaagc aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac 720
gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta 780
caagtgcagg gtctccaaca aagccctccc agcccccatc gagaaaacca tctccaaagc 840
caaagggcag ccccgagaac cacagggtgta caccctgccc ccatcccggg aggagatgac 900
caagaaccag gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt 960
ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga 1020
ctccgacggc tccttcttcc totatagcaa gctcacctgt gacaagagca ggtggcagca 1080
ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa 1140
gagcctctcc ctgtctccgg gtaaatagag ttagatccgt taacggttac caactaccta 1200

伍、中文發明摘要：

本發明係關於經分離之免疫原及其在能以中和IL-13達到治療效果之疾病上之治療用途，諸如COPD、氣喘及異位性失調症，諸如枯草熱、接觸性過敏及異位性皮膚炎。明確言之，本發明係關於以免疫原(其包括天然的或突變性胺基酸IL-13，及插入在IL-13序列中或與IL-13連結或存於載體聚肽中之外來T-輔助子抗原決定子)疫苗接種哺乳動物提升其對抗IL-13之免疫反應，以中和IL-13之生物效應。本發明另外提供包括可編碼本發明免疫原之聚核苷酸之DNA疫苗，除此之外，本發明係關於包括此種免疫原之醫藥組合物，及其在醫藥上之用途，及該等製備之方法。

陸、英文發明摘要：

The present invention relates to isolated immunogens and their use in the treatment of diseases that are treatable with neutralisation of IL-13, such as COPD, asthma and atopic disorders such as hayfever, contact allergies and atopic dermatitis. In particular the invention relates to the neutralisation of the biological effects of IL-13 by raising an immune response against the IL-13 by vaccination of a mammal with immunogens comprising the native or mutated amino acid sequence of IL-13, and foreign T-helper epitopes either inserted in, or attached to the IL-13 sequence or present in carrier polypeptides. Also provided by the present invention are DNA vaccines that comprise a polynucleotide sequence that encodes the immunogens of the present invention. The invention further relates to pharmaceutical compositions comprising such immunogens and their use in medicine and to methods for their production.

拾、申請專利範圍：

1. 一種免疫性組合物，其包括可驅動辨識人類IL-13之免疫反應之IL-13元素及一或多個外來T-細胞抗原決定子。
2. 根據申請專利範圍第1項之免疫性組合物，其中T-細胞抗原決定子對人類自體-蛋白及源自其他物種之IL-13序列而言是外來物。
3. 根據申請專利範圍第1或2項之免疫性組合物，其中T-細胞輔助抗原決定子為加至IL-13序列上之短肽序列，或包括於一載體蛋白之中。
4. 根據申請專利範圍第3項之免疫性組合物，其中載體蛋白選自於嗜血感冒桿菌蛋白D及CPC (clyta-P2-clyta)。
5. 根據申請專利範圍第3項之免疫性組合物，其中載體蛋白及IL-13元素形成融合蛋白。
6. 根據申請專利範圍第3項之免疫性組合物，其中以加成作用或取代作用將短T-細胞抗原決定子加至IL-13中，或以重組性或分子生物方法加至IL-13末端上。
7. 根據申請專利範圍第6項之免疫性組合物，其中短T-細胞抗原決定子為混雜抗原決定子。
8. 根據申請專利範圍第7項之免疫性組合物，其中混雜抗原決定子選自於破傷風類毒素之P2及P30。
9. 根據申請專利範圍第1項之免疫性組合物，其中IL-13元素包括整個人類IL-13序列，或其功能性相等片段。
10. 根據申請專利範圍第9項之免疫性組合物，其中IL-13元素是突變形式。

11. 根據申請專利範圍第10項之免疫性組合物，其中該突變IL-13為嵌合式IL-13形式，其係以發現於另一哺乳動物物種IL-13序列相等位置之胺基酸取代胺基酸後所形成。
12. 根據申請專利範圍第11項之免疫性組合物，其中取代作用發生於阿爾法螺旋區域有關之區域。
13. 根據申請專利範圍第11或12項之免疫性組合物，其中取代作用有關之胺基酸取自一種以上之不同種之非-人類哺乳動物。
14. 根據申請專利範圍第1項之免疫性組合物，其中IL-13元素為人類嵌合式IL-13序列，其具有與天然人類IL-13相似的架構形態，而當其投與人類時，其具有足夠的胺基酸序列差異性可增進其免疫力，其特徵在於該嵌合式IL-13免疫原具有人類IL-13序列，包括：
 - (a) 至少兩個下列阿爾法螺旋區域中具有取代突變作用：PSTALRELIEELVNIT、MYCAALES LI、KTQRMLSGF或AQFVKD LLLHLKKLFRE，
 - (b) 在下列高度物種間保守的區域中，包括至少六個區域未突變：3PVP、12ELIEEL、19NITQ、28LCN、32SMVWS、50SL、60AI、64TQ、87DTKIEVA、99LL、106LF，及
 - (c)視情況在任何所餘之胺基酸包括一突變作用，其中a、b或c處所進行的任何取代作用為結構性保守取代作用。
15. 根據申請專利範圍第14項之免疫性組合物，其中這些取

代作用或突變50%以上包括取自非-人類IL-13序列中相等位置之胺基酸。

16. 根據申請專利範圍第14或15項之免疫性組合物，其中這些取代作用或突變50%以上發生在預期為人類IL-13阿爾法螺旋架構之區域中。
17. 根據申請專利範圍第14或15項之免疫性組合物，其中免疫原包括介於2及20個取代作用。
18. 根據申請專利範圍第1項之免疫性組合物，其中IL-13元素係以非-人類IL-13序列為基礎，其中以非-人類表面暴露區域取代相等的人類序列。
19. 根據申請專利範圍第14項之免疫性組合物，其中人類IL-13胺基酸序列包括保守性取代作用，或其特徵係存於非-人類物種IL-13序列中相等位置處之胺基酸的取代作用，存在於下列13處至少6處：8T、11R、18V、49E、62K、66M、69G、84H、97K、101L、105K、109E、111R。
20. 根據申請專利範圍第19項之免疫性組合物，其包括至少6處下列取代作用：

位 置	取 代 作 用
8	T->S
11	R->K
18	V->A
49	E->D
62	K->R
66	M->I
69	G->A
84	H->R
97	K->T
101	L->V
105	K->R
109	E->Q
111	R->T

21. 根據申請專利範圍第1項之免疫性組合物，其中IL-13元素選自於下列之群：免疫原1、免疫原11、免疫原12及免疫原13。
22. 根據申請專利範圍第1項之免疫性組合物，係選自下列之群：免疫原2、免疫原3、免疫原7、免疫原8、免疫原9及免疫原10。
23. 根據申請專利範圍第1、2、9至12、14、15及18至22項中任一項之免疫性組合物，其在人類IL-13元素中另外包括一可消除免疫原生物活性之突變，其係選自下列之

群：E 12取代為I、S或Y；E 12取代為K；R 65取代為D
；S 68取代為D；R 108取代為D。

24. 一種設計根據申請專利範圍第1項免疫性組合物之方法，其包括：

(a) 取出人類IL-13的序列，並鑑定出預期可形成阿爾法螺旋結構的區域，及

(b) 突變位於這些阿爾法螺旋區域的人類IL-13序列，用保守性取代作用，或以發現於異種物種IL-13序列中相同位置處之胺基酸取代人類序列上的胺基酸，及

(c)接合或插入一T-細胞抗原決定子來源，該來源對任何人類自體抗原決定子而言是外來物，亦為任何哺乳動物IL-13序列的外來物。

25. 一種製備人類嵌合式IL-13免疫原之方法，該免疫原具有與天然的人類IL-13相似的架構形態，然當投與人類時，其具有足夠的胺基酸序列差異性可增進其免疫力，該方法包括下列步驟：

(a) 至少兩個下列阿爾法螺旋區域中具有取代突變作用：PSTALRELIEELVNIT、MYCAALES LI、KTQRMLSGF或AQFVKDLLLHLKKLFRE，

(b) 在下列高度物種間保守的區域中，包括至少六個區域未突變：3PVP、12ELIEEL、19NITQ、28LCN、32SMVWS、50SL、60AI、64TQ、87DTKIEVA、99LL、106LF，

(c) 視情況突變任何所餘之胺基酸，及

(d) 接合一T-細胞抗原決定子來源，該來源對任何人類自體抗原決定子而言是外來物，對任何哺乳動物IL-13序列而言亦為外來物，

方法特徵在於步驟a、b或c所進行的任何取代作用皆為結構性保守性之取代作用。

26. 根據申請專利範圍第25項製備人類嵌合式免疫原之方法，其中所有四處之阿爾法螺旋區域包括至少一個取代突變作用。

27. 根據申請專利範圍第25項製備人類嵌合式免疫原之方法，其中所有11處之區域未經突變。

28. 一種製備人類嵌合式IL-13免疫原之方法，該免疫原具有與天然的人類IL-13相似的架構形態，然當投與人類時，其具有足夠的胺基酸序列差異性可增進其免疫力，該方法包括下列步驟：

(a) 排列不同物種之IL-13胺基酸序列，

(b) 鑑定出高變異性及高保守性的區域，

(c) 取出人類IL-13序列，在高變異區進行突變作用，用保守性取代作用，或以發現於異種物種IL-13序列中相等位置處之胺基酸取代人類序列上的胺基酸，及

(d) 結合T-細胞抗原決定子來源，該來源對任何人類自體抗原決定子而言是外來物，對任何哺乳動物IL-13序列而言亦為外來物。

29. 根據申請專利範圍第24至28項中任一項製備人類嵌合式IL-13免疫原之方法，其中所有這些取代作用或突變

作用50%以上包括取自非-人類物種之IL-13序列中相等位置之胺基酸。

30. 根據申請專利範圍第24至28項中任一項製備人類嵌合式IL-13免疫原之方法，其中這些取代作用或突變50%以上發生在預期為人類IL-13阿爾法螺旋架構之區域中。
31. 製備根據申請專利範圍第24至28項中任一項製備人類嵌合式IL-13免疫原之方法，其中取代作用或突變包括取自至少兩個非-人類IL-13序列中相等位置之胺基酸。
32. 製備根據申請專利範圍第24至28項中任一項製備人類嵌合式IL-13免疫原之方法，其中免疫原包括介於6及20個之間的取代作用，而最佳係介於6及10之間的取代作用。
33. 一種源自根據申請專利範圍第24至28項中任一項方法之免疫原，其中該免疫以適當方式調配成疫苗後，於人類疫苗接種者體中具有免疫力。
34. 一種疫苗，其包括根據申請專利範圍第1、2、9至12、14、15及18至22項中任一項之免疫原。
35. 一種聚核苷酸疫苗，其包括可編碼根據申請專利範圍第1、2、9至12、14、15及18至22項中任一項免疫原之聚核苷酸。
36. 根據申請專利範圍第1、2、9至12、14、15及18至22項中任一項之免疫性組合物，其係藉由提升個體血清中中和抗-IL-13免疫反應來治療罹患或易感COPD、氣喘或異位性皮膚炎，或消除COPD、氣喘或異位性皮膚炎。

37. 根據申請專利範圍第36項之免疫性組合物，其具有一或多種下列臨床效果：

- 減少氣道過度-反應性(AHR)；
- 減少黏液過度的分泌及杯狀細胞組織變形；
- 減少氣道表皮細胞下的纖維化；
- 減少嗜伊紅白血球數目；及
- 減少吸入性腎上腺皮脂類固醇(ICS)的使用需求，其亦為以IL13自體疫苗成功治療的一個特徵。

38. 根據申請專利範圍第36項之免疫性組合物，其具有一或多種下列臨床效果：

- 減少皮膚刺激；
- 減少癢及搔癢；
- 減少慣用治療法之需求；及
- 若投用，可減少局部腎上腺皮脂類固醇之使用需求，理想的IL-13自體疫苗可能使ICS類固醇的治療是多餘的，然而減少ICS的'使用頻率'或'所需劑量'亦為有效的結果。

拾壹、圖式：

圖 1 天然的人類IL-13 (SEQ ID NO. 1)

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

圖 2 天然的老鼠IL-13 (SEQ ID NO. 2)

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

數種哺乳動物IL-13序列之排列

	*	20	*	40	*	60	*
人類	:	GPVPP-----STALRELI	EELVNITQ	NOKAPL	CNGSMWS	INLTAGM	-YCAALES
豬	:	GPVPPH----	STALKE	LI EELVNITQ	NOKTPL	CNGSMWS	VNLTTSMQYCALES
牛	:	SPVPS-----	ATALKE	LI EELVNITQ	NOKVPL	CNGSMWS	INLTSSM-YCAALDSL
狗	:	SPVTP-----	SPTKE	LI EELVNITQ	NQ-ASL	CNGSMWS	VNLTAGM-YCAALES
老鼠	:	GPVPRSVSLPL	TLKE	LI EELSNITQ	DQ-TPL	CNGSMWS	VDLAAGG-FCVALDSL
大老鼠	:	GPVRRSTSP	PPVALRE	LI EELSNITQ	DQKTSL	CNSSMWS	VDLTAGG-FCAALES
							LTNISSCNAI
							HRTQRI

	80	*	100	*										
人類	:	LSGFCPHKVSAGQFSS	LHV	RD	TKIEVAQFVKD	LLHLKKL	FR	EG	R	N	SEQ	ID	NO.1	
豬	:	LSALCSHKPSEQV	PGKH	IR	DT	TKIEVAQFVKD	LLKHL	RM	I	FRHG---	SEQ	ID	NO.3	
牛	:	LNALCPHKPSAKQVS	EYVR	DT	TKIEVAQFLKD	LLRHS	R	I	V	FR	N	SEQ	ID	NO.4
狗	:	LKALCSQKPAAGQISS	ERSR	DT	TKIEVIQ	LVKNLL	TYV	R	G	VYR	HGNFR	SEQ	ID	NO.5
老鼠	:	LHGLCNRKAP-TTVSS	--LP	DT	TKIEVA	HFTK	LLSY	TQ	LF	RHGP	F-	SEQ	ID	NO.2
大老鼠	:	LNGLCNQKAS-DVASS	--PP	DT	TKIEVAQFISK	LLNYS	KQL	FR	YGH--	SEQ	ID	NO.6		

圖 3

非人類靈長類之IL-13序列

1	S	P	V	P	P	S	T	A	L	K	E	L	I	E	E	L	V	N	I	T
1	S	P	V	P	R	S	T	A	L	K	E	L	I	E	E	L	V	N	I	T
1	G	P	V	P	P	Y	T	A	L	K	E	L	I	E	E	L	V	N	I	T
21	Q	N	Q	K	A	P	L	C	N	G	S	M	V	W	S	I	N	L	T	A
21	Q	N	Q	K	A	P	L	C	N	G	S	M	V	W	S	I	N	L	T	A
21	Q	N	Q	K	A	P	L	C	N	G	S	M	V	W	S	I	N	M	T	A
41	G	V	Y	C	A	A	L	E	S	L	I	N	V	S	G	C	S	A	I	E
41	G	V	Y	C	A	A	L	E	S	L	I	N	V	S	G	C	S	A	I	E
41	G	V	Y	C	A	A	L	E	S	L	I	N	V	S	G	C	S	A	I	E
61	K	T	Q	R	M	L	N	G	F	C	P	H	K	V	S	A	G	Q	F	S
61	K	T	Q	R	M	L	N	G	F	C	P	H	K	V	S	A	G	Q	F	S
61	K	T	Q	R	M	L	S	G	F	C	P	H	K	V	S	A	G	Q	F	S
81	S	L	R	V	R	D	T	K	I	E	V	A	Q	F	V	K	D	L	L	V
81	S	L	R	V	R	D	T	K	I	E	V	A	Q	F	V	K	D	L	L	V
81	S	L	L	V	R	D	T	K	I	E	V	A	Q	F	V	K	D	L	L	R
101	H	L	K	K	L	F	R	E	G	Q	F	N	. 狒狒IL-13 SEQ ID NO. 7							
101	H	L	K	K	L	F	R	E	G	R	F	N	. 獼猴IL-13 SEQ ID NO. 8							
101	H	L	R	K	L	F	H	Q	G	T	F	N	. 松鼠猴IL-13 SEQ ID NO. 9							

圖 4

免疫原1 (SEQ ID NO. 10)。

[illegible]

圖 5

圖 6 免疫原2 (SEQ ID NO. 11)。

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

圖 7 免疫原3 (SEQ ID NO. 12)。

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

圖 8 免疫原4 (SEQ ID NO. 13)。

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

圖 9 免疫原5 (SEQ ID NO. 14)。

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

圖 10 免疫原6 (SEQ ID NO. 15)。

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

免疫原7 (SEQ ID NO. 16)。

TACGTACATTCCGACGGCTCTTATCCAAAAGACAAGTTTGAGAAAATCAATGGCACTTGG
-----+-----
Y V H S D G S Y P K D K F E K I N G T W

TACTACTTTGACAGTTCAGGCTATATGCTTGCAGACCGCTGGAGGAAGCACACAGACGGC
-----+-----
Y Y F D S S G Y M L A D R W R K H T D G

AACTGGTACTGGTTCGACAACTCAGGCGAAATGGCTACAGGCTGGAAGAAAATCGCTGAT
-----+-----
N W Y W F D N S G E M A T G W K K I A D

AAGTGGTACTATTTCAACGAAGAAGGTGCCATGAAGACAGGCTGGGTCAAGTACAAGGAC
-----+-----
K W Y Y F N E E G A M K T G W V K Y K D

ACTTGGTACTACTTAGACGCTAAAGAAGGCGCCATGCAATACATCAAGGCTAACTCTAAG
-----+-----
T W Y Y L D A K E G A M Q Y I K A N S K

TTCATTGGTATCACTGAAGGCGTCATGGTATCAAATGCCTTTATCCAGTCAGCGGACGGA
-----+-----
F I G I T E G V M V S N A F I Q S A D G

ACAGGCTGGTACTACCTCAAACCAGACGGAACACTGGCAGACAGGCCAGAAGGCCCTGTG
-----+-----
T G W Y Y L K P D G T L A D R P E G P V

CCTCCCTCTAGCGCCCTCAAGGAGCTCATTGAGGAGCTGGCCAACATCAGCCAGAACCCAG
-----+-----
P P S S A L K E L I E E L A N I T Q N Q

AAGGCTCCGCTCTGCAATGGCAGCATGGTATGGAGCATCAACCTGACAGCTGGCATGTAC
-----+-----
K A P L C N G S M V W S I N L T A G M Y

TGTGCAGCCCTGGACTCCCTGATCAACGTGTCAGGCTGCAGTGCCATCGAGCGGACCCAG
-----+-----
C A A L D S L I N V S G C S A I E R T Q

AGGATCTTGAGCGCCTTCTGCCCCACAAAGGTCTCAGCTGGGCAGTTTCCAGCTTGCGT
-----+-----
R I L S A F C P H K V S A G Q F S S L R

GTCCGAGACACCAAAATCGAGGTGGCCCAGTTTGTAAACGGACCTGCTCGTACATTTAAAG
-----+-----
V R D T K I E V A Q F V T D L L V H L K

AGACTTTTTCGCCAGGGAACGTTCAAC
-----+-----
R L F R Q G T F N

圖 11

免疫原8 (SEQ ID NO. 17)。

TCCTCTCATTCTTCTAACATGGCGAACACCCAGATGAAGTCCGATAAAATCATCATCGCG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
S S H S S N M A N T Q M K S D K I I I A

CACAGGGGAGCTAGCGGGTATCTGCCTGAGCACACCCTGGAGTCCAAGGCTCTGGCGTTC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
H R G A S G Y L P E H T L E S K A L A F

GCCCAGCAGGCTGACTACCTGGAGCAGGACCTGGCGATGACAAAGGATGGCCGCTCGTG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
A Q Q A D Y L E Q D L A M T K D G R L V

GTGATCCATGACCATTTTCTCGACGGACTGACCGACGTGCGCAAGAAGTTCCCCACCGC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
V I H D H F L D G L T D V A K K F P H R

CATAGGAAGGACGGGAGGTATTACGTGATTGACTTCACCCTCAAGGAGATCCAGAGCCTG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
H R K D G R Y Y V I D F T L K E I Q S L

GAGATGACCGAGAACTTCGAGACCGGCCCTGTGCCTCCCTCTAGCGCCCTCAAGGAGCTC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
E M T E N F E T G P V P P S S A L K E L

ATTGAGGAGCTGGCCAACATCACCCAGAACCAGAAGGCTCCGCTCTGCAATGGCAGCATG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
I E E L A N I T Q N Q K A P L C N G S M

GTATGGAGCATCAACCTGACAGCTGGCATGTACTGTGCAGCCCTGGACTCCCTGATCAAC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
V W S I N L T A G M Y C A A L D S L I N

GTGTCAGGCTGCAGTGCCATCGAGCGGACCCAGAGGATCTTGAGCGCCTTCTGCCCCGAC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
V S G C S A I E R T Q R I L S A F C P H

AAGGTCTCAGCTGGGCAGTTTTCCAGCTTGCGTGTCCGAGACACCAAAATCGAGGTGGCC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
K V S A G Q F S S L R V R D T K I E V A

CAGTTTGTAACGGACCTGCTCGTACATTTAAAGAGACTTTTTCGCCAGGGAACGTTCAAC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
Q F V T D L L V H L K R L F R Q G T F N

圖 12

免疫原9 (SEQ ID NO. 18)。

TTTAATAATTTTACCGTTAGCTTTTGGTTGCGTGTTCCCTAAAGTATCTGCTAGTCATTTA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
F N N F T V S F W L R V P K V S A S H L

GAAGGCCCTGTGCCTCCCTCTAGCGCCCTCAAGGAGCTCATTGAGGAGCTGGCCAACATC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
E G P V P P S S A L K E L I E E L A N I

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

GCTGGCATGTACTGTGCAGCCCTGGACTCCCTGATCAACGTGTCAGGCTGCAGTGCCATC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
A G M Y C A A L D S L I N V S G C S A I

GAGCGGACCCAGAGGATCTTGAGCGCCTTCTGCCCCGACAAGGTCTCAGCTGGGCAGTTT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
E R T Q R I L S A F C P H K V S A G Q F

TCCAGCTTGCGTGTCGAGACACCAAAATCGAGGTGGCCCAGTTTGTAAACGGACCTGCTC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
S S L R V R D T K I E V A Q F V T D L L

GTACATTTAAAGAGACTTTTTTCGCCAGGGAACGTTCAAC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
V H L K R L F R Q G T F N

圖 13

免疫原10 (SEQ ID NO. 19)。

TTTAATAATTTTACCGTTAGCTTTTGGTTGCGTGTTCCCTAAAGTATCTGCTAGTCATTTA
-----+-----+-----+-----+-----+
F N N F T V S F W L R V P K V S A S H L

GAAGGCCCTGTGCCTCCCTCTAGCGCCCTCAAGATTCTCATTGAGGAGCTGGCCAACATC
-----+-----+-----+-----+-----+
E G P V P P S S A L K I L I E E L A N I

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

GCTGGCATGTACTGTGCAGCCCTGGACTCCCTGATCAACGTGTGAGGCTGCAGTGCCATC
-----+-----+-----+-----+-----+
A G M Y C A A L D S L I N V S G C S A I

GAGCGGACCCAGAGGATCTTGAGCGCCTTCTGCCCCGACAAGGTCTCAGCTGGGCAGTTT
-----+-----+-----+-----+-----+
E R T Q R I L S A F C P H K V S A G Q F

TCCAGCTTGCGTGTCCGAGACACCAAAATCGAGGTGGCCCAGTTTGTAAACGGACCTGCTC
-----+-----+-----+-----+-----+
S S L R V R D T K I E V A Q F V T D L L

GTACATTTAAAGAGACTTTTTCGCCAGGGAACGTTCAAC
-----+-----+-----+-----+-----+
V H L K R L F R Q G T F N

圖 14

圖 15 免疫原11 (SEQ ID NO. 20)。

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

圖 16 免疫原12 (SEQ ID NO. 21)。

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

圖 17 免疫原13 (SEQ ID NO. 22)。

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

CAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCAC
1681 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1740
b K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T -
CGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGC
1741 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1800
b V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A -
CCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACA
1801 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1860
b L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q -
GGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTG
1861 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1920
b V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C -
CCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCC
1921 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1980
b L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P -
GGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTA
1981 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2040
b E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y -
TAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGT
2041 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2100
b S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V -
GATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAA
2101 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2160
b M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K -
BamHI
ATGAGTGTAGATCCGTTAACGGTTACCAACTACCTAGGGATCCGTTAACGGTTACCAACT
2161 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2220
b *

[illegible]

CGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAG
1681 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1740
b V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S -
CACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGA
1741 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1800
b T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E -
GTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAA
1801 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1860
b Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K -
AGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGAT
1861 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1920
b A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M -
GACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGC
1921 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1980
b T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A -
CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCT
1981 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2040
b V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L -
GGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCA
2041 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2100
b D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q -
GCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCA
2101 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2160
b Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q -
GAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGTGTAGATCCGTTAACGGTTACCAACTAC
2161 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2220
b K S L S L S P G K *

圖 21 pCDNIL13oldFC (SEQ ID NO. 29)

KpnI
|

961 AACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCGAATTCGGTACCGCCACCATGGCGCTCTGGGT
-----+----- 1020

b M A L W V -
GACTGCAGTCCTGGCTCTTGCTTGCCTTGGTGGTCTCGCCGCCCCAGGGCCGGTGCCACG
1021 -----+----- 1080

b T A V L A L A C L G G L A A P G P V P R -
TTCTGTGTCTCTCCCTCTGACCCTTAGGGAGCTCATTGAGGAGCTGGTCAACATCACACA
1081 -----+----- 1140

b S V S L P L T L R E L I E E L V N I T Q -
AGACCAGACTCCCTGTGCAACGGCAGCATGGTATGGAGTGTGGACCTGGCCGCTGGCGG
1141 -----+----- 1200

b D Q T P L C N G S M V W S V D L A A G G -
GTACTGTGCAGCCCTGGAATCCCTGACCAATATTTCCAATTGCAATGCCATCGAGAAGAC
1201 -----+----- 1260

b Y C A A L E S L T N I S N C N A I E K T -
CCAGAGGATGCTGGGCGGACTCTGTAACCGCAAGGCCCCACTACGGTCTCCAGCCTCCC
1261 -----+----- 1320

b Q R M L G G L C N R K A P T T V S S L P -
CGATACCAAAATCGAGGTGGCCAGTTTGTAAAGGACCTGCTCAGCTACACAAAGCAACT
1321 -----+----- 1380

b D T K I E V A Q F V K D L L S Y T K Q L -

BamHI
|

1381 GTTTCGCCACGGCCCCCTTCTGGAGGTCCTGTTCCagGGACCAGGATCCGAGCCCCAAATC
-----+----- 1440

b F R H G P F L E V L F Q G P G S E P K S -
GGCCGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTC
1441 -----+----- 1500

b A D K T H T C P P C P A P E L L G G P S -
AGTCTTCTCTTCCCCCAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGT
1501 -----+----- 1560

b V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V -
CACATGCGTGGTGGAGCTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGT
1561 -----+----- 1620

b T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V -
GGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAC
1621 -----+----- 1680

b D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T -

GTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTA
1681 -----+-----+-----+-----+ 1740
b Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y -
CAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGC
1741 -----+-----+-----+-----+ 1800
b K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A -
CAAAGGGCAGCCCCGAGAACACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGAC
1801 -----+-----+-----+-----+ 1860
b K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T -
CAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGT
1861 -----+-----+-----+-----+ 1920
b K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V -
GGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGA
1921 -----+-----+-----+-----+ 1980
b E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D -
CTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCA
1981 -----+-----+-----+-----+ 2040
b S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q -
GGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAA
2041 -----+-----+-----+-----+ 2100
b G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K -
GAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGTGTAGATCCGTTAACGGTTACCAACTACCTA
2101 -----+-----+-----+-----+ 2160
b S L S L S P G K *

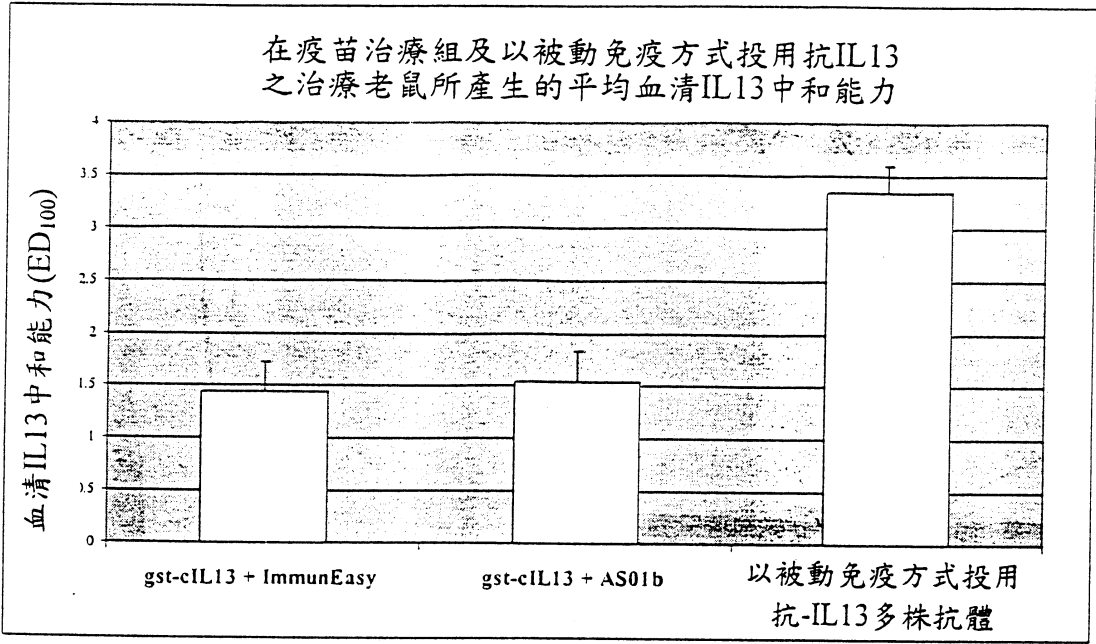


圖 22

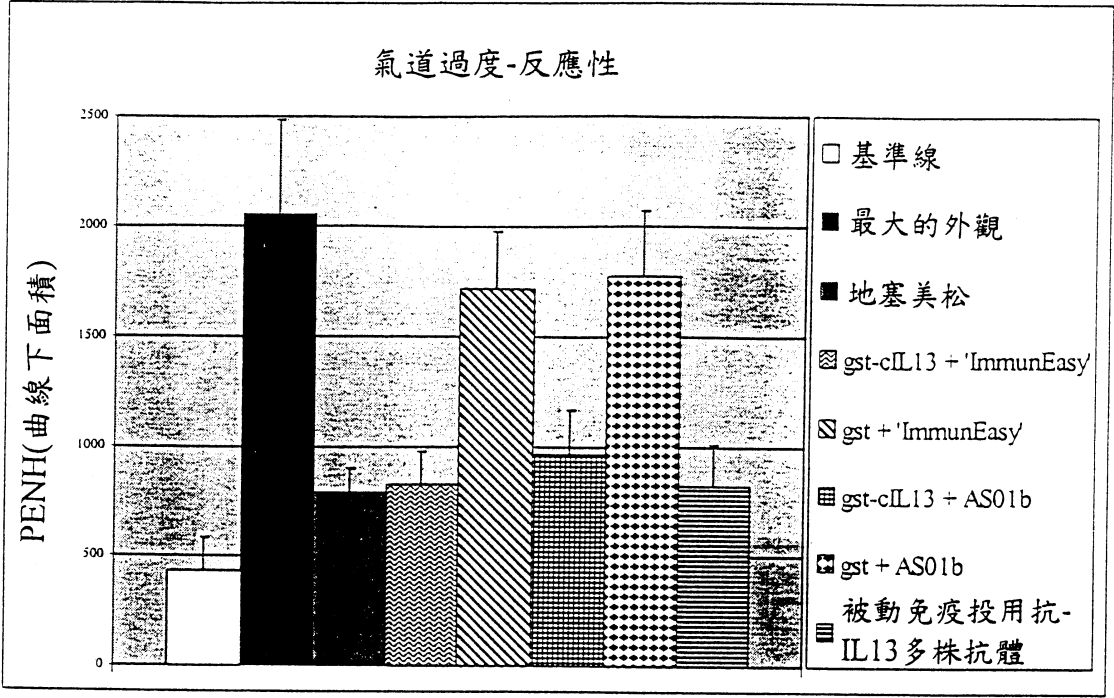


圖 23

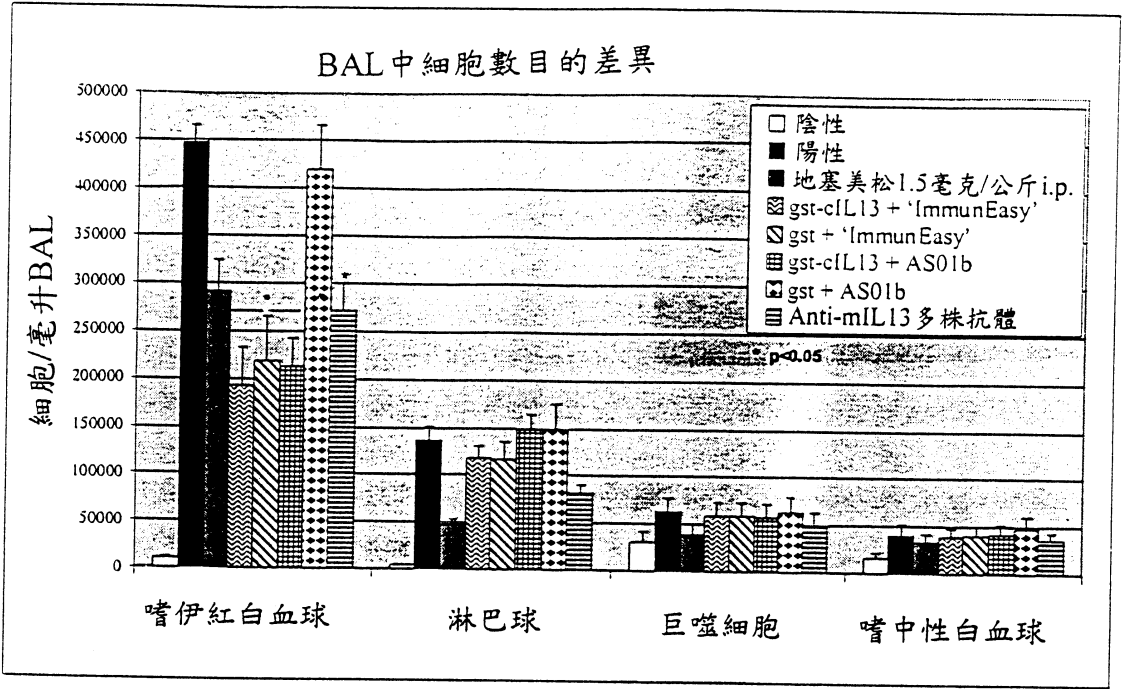


圖 24

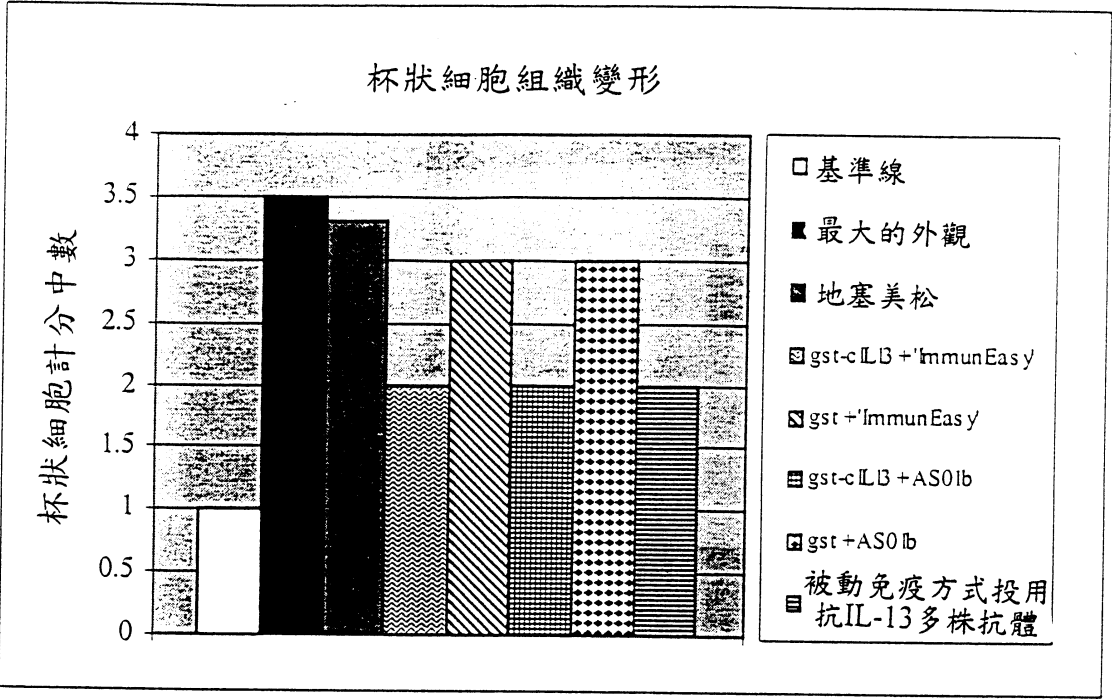


圖 25

圖 26A gst-cIL13 + 'ImmunEasy'

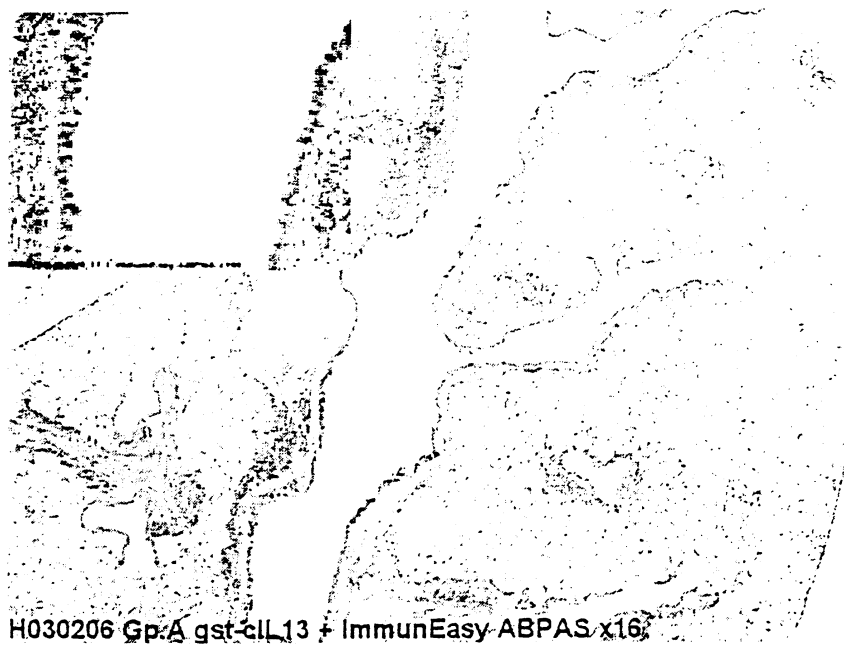


圖 26B gst + 'ImmunEasy'

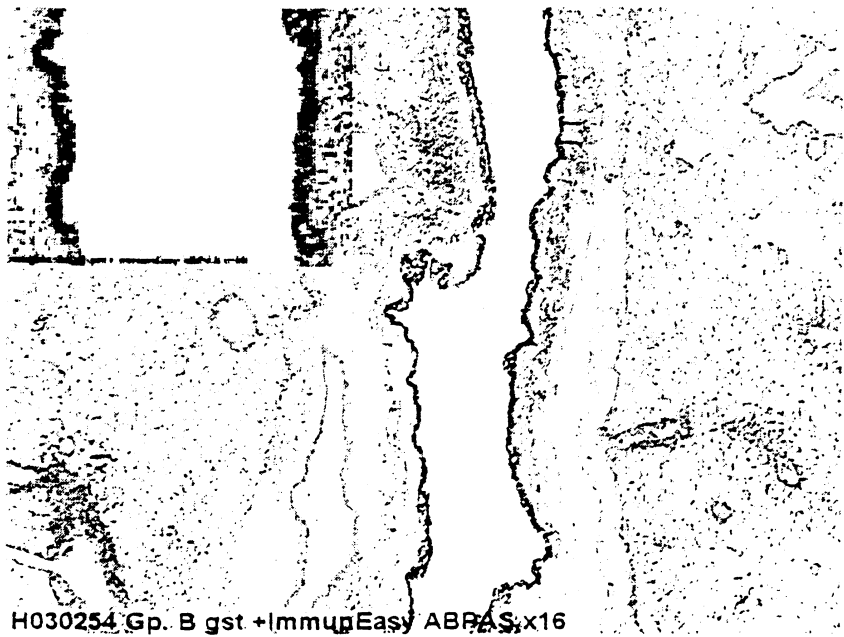


圖 27A *gst-cIL3* + 脂小體 + 3D-MPL + QS21

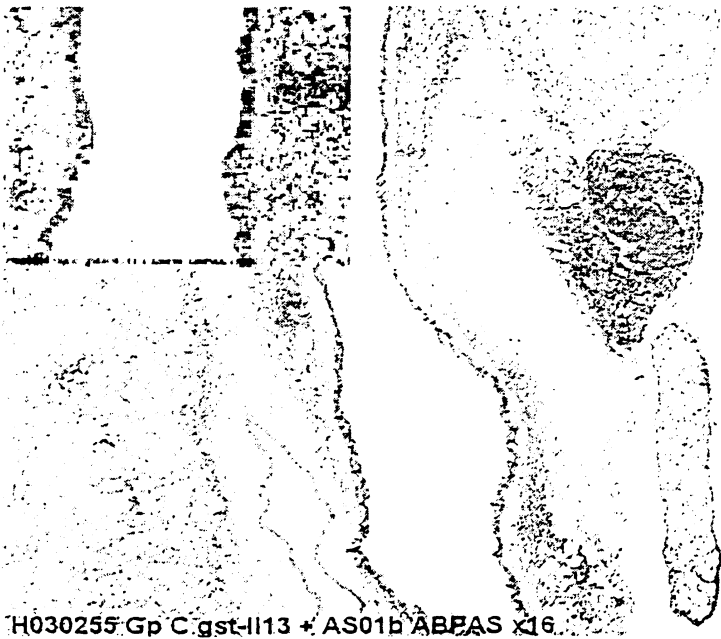
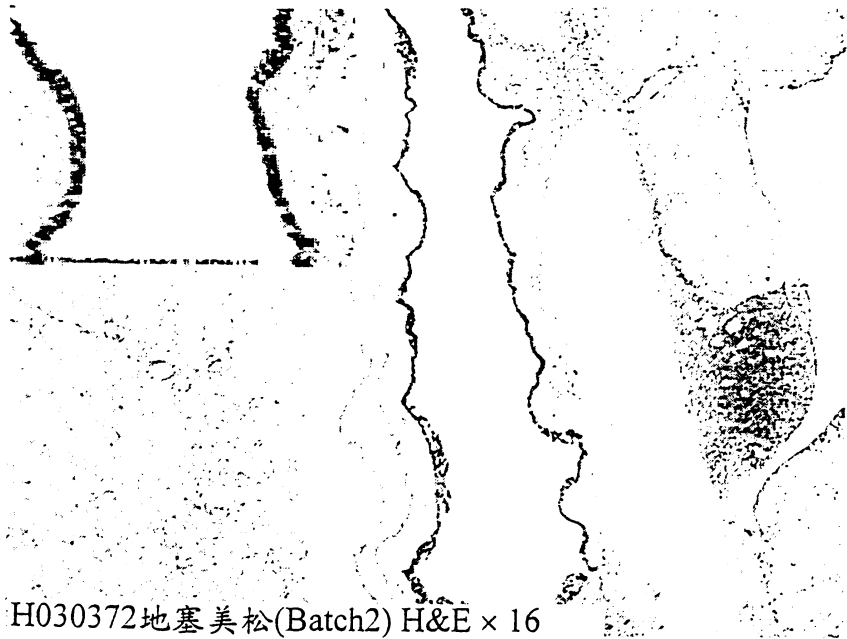


圖 27B *gst* + 脂小體 + 3D-MPL + QS21



地塞美松



H030372地塞美松(Batch2) H&E × 16

圖 28

最大氣喘呈現之外觀

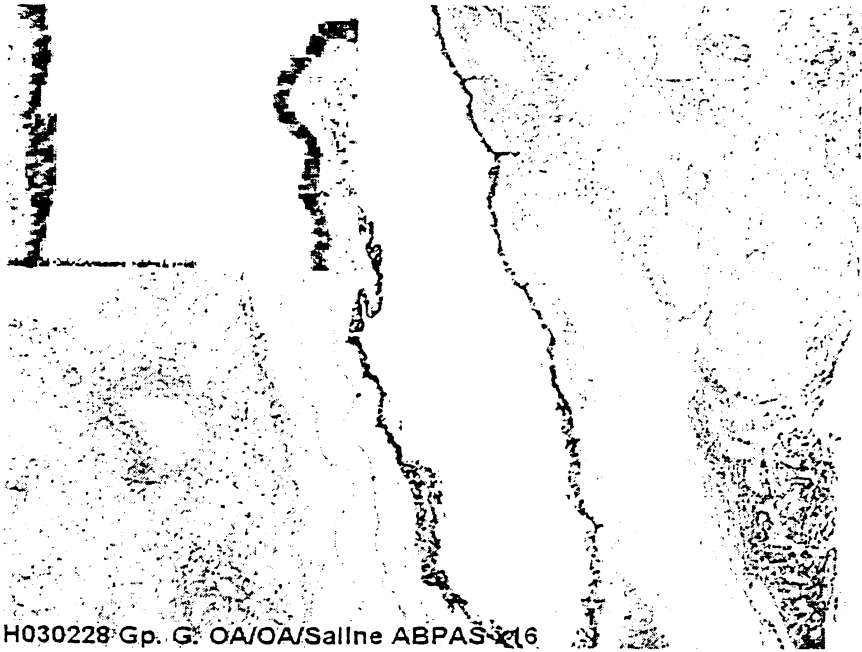


圖 29

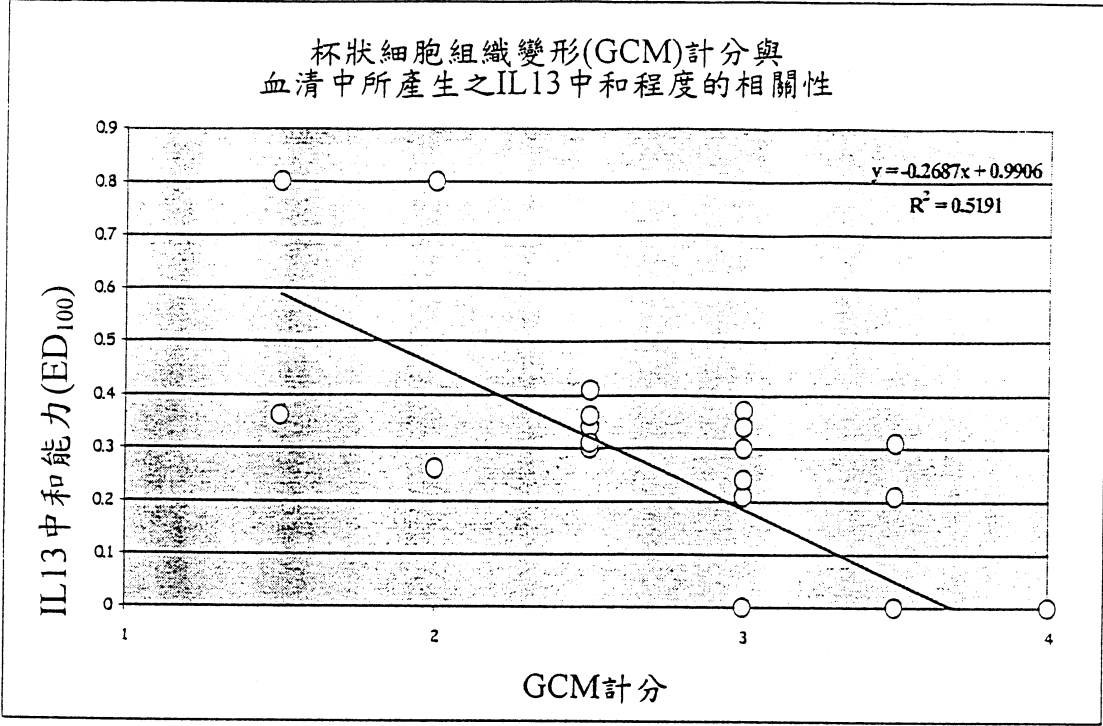


圖 30

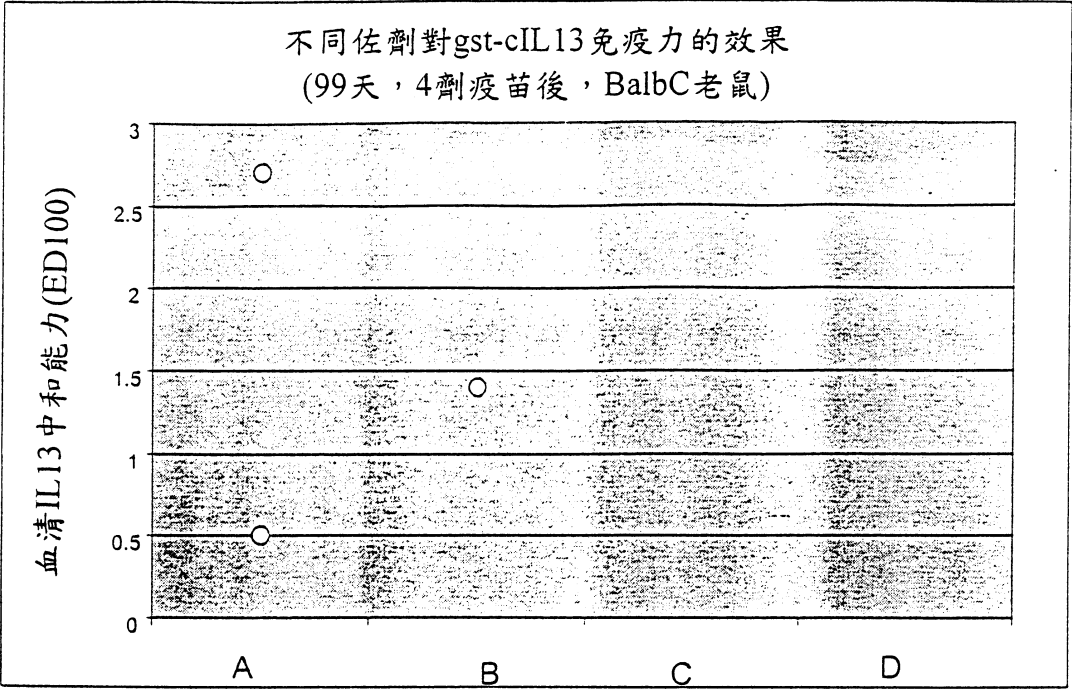


圖 31

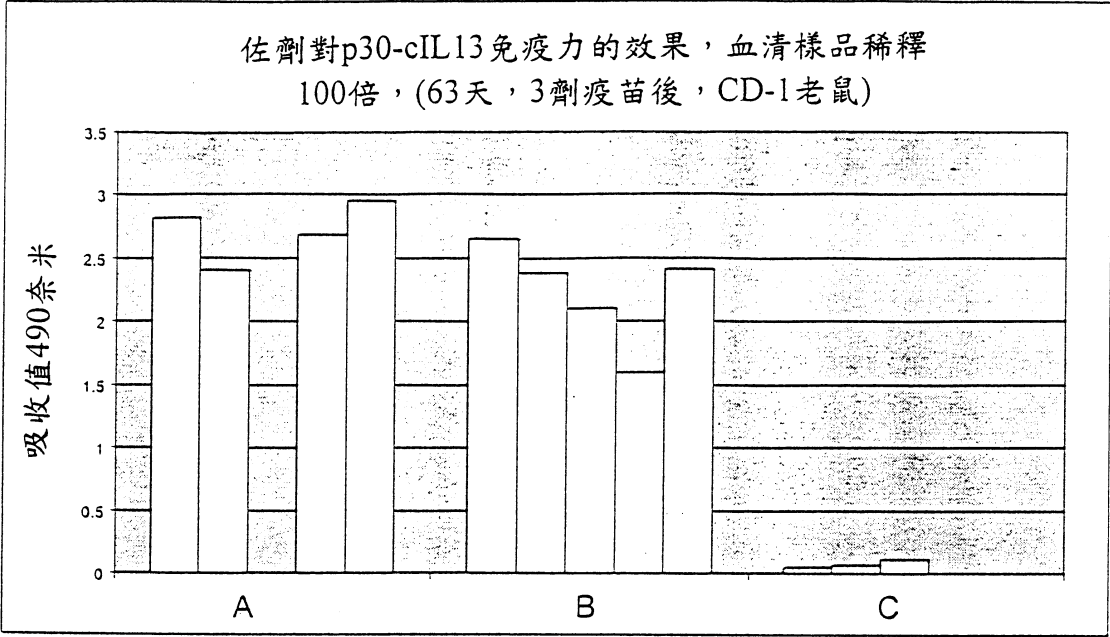


圖 32

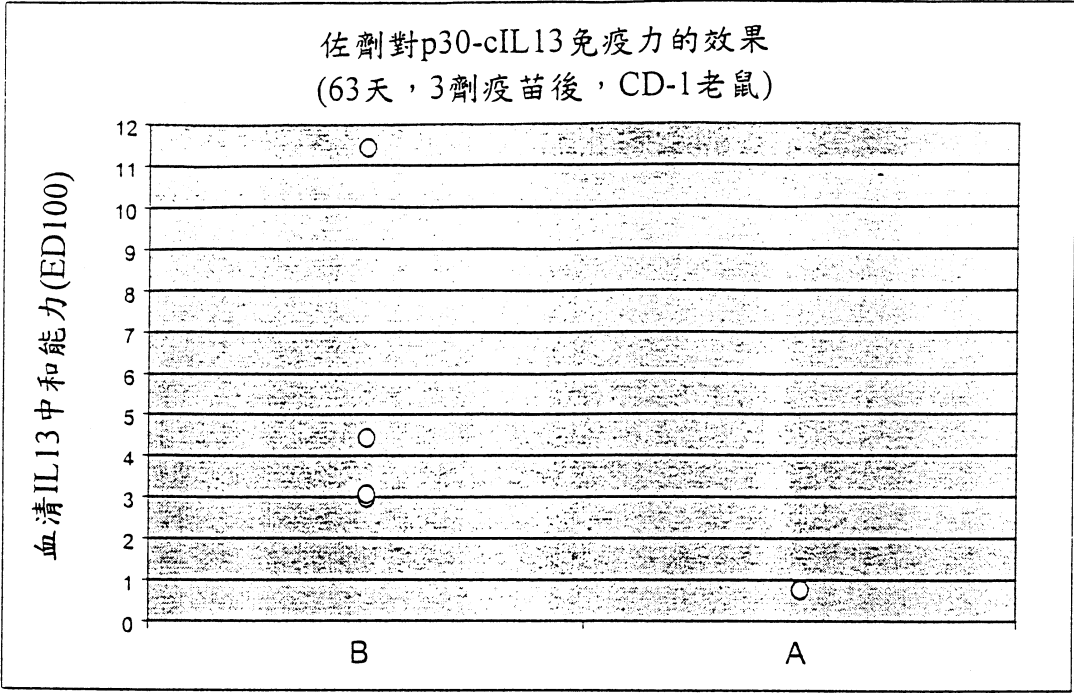


圖 33

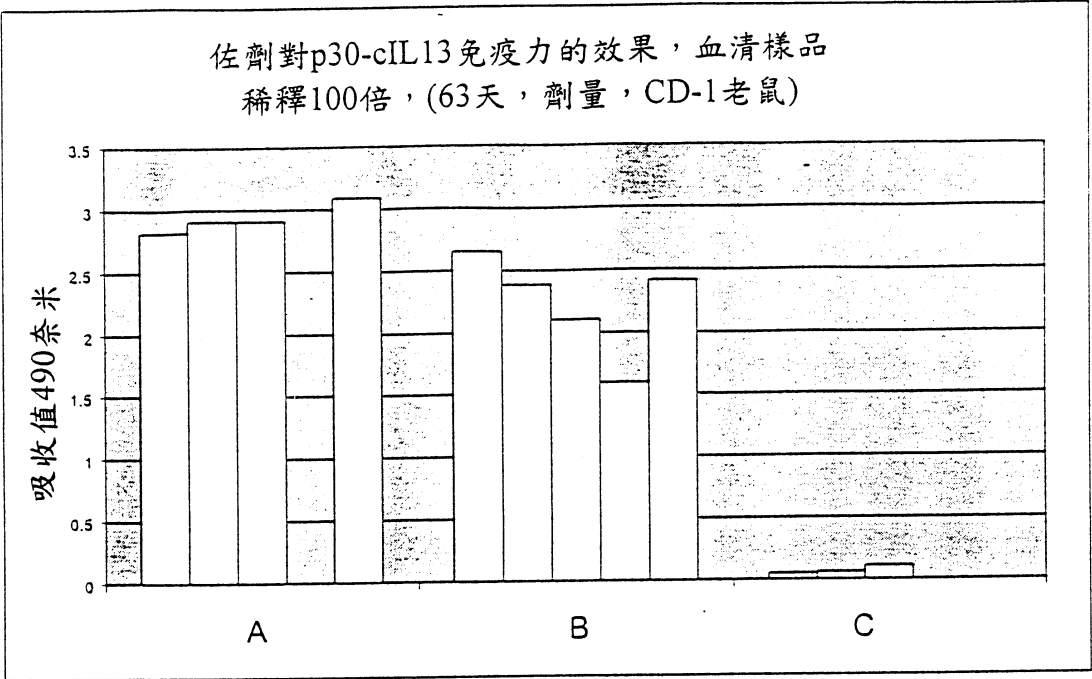


圖 34

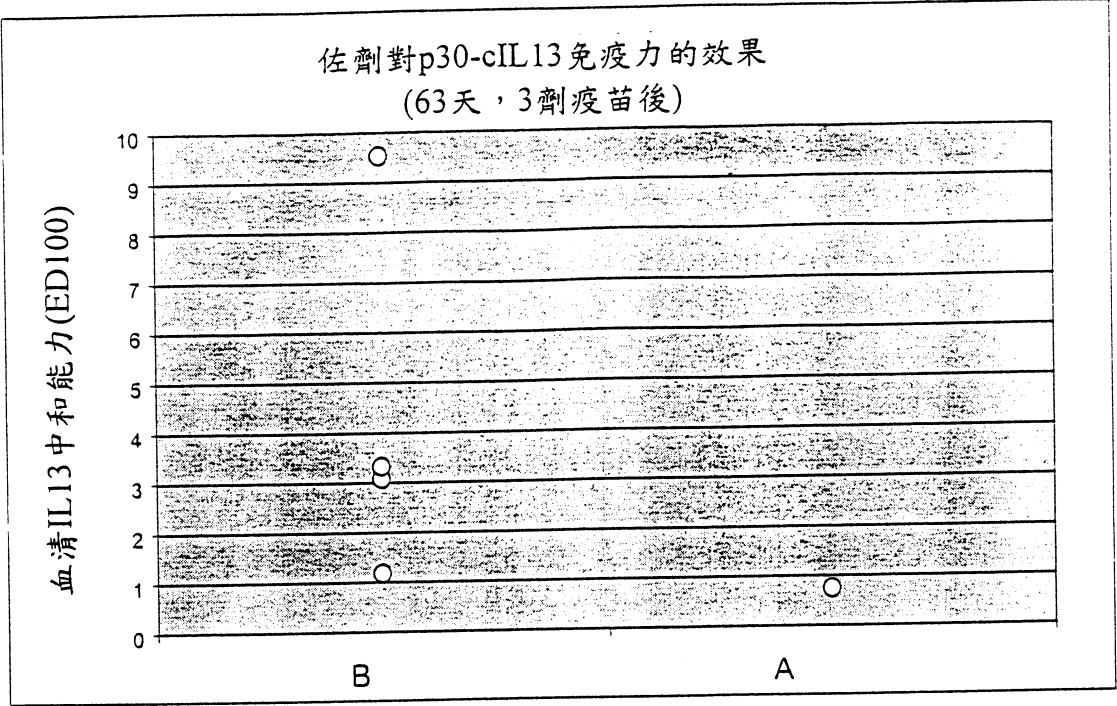


圖 35

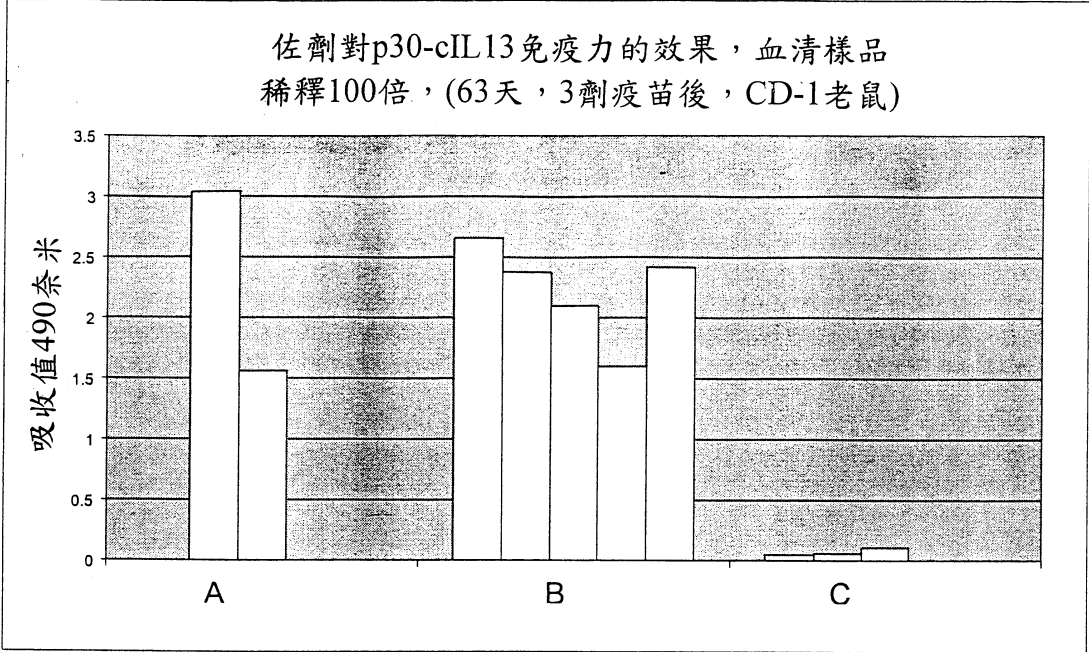


圖 36

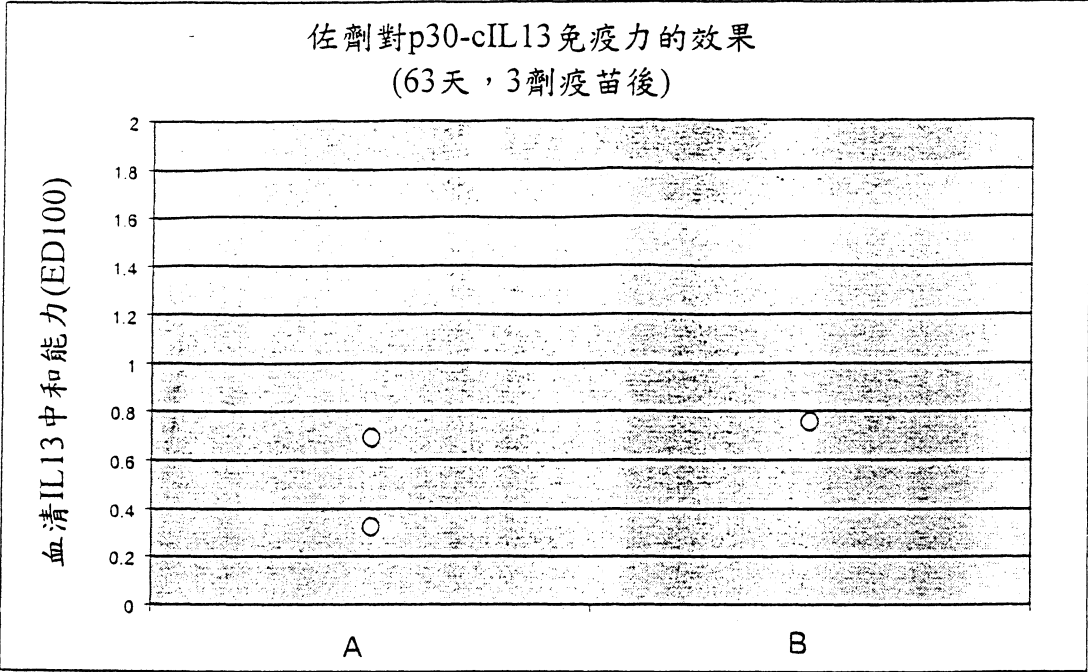


圖 37

柒、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (22) 圖。

(二)本代表圖之元件代表符號簡單說明：

(無元件代表符號)

捌、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：