



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl.

C07K 16/24 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2007-0034609

(43) 공개일자 2007년03월28일

(21) 출원번호 10-2007-7002166

(22) 출원일자 2007년01월29일

심사청구일자 없음

번역문 제출일자 2007년01월29일

(86) 국제출원번호 PCT/GB2005/002581

(87) 국제공개번호 WO 2006/003407

국제출원일자 2005년06월30일

국제공개일자 2006년01월12일

(30) 우선권주장

0414799.7

2004년07월01일

영국(GB)

0423675.8

2004년10월25일

영국(GB)

(71) 출원인

글락소 그룹 리미티드

영국 유비6 0엔엔 미들섹스 그린포우드 버클리 애비뉴 글락소 웰컴 하우스

(72) 발명자

애쉬먼, 클레어

영국 하트퍼드셔 에스지1 2엔와이 스티브나지 거넬스 우드 로드글락소

스미스클라인

캐시디, 마틴, 존

영국 하트퍼드셔 에스지1 2엔와이 스티브나지 거넬스 우드 로드글락소

스미스클라인

엘리스, 조나단, 헨리

영국 하트퍼드셔 에스지1 2엔와이 스티브나지 거넬스 우드로드글락소스

미스클라인

와탐, 트레버, 앤소니, 케네스

영국 하트퍼드셔 에스지1 2엔와이 스티브나지 거넬스 우드 로드글락소

스미스클라인

(74) 대리인

장수길

김영

전체 청구항 수 : 총 73 항

(54) 인터루킨-1 3 에 대한 키메라 및 인간화된 모노클로날항체

(57) 요약

본 발명은 인간 인터루킨 13 (hIL-13)에 특이적으로 결합하는 면역글로불린, 특히 항체에 관한 것이다. 본 발명의 항체는 hIL-13과 인간 IL-13 수용체 사이의 상호작용의 조절에 반응성인 다양한 질병 또는 질환의 치료에 사용될 수 있다. 상기 질병은 중증 천식, 아토피성 피부염, COPD 및 다양한 섬유증 질환을 포함한다. 상기 항체를 포함하는 제약 조성물 및 제조 방법을 또한 개시한다.

대표도

도 1

특허청구의 범위

청구항 1.

hIL-13에 특이적으로 결합하고 그의 활성을 중화시키는 치료 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 2.

hIL-13에 특이적으로 결합하고 hIL-13과 hIL-13R 사이의 상호작용을 조절하는 (예를 들어 억제하거나 차단하는) 치료 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 3.

hIL-13에 특이적으로 결합하고 hIL-13과 hIL-13R 사이의 상호작용을 조절하고 (예를 들어 억제하거나 차단하고) 서열 3의 CDRH3을 포함하는 치료 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 4.

hIL-13에 특이적으로 결합하고 hIL-13과 hIL-13R 사이의 상호작용을 조절하고 CDRH1 (서열 1), CDRH2 (서열 2), CDRH3 (서열 3), CDRL1 (서열 4), CDRL2 (서열 5), CDRL3 (서열 6)의 CDR을 포함하는 치료 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 5.

서열 9의 서열 84에 제시된 에피토프에 특이적으로 결합하고 hIL-13과 hIL-13R 사이의 상호작용을 조절하는 치료 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 6.

제5항에 있어서, 항체가 서열 9의 잔기 103 및 107을 포함하여 잔기 103 내지 107 사이에 결합하는 것인 치료 항체 또는 항원 결합 단편.

청구항 7.

제6항에 있어서, 항체의 hIL-13과의 결합이 서열 9의 위치 107에 아르기닌 잔기의 존재에 의존하는 것인 치료 항체 또는 항원 결합 단편.

청구항 8.

제7항에 있어서, 서열 9의 위치 107에서 아르기닌 잔기가 알라닌 잔기로 치환되면 상기 항체 및 그의 항원 결합 단편과 서열 9의 위치 107에 상기 치환이 없는 서열 9 사이의 결합에 비해 상기 항체와 hIL-13 사이의 결합이 상실되는 것인 치료 항체 또는 항원 결합 단편.

청구항 9.

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 무손상 항체인 치료 항체 또는 항원 결합 단편.

청구항 10.

제9항에 있어서, 항체가 래트, 마우스, 영장류 (예를 들어 사이노몰거스, 구세계 원숭이 또는 대형 유인원) 또는 인간인 치료 항체 또는 항원 결합 단편.

청구항 11.

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 인간화 또는 키메라 항체인 치료 항체.

청구항 12.

제9항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 인간 불변 도메인을 포함하는 것인 항체.

청구항 13.

제12항에 있어서, 항체가 IgG 이소형의 불변 영역을 포함하는 것인 항체.

청구항 14.

제13항에 있어서, 항체가 IgG1 또는 IgG4인 항체.

청구항 15.

제10항에 있어서, 서열 7의 VH 도메인 및 서열 8의 VL 도메인을 포함하는 쥐 항체.

청구항 16.

제11항에 있어서, 서열 11의 VH 도메인 및 서열 15의 VL 도메인을 포함하는 인간화 항체.

청구항 17.

제11항에 있어서, 서열 12의 VH 도메인 및 서열 15의 VL 도메인을 포함하는 인간화 항체.

청구항 18.

제11항에 있어서, 서열 13의 VH 도메인 및 서열 15의 VL 도메인을 포함하는 인간화 항체.

청구항 19.

제11항에 있어서, 서열 14의 VH 도메인 및 서열 15의 VL 도메인을 포함하는 인간화 항체.

청구항 20.

제11항에 있어서, 서열 11의 VH 도메인 및 서열 16의 VL 도메인을 포함하는 인간화 항체.

청구항 21.

제11항에 있어서, 서열 12의 VH 도메인 및 서열 16의 VL 도메인을 포함하는 인간화 항체.

청구항 22.

제11항에 있어서, 서열 13의 VH 도메인 및 서열 16의 VL 도메인을 포함하는 인간화 항체.

청구항 23.

제11항에 있어서, 서열 14의 VH 도메인 및 서열 16의 VL 도메인을 포함하는 인간화 항체.

청구항 24.

제16항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, IgG 이소형 (예를 들어 IgG1 또는 IgG4)의 인간 불변 영역을 추가로 포함하는 인간화 항체.

청구항 25.

서열 18의 중쇄 및 서열 22의 경쇄를 포함하는 인간화 항체.

청구항 26.

서열 19의 중쇄 및 서열 22의 경쇄를 포함하는 인간화 항체.

청구항 27.

서열 20의 중쇄 및 서열 22의 경쇄를 포함하는 인간화 항체.

청구항 28.

서열 21의 중쇄 및 서열 22의 경쇄를 포함하는 인간화 항체.

청구항 29.

서열 18의 중쇄 및 서열 23의 경쇄를 포함하는 인간화 항체.

청구항 30.

서열 19의 중쇄 및 서열 23의 경쇄를 포함하는 인간화 항체.

청구항 31.

서열 20의 중쇄 및 서열 23의 경쇄를 포함하는 인간화 항체.

청구항 32.

서열 21의 중쇄 및 서열 23의 경쇄를 포함하는 인간화 항체.

청구항 33.

hIL-13에 특이적으로 결합하는 인간화 치료 항체 또는 그의 항원 결합 단편으로서, 상기 항체 또는 그의 단편이 CDRH3 (서열 3)을 포함하고 임의로 서열 1, 2, 4, 5 및 6의 CDR을 추가로 포함하고, 인간 수용 중쇄 프레임워크 영역의 19, 38, 73 및 81로 이루어지는 군 중에서 선택되는 잔기 및 인간 수용 경쇄 프레임워크의 위치 85의 잔기가 CDRH3이 유래되는 공여 항체 프레임워크에서 발견되는 대응하는 잔기로 치환되는 것인 인간화 치료 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 34.

hIL-13에 특이적으로 결합하는 인간화 치료 항체 또는 그의 항원 결합 단편으로서, 상기 항체 또는 그의 단편이 CDRH3 (서열 3)을 포함하고 임의로 서열 1, 2, 4, 5 및 6의 CDR을 추가로 포함하고, 인간 중쇄 프레임워크가 위치 39의 잔기 I, 위치 20의 잔기 R, 위치 74의 잔기 T, 위치 81의 잔기 R 중의 하나 이상의 (예를 들어 모든) 잔기 (또는 그의 보존 치환체)를 포함하고, 인간 경쇄가 위치 85에 잔기 V를 포함하는 것인 인간화 치료 항체 또는 항원 결합 단편.

청구항 35.

Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디, 미니항체, 미니바디 (minibody), 단리된 VH 또는 단리된 VL 인, 제1항 내지 제34항 중 어느 한 항 기재의 항원 결합 단편.

청구항 36.

제12항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 감소된 ADCC 및(또는) 보체 활성화를 갖도록 돌연변이된 Fc 영역을 포함하는 항체.

청구항 37.

제1항 내지 제36항 중 어느 한 항 기재의 항체의 hIL-13에 대한 결합을 경쟁적으로 억제하는 치료 항체.

청구항 38.

제1항 내지 제37항 중 어느 한 항 기재의 항체의 중쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제1 벡터 및 제1항 내지 제37항 중 어느 한 항 기재의 항체의 경쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제2 벡터를 포함하는 재조합 형질전환되거나 형질감염된 숙주세포.

청구항 39.

제38항에 있어서, 제1 벡터가 서열 7의 폴리뉴클레오티드를 포함하고, 제2 벡터가 서열 8의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것인 숙주세포.

청구항 40.

제38항에 있어서, 제1 벡터가 서열 26, 서열 27, 서열 28, 서열 29, 서열 32, 서열 33, 서열 34, 서열 35로 이루어지는 군 중에서 선택되는 폴리뉴클레오티드를 포함하고, 제2 벡터가 서열 15, 서열 16, 서열 36, 서열 37로 이루어지는 군 중에서 선택되는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것인 숙주세포.

청구항 41.

제38항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 진핵 세포인 숙주세포.

청구항 42.

제41항에 있어서, 세포가 포유동물 세포인 숙주세포.

청구항 43.

제41 또는 42항에 있어서, 세포가 CHO 또는 NSO인 숙주세포.

청구항 44.

제38항 내지 제43항 중 어느 한 항 기재의 숙주세포를 무혈청 배양 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, 제1항 내지 제37항 중 어느 한 항에 따른 치료 항체의 생산 방법.

청구항 45.

제44항에 있어서, 상기 항체가 상기 숙주세포에 의해 상기 배양 배지 내로 분비되는 것인 방법.

청구항 46.

제45항에 있어서, 상기 항체가 추가로 상기 항체 함유 배양 배지에 대해 적어도 95% 이상 (예를 들어 98% 이상)으로 정제 되는 것인 방법.

청구항 47.

제1항 내지 제37항 중 어느 한 항에 따른 치료 항체 또는 그의 항원 결합 단편 및 제약학상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물.

청구항 48.

제47항에 따른 조성물을 사용 지시서와 함께 포함하는 키트.

청구항 49.

치료 유효량의 제1항 내지 제37항 중 어느 한 항의 치료 항체를 투여하는 단계를 포함하는, 천식에 걸린 인간 환자를 치료 하는 방법.

청구항 50.

제49항에 있어서, 상기 환자가 알레르기성 천식에 걸린 방법.

청구항 51.

제49항에 있어서, 환자가 중증 천식에 걸린 방법.

청구항 52.

제49항에 있어서, 환자가 난치성 (difficult) 천식에 걸린 방법.

청구항 53.

제49항에 있어서, 환자가 불안정성 (brittle) 천식에 걸린 방법.

청구항 54.

제49항에 있어서, 환자가 야간 천식, 월경전 천식, 스테로이드 내성 천식, 스테로이드 의존성 천식, 아스피린 유발 천식, 성인 발병 천식, 소아 천식에 걸린 방법.

청구항 55.

환자에게 치료 유효량의 제1항 내지 제37항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 항원 결합 단편을 투여하는 단계를 포함하는, 코르티코스테로이드를 사용하는 치료에 불응성인 천식 질환에 걸린 인간 환자를 치료하는 방법.

청구항 56.

환자에게 치료 유효량의 제1항 내지 제37항 중 어느 한 항에 따른 항체를 투여하는 단계를 포함하는, 인간 환자에서 급성 천식 발작을 예방하는 방법.

청구항 57.

환자에게 치료 유효량의 제1항 내지 제37항 중 어느 한 항에 따른 항체를 투여하는 단계를 포함하는, 인간 환자에서 급성 천식 발작의 빈도를 감소시키고(시키거나) 상기 발작의 효과를 경감시키는 방법.

청구항 58.

아토피성 피부염, 알레르기성 비염, 크론병, COPD, 섬유증 질병 또는 질환, 예를 들어 특발성 폐 섬유증, 진행성 전신경화증, 간 섬유증, 간 육아종, 주혈흡충증, 리슈만편모충증, 세포 주기 조절의 질병, 예를 들어 호지킨병, B 세포 만성 림프구성 백혈병으로 이루어진 군 중에서 선택된 질병 또는 질환에 걸린 인간 환자를 치료하는 방법.

청구항 59.

제1항 내지 제37항 중 어느 한 항에 따른 치료 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 알레르기성 천식, 중증 천식, 난치성 천식, 불안정성 천식, 야간 천식, 월경전 천식, 스테로이드 내성 천식, 스테로이드 의존성 천식, 아스피린 유발 천식, 성인 발병 천식, 소아 천식, 아토피성 피부염, 알레르기성 비염, 크론병, COPD, 섬유증 질병 또는 질환, 예를 들어 특발성 폐 섬유증, 진행성 전신경화증, 간 섬유증, 간 육아종, 주혈흡충증, 리슈만편모충증, 세포 주기 조절의 질병, 예를 들어 호지킨병, B 세포 만성 림프구성 백혈병으로 이루어진 군 중에서 선택된 질병 또는 질환의 치료를 위한 의약의 제조에 있어서의 용도.

청구항 60.

제1항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 hIL-13과 hIL-13R 사이의 결합을 억제하는 것인 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 61.

제60항에 있어서, 항체가 hIL-13과 hIL-13R 사이의 결합을 차단하는 것인 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 62.

hIL-13에 특이적으로 결합하고 hIL-13과 hIL-13R 사이의 상호작용을 조절하고 (예를 들어 억제하거나 차단하고) 서열 9의 KKLFR 에피토프에 결합하는 치료 항체.

청구항 63.

hIL-13에 특이적으로 결합하고 hIL-13과 hIL-13R 사이의 상호작용을 조절하고 (예를 들어 억제하거나 차단하고) 해리 상수 k_{off} 가 1.4×10^{-4} 내지 $8.22 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 범위 (예를 들어 Biacore™로 측정시)인 치료 항체.

청구항 64.

제63항에 있어서, 서열 3의 CDRH3을 포함하는 치료 항체.

청구항 65.

제64항에 있어서, 서열 1의 CDRH1, 서열 2의 CDRH2, 서열 4의 CDRL1, 서열 5의 CDRL2 및 서열 6의 CDRL3을 추가로 포함하는 치료 항체.

청구항 66.

제65항에 있어서, 항체가 인간화 항체인 치료 항체.

청구항 67.

치료 유효량의 제1항 내지 제37항 중 어느 한 항에 따른 항체 및 치료 유효량의 항-IL-4 모노클로날 항체를 투여하는 것을 포함하는, 알레르기성 천식, 중증 천식, 난치성 천식, 불안정성 천식, 야간 천식, 월경전 천식, 스테로이드 내성 천식, 스테로이드 의존성 천식, 아스피린 유발 천식, 성인 발병 천식, 소아 천식, 아토피성 피부염, 알레르기성 비염, 크론병, COPD, 섬유증 질병 또는 질환, 예를 들어 특발성 폐 섬유증, 진행성 전신경화증, 간 섬유증, 간 육아종, 주혈흡충증, 리슈만편모충증, 세포 주기 조절의 질병, 예를 들어 호지킨병, B 세포 만성 림프구성 백혈병으로 이루어진 군 중에서 선택된 질병 또는 질환에 걸린 인간 환자를 치료하는 방법.

청구항 68.

제67항에 있어서, 항-IL-4 모노클로날 항체가 제1항 내지 제37항 중 어느 한 항에 따른 항체와 동시에, 순차적으로 또는 별개로 투여되는 것인 방법.

청구항 69.

제67항 또는 제68항에 있어서, 항-IL-4 항체가 파스콜리주맙인 방법.

청구항 70.

제1항 내지 제37항 중 어느 한 항에 따른 항체 및 항-IL-4 모노클로날 항체, 예를 들어 파스콜리주맙의 알레르기성 천식, 중증 천식, 난치성 천식, 불안정성 천식, 야간 천식, 월경전 천식, 스테로이드 내성 천식, 스테로이드 의존성 천식, 아스피린 유발 천식, 성인 발병 천식, 소아 천식, 아토피성 피부염, 알레르기성 비염, 크론병, COPD, 섬유증 질병 또는 질환, 예를 들어 특발성 폐 섬유증, 진행성 전신경화증, 간 섬유증, 간 육아종, 주혈흡충증, 리슈만편모충증, 세포 주기 조절의 질병, 예를 들어 호지킨병, B 세포 만성 림프구성 백혈병으로 이루어진 군 중에서 선택된 질병 또는 질환의 치료를 위한 의약의 제조에 있어서의 용도.

청구항 71.

제1항 내지 제37항 중 어느 한 항에 따른 항체 및 항-IL-4 모노클로날 항체, 예를 들어 파스콜리주맙의 알레르기성 천식, 중증 천식, 난치성 천식, 불안정성 천식, 야간 천식, 월경전 천식, 스테로이드 내성 천식, 스테로이드 의존성 천식, 아스피린 유발 천식, 성인 발병 천식, 소아 천식, 아토피성 피부염, 알레르기성 비염, 크론병, COPD, 섬유증 질병 또는 질환, 예를 들어 특발성 폐 섬유증, 진행성 전신경화증, 간 섬유증, 간 육아증, 주혈흡충증, 리슈만편모충증, 세포 주기 조절의 질병, 예를 들어 호지킨병, B 세포 만성 림프구성 백혈병으로 이루어진 군 중에서 선택된 질병 또는 질환의 치료를 위한 키트의 제조에 있어서의 용도.

청구항 72.

제1항 내지 제37항 중 어느 한 항에 따른 항체 및 제약학상 허용되는 담체를 포함하는 제1 제약 조성물, 및 항-IL-4 모노클로날 항체, 예를 들어 파스콜리주맙 및 제약학상 허용되는 담체를 포함하는 제2 제약 조성물을 임의로 사용 지시서와 함께 포함하는 키트.

청구항 73.

제1항 내지 제37항 중 어느 한 항에 따른 제1 항체 및 항-IL-4 항체, 예를 들어 파스콜리주맙인 제2 항체 및 제약학상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물.

명세서

기술분야

본 발명은 인터루킨 13 (IL-13), 특히 인간 IL-13 (hIL-13)에 특이적으로 결합하는 면역글로불린에 관한 것이다. 본 발명의 한 실시태양은 hIL-13에 특이적으로 결합하는 항체에 관한 것이다. 본 발명은 또한 상기 면역글로불린을 사용하는 질병 또는 질환의 치료 방법, 상기 면역글로불린을 포함하는 제약 조성물, 및 제조 방법에 관한 것이다. 본 발명의 다른 측면은 하기 상세한 설명으로부터 분명히 알 수 있을 것이다.

배경기술

인터루킨-13 (IL-13)

IL-13은 염증성 시토킨 생산을 억제하는 T 세포 유래 시토킨으로서 처음 설명된 12 kDa의 분비형 시토킨이다. 구조 연구에서는 IL-13이 2개의 디설피드 결합에 의해 유지되는 4개의 나선형 번들 배열을 갖는 것을 제시한다. IL-13이 4개의 잠재적인 글리코실화 부위를 갖지만, 래트 폐로부터의 천연 IL-13을 분석하면 IL-13이 비글리코실화된 분자로서 생산됨을 보여준다. NSO 및 COS-7 세포로부터의 인간 IL-13의 발현은 상기 관찰을 확인해 준다 (Eisenmesser et al, J. Mol. Biol. 2001 310(1):231-241; Moy et al, J. Mol. Biol. 2001 310(1):219-230; Cannon-Carlson et al, Protein Expression and Purification 1998 12(2):239-248).

IL-13은 활성화된 Th2 세포, 비만 세포, 호염기구, 수지상 세포, 각질세포 및 NKT 세포를 포함한 다양한 세포 종류에 의해 생산된 다면발현성 시토킨이다. 이는 또한 Th0, Th1, CD8 및 나이브 (naive) CD45RA⁺ T 세포에 의해 생산될 수 있다. IL-13은 IL4와 부분적으로 겹치는 면역조절 활성을 갖고, 이러한 중복성은 IL4 및 IL-13에 대한 수용체 내의 공유 성분에 의해 설명될 수 있다. IL-13은 IL4Ra 및 IL-13Ra1 사슬로 구성된 이종이량체인 타입 II IL4 수용체를 통해 신호를 전달한다. IL-13Ra1은 IL-13에 저친화도 (Kd = 2-10 nM)로 결합하지만, IL4Ra와 페어링될 때 고친화도 (Kd = 400 pM)로 결합하여 신호를 전달하는 기능적 IL-13 수용체 (인간 수용체는 본원에서 "hIL-13R"로 칭함)를 형성하여, JAK/STAT 및 IRS-1/IRS-2 경로를 활성화시킨다. 또한, IL-13에 고친화도 (Kd = 250 pM)로 결합하지만 신호를 전달하지 않고, 대신에 유인 (decoy) 수용체로서 기능하는 것으로 생각되는 추가의 IL-13 수용체 사슬이 특성화되었다 (IL-13Ra2). IL-13에 대한 기능적 수용체는 기도 상피, 평활근, 비만 세포, 호산구, 호염기구, B 세포, 섬유모세포, 단핵구 및 대식세포를 포함한 광범위한 세포 상에서 발현된다. T 세포는 IL-13에 대한 기능적 수용체를 갖지 않는다 (Hilton et al, PNAS 1996 93(1):497-501; Caput et al, J. Biol. Chem. 1996 271(28):16921-16926; Hershey GK, J. Allergy Clin. Immunol. 2003 111(4):677-690).

IL-13 및 IL-4는 모두 알레르기 관련 염증을 촉진시키고, 세균, 바이러스 및 세포내 병원체에 의한 염증을 억제함으로써 면역 및 염증 반응을 변경시키는 기능을 수행한다. IL-13의 주요 생물학적 효과는 B 세포 증식의 유도 및 IgE로의 이소형 전환의 조절; B 세포 및 단핵구 상의 MHC II 및 CD23 발현의 유도; 내피 세포 상의 VCAM-1의 상향조절; 케모카인 생산의 조절; 비만 세포, 호산구 및 호중구 기능의 활성화와 단핵구 및 대식세포 집단에서 염증 유발 유전자 발현의 억제를 포함한다. IL-13은 T 세포에 대한 임의의 증식 효과를 갖지 않는다. 따라서, IL4와는 달리, IL-13은 CD4 T 세포의 Th2-타입 세포로의 초기 분화에 중요한 것으로 보이지 않고, 대신에 알레르기성 염증의 효과기 상 (phase)에서 중요한 것으로 보인다 (McKenzie et al, PNAS 1993 90(8):3735-3739; Wynn TA, Annu. Rev. Immunol. 2003 21:425-456).

IL-13 및 천식

천식은 하부 기도의 염증에 의해 유발된 만성 폐 질환이고, 재발성 호흡 문제를 특징으로 한다. 환자의 기도는 민감하고 증상이 없을 때조차 항상 어느 정도 팽창하거나 염증이 있다. 염증은 기도를 좁게 하고 폐 내외로 공기 유동을 감소시켜 호흡을 곤란하게 하고 천명 (wheezing), 가슴 조임 및 기침을 일으킨다. 천식은 알레르겐 (예를 들어 먼지 진드기, 꽃가루, 곰팡이), 자극물 (예를 들어 연기, 증기, 강한 냄새), 호흡기 감염, 운동 및 건조한 기후에 대한 초과민성에 의해 촉발된다. 촉발 인자는 기도를 자극하고, 기도의 내막은 팽창하여 염증이 훨씬 더 많아지고, 이어서 점액이 기도를 막고, 호흡이 곤란해지고 스트레스가 많아질 때까지 기도 주위의 근육이 조여지고 천식 증상이 나타난다.

동물 모델 및 환자로부터 천식 염증 및 다른 병리학이 공기알레르겐 및 다른 자극물에 대한 잘못 조절된 Th2 반응에 의해 발생한다는 강력한 증거가 있다 (Busse et al, Am. J. Resp. Crit. Care Med. 1995 152(1):388-393). 특히, IL-13은 폐에서 기도 과다반응, 호산구증, 배상세포 화생 (metaplasia) 및 점액 과다분비를 포함한 다양한 세포성 반응을 일으키는 주요 효과기 시토킨인 것으로 생각된다.

천식에서 IL-13의 역할에 대한 임상 증거

IL-13을 코딩하는 유전자는 염색체 5q31 상에 위치한다. 상기 영역은 또한 IL-3, IL-4, IL-5, IL-9 및 GM-CSF를 코딩하는 유전자를 함유하고, 천식과 연계되었다. 천식 및 아토피와 연관된 IL-13의 유전자 변이체는 프로모터 및 코딩 영역 모두에서 발견되었다 (Vercelli D, Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol. 2002 2(5):389-393). 코딩 변이체인 Q130 IL-13 (본원에서 "Q130 IL-13"으로 칭함)에 대한 기능 연구 데이터가 이용가능하다. 제4 엑손에서 발견된 +2044 G에서 A로의 단일 뉴클레오타이드 다형성 (SNP)은 위치 130에서 아르기닌을 글루타민으로 치환시킨다 (Q130 IL-13). 또한, 서열 9에서 이는 위치 110과 동등하며, 여기서 성숙 인간 IL-13 아미노산 서열의 출발에서의 첫번째 'G' 아미노산 잔기는 위치 1이다. 상기 변이체는 일본 및 유럽 인구집단에서 천식, 증가된 IgE 수준 및 아토피성 피부염과 연관되는 것으로 밝혀졌다. Q130 IL-13은 야생형 IL-13에 비해 안정성이 향상된 것으로 생각된다. 이는 또한 IL-13Ra2 유인 수용체에 대한 친화도가 약간 더 낮고, 상기 관찰과 일치하게 비-동종접합 환자에 비해 Q130 IL-13 변이체에 대해 동종접합성인 환자에서 보다 높은 중앙 혈청 IL-13 수준이 발견되었다. 이들 결과는 Q130 IL-13이 IL-13의 국소 및 전신 농도에 영향을 미칠 수 있음을 나타낸다 (Kazuhiko et al, J. Allergy Clin. Immunol. 2002 109(6):980-987).

상승된 IL-13 수준은 아토피성 및 비아토피성 천식 모두에서 측정되었다. 한 연구에서, 정상 대조 환자에서의 8 pg/ml에 비해 50 pg/ml의 평균 혈청 IL-13 수준이 천식 환자에서 측정되었다 (Lee et al, J. Asthma 2001 38(8):665-671). 증가된 IL-13 수준은 또한 혈장, 기관지 폐포 세척액, 폐 생검 샘플 및 가래에서 측정되었다 (Berry et al, J Allergy Clin. Immunol 2004 114(5):1106-1109; Kroegel et al, Eur Respir. J. 1996 9(5):899-904; Huang et al, J. Immunol. 1995 155(5):2688-2694; Humbert et al, J. Allergy Clin. Immunol. 1997 99(5):657-665).

천식에서 IL-13의 관여에 대한 생체내 증거

많은 연구에서는 알레르기성 천식의 급성 및 만성 마우스 모델 모두에서 병변을 일으키는데 있어서 IL-13의 중요한 효과기 역할을 규정하였다. 고친화도 IL-13 수용체 (IL-13Ra2) 또는 항-IL-13 폴리클로날 항체는 이들 모델에서 마우스 IL-13 생물활성을 중화시키기 위해 사용되었다. 알레르겐 접촉시 IL-13을 차단시키면 OVA-유발된 기도 과다반응, 호산구증 및 배상세포 화생을 완전히 억제시켰다. 반대로, 감각 후 알레르겐 접촉상 동안 IL-4에 대한 항체를 투여하면 단지 천식 표현형을 부분적으로 감소시켰다. 따라서, 외인성 IL-4 및 IL-13은 모두 천식 유사 표현형을 유발할 수 있지만, IL-13에 대한 효과기 활성화는 IL-4에 대한 것보다 월등한 것으로 보인다. 이들 데이터는 면역 유발에서 IL-4에 대한 일차 역할 (특히 Th2 세포 발달 및 기도로의 동원, 및 IgE 생산에 대한)을 제안하는 반면, IL-13은 기도 과다반응, 점액 과다생산 및 세포성

염증을 포함하는 다양한 효과기 결과에 주로 관여하는 것으로 보인다 (Wills-Karp et al, Science 1998 282:2258-2261; Grunig et al, Science 1998 282:2261-2263; Taube et al, J. Immunol. 2002 169:6482-6489; Bleasdale et al, J. Immunol 2001 166(8):5219-5224).

보완적인 실험에서, 폐 IL-13 수준은 트랜스제닉 마우스에서 과다발현에 의해 또는 IL-13 단백질의 야생형 마우스 기관으로의 점적주입에 의해 상승되었다. 두 설정에서, 천식 유사 특징이 유발되었다: 콜린성 자극에 대한 비특이적 기도 과다반응, 폐 호산구증, 상피 세포 과다형성, 점액 세포 증식성, 상피하 섬유증, 기도 폐쇄 및 샤르코-라이덴 (Charcot-Leyden) 유사 결정. 또한, IL-13은 기종성 변화 및 점액 화생을 일으키는, 폐에서 기질 금속단백분해효소 및 카텝신 프로테아제의 강력한 자극인자인 것으로 밝혀졌다. 따라서, IL-13은 천식 및 COPD 질환 표현형 모두에서 중요한 효과기 분자일 수 있다 (Zhu et al, J. Clin. Invest. 1999 103(6):779-788; Zheng et al, J. Clin. Invest. 2000 106(9): 1081-1093).

이들 데이터는 IL-13 활성이 잘 입증된 동물 모델에서 알레르기성 천식의 주요 임상 및 병리학적 특징 중 몇몇을 생성시키기 위해 필요하고 또한 충분함을 나타낸다.

만성 폐쇄성 폐질환 (COPD)

COPD는 폐기종 및 만성 기관지염을 포함하는 몇몇 임상 증후군을 포괄하는 일반 용어이다. 증상은 천식과 유사하고, COPD는 동일한 약물로 치료할 수 있다. COPD는 만성, 진행성 및 대부분 비가역적 기류 폐쇄를 특징으로 한다. 질병의 경과에 대한 개인의 기여는 알려지지 않았지만, 흡연이 사례의 90%를 유발하는 것으로 생각된다. 증상은 기침, 만성 기관지염, 호흡곤란 및 호흡기 감염을 포함한다. 궁극적으로, 질병은 중증 장애 및 사망을 일으킬 것이다. 만성 기관지염은 임의의 다른 설명 없이 2년에 걸쳐 적어도 3개월 동안 대부분의 날에 기침 또는 가래 생산 병력을 갖는 환자에서 진단된다. 폐기종은 공기공간의 비정상적인 영구 확대 및 폐포벽의 파괴를 특징으로 한다.

IL-13은 COPD의 발병에서 역할을 할 수 있다. COPD를 발병한 인간 흡연자는 폐 실질 내에 많은 염증성 세포 종류 (호중구, 대식세포, 호산구)를 갖는다. IL-13은 염증유발성 Th2 시토킨이고, 따라서 폐기종 진행의 모델이 된다; 쟁 (Zheng) 등은 IL-13 과다발현을 IL-13 트랜스제닉 마우스에서 기도 상피에 대해 표적화하였다. 이들 동물은 기도 및 폐 실질성 염증 및 폐기종을 발병하였다. 이들은 또한 만성 기관지염을 암시하는 점액 화생을 발병하였다 (J. Clin. Invest. 2000 106(9):1081-1093).

알레르기성 천식과 연관된 IL-13 프로모터 다형성 (-1055 C에서 T로의)은 또한 건강한 대조군에 비해 COPD 환자에서 증가된 빈도를 갖는 것으로 보고되었다. 이는 COPD 발병의 위험 증가에서 IL-13 프로모터 다형성에 대한 기능적 역할을 의미한다 (Kraan et al, Genes and Immunity 2002 3:436-439). 또한, 무증상 흡연자에 비해 증가된 수의 IL-13 및 IL-4 양성 세포가 만성 기관지염의 흡연자에서 관찰되었다 (Miotto et al, Eur. Resp. J. 2003 22:602-608). 그러나, 중증 폐기종 환자의 폐에서 IL-13 발현 수준을 평가하기 위한 최근의 연구에서는 IL-13 수준과 질병 사이의 연관성을 발견하지 못하였다 (Boutten et al, Thorax 2004 59:850-854).

아토피성 피부염 및 알레르기성 비염을 포함하는 알레르기 질환

IL-13은 또한 아토피성 질병, 예를 들어 아토피성 비염 및 아토피성 피부염에 관련되었다. 알레르기성 비염은 미국에서 가장 흔한 아토피성 질환이고 성인의 25% 이하와 아동의 40% 초과에서 이환되는 것으로 추정된다. 알레르기성 비염과 천식 사이에는 밀접한 관계가 있다. 두 병은 공통적인 면역병리학 및 병태생리학을 공유하고; 코 및 기관지 조직 내의 호산구 및 Th2 림프구가 역할을 하는 유사한 면역학적 과정을 갖는다. Th2 시토킨, 특히 IL-4 및 IL-5의 과도한 생산이 알레르기 질환의 발병기전에 기초적인 것으로 생각된다. IL-13은 IL-4와 몇몇 특징 및 효과기 기능을 공유하고, 이는 IL-4 및 IL-13 수용체 유용성에서 기능적인 겹침, 세포내 신호전달 성분, 및 유전적 조직화와 함께 인간을 생체 내에서 즉각적인 과민성 상태로 촉진하거나 유지하는데 있어서 IL-13의 역할에 대한 설득력있는 (비록 간접적이지만) 증거를 제공한다. 이는 계절성 알레르기성 비염이 있는 아토피 대상이 Ag-의존성이지만 폴리클로날 활성화가 아닌 반응에서 유의하게 더 강한 IL-13 반응을 나타냈음을 증명한 리 (Li) 등 (Li et al. J Immunol 1998;161:7007)에 의해 확증되었다.

아토피성 피부염은 일반적이고 만성인 재발성 고도 소양성 염증성 피부 질환이다. 아토피성 피부염 환자의 병변 피부는 급성상 동안 IL-4, IL-5 및 IL-13의 우세한 발현과 연관된 염증성 T-세포 침윤의 조직학적 특징이 있다 (Simon et al, J Allergy Clin Immunol 2004;114:887; Hamid et al. J Allergy Clin Immunol 1996; 98:225). 또한, 타자와 (Tazawa) 등은 IL-13 mRNA (IL-4는 아님)가 아토피성 피부염 환자의 아급성 및 만성 피부 병변에서 유의하게 상향조절됨을 밝혔다 (Tazawa et al, Arch Derm Res 2004;296:459). 이들 환자에서 IL-13 발현 순환 CD4+ 및 CD8+ T-세포의 빈도도 또한 유의하게 증가한다 (Aleksza et al British J Dermatol 2002;147:1135). 이러한 증가된 IL-13 활성은 혈청 IgE 수준을

상승시켜 아토피성 피부염의 발병기전에 기여하는 것으로 생각된다. 또한, 신생 CD4+ T 세포에 의한 IL-13 생산 증가는 알레르기성 질병, 특히 아토피성 피부염의 후속 발병에 대한 고위험이 있는 신생아를 확인하기 위한 유용한 마커이다 (Ohshima et al. *Pediatr Res* 2002; 51:195). 아토피성 피부염의 병인론에서 IL-13의 중요성에 대한 추가의 증거는 시몬 (Simon) 등 (Simon et al, *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114:887)에 의해 제공되었다; 타크로리무스 연고 (시토킨 생산에 대한 세포내 신호전달 경로를 억제하는 면역억제약)를 사용하는 외용 투여가 IL-13을 포함하는 Th2 시토킨 국소 발현의 유의한 감소와 함께 아토피성 피부 병변을 유의하게 임상적 및 조직학적으로 개선시켰다. 또한, IL-13 Ra1 (IL-4Ra와 함께 IL-13에 대한 기능적 수용체를 형성하는 세포 표면 단백질)은 아토피성 피부염 환자의 피부에서 초기저 각질세포 상에서 과다발현된 것으로 나타났고, IL-13은 IL-13 Ra1 mRNA를 시험관 내에서 상향조절할 수 있었다 (Wongpiyabovorn et al., *J Dermatol Science* 2003;33:31).

이들 데이터는 집합적으로 IL-13 모노클로날 항체를 포함한 IL-13 표적된 개입이 인간 알레르기 질환의 치료를 위한 효과적인 방법을 제공할 수 있음을 나타낸다.

식도 호산구증

식도에서 호산구 축적은 위-식도 역류 질환, 호산구성 식도염, 호산구성 위장염 및 기생충 감염을 포함한 다양한 질환의 환자에서 공통적인 의료 문제이다. 식도 호산구증은 알레르기 반응과 연관되고, 마우스를 공기알레르겐으로 반복 접종하여 알레르기성 기도 염증과 식도 호산구증 사이의 연관성을 확립하였다. Th2 세포는 염증성 및 효과기 경로를 직접 및 간접적으로 활성화시키는 IL-4 및 IL-13을 포함한 일련의 시토킨 분비를 통해 호산구-연관 염증을 유발하는 것으로 생각된다. IL-13이 Th2-세포에 의해 다량으로 생산되고 알레르기 질환의 다수 특징 (예를 들어 IgE 생산, 점액 과다생산, 호산구 동원 및 생존, 및 기도 과다반응)을 조절하기 때문에 특히 중요한 것으로 보인다. 호산구는 호산구성 염증 반응에서 시험관 내, 생체의 및 생체내 조건 하에 GM-CSF에 노출된 후 기능적 활성인 IL-13 및(또는) IL-5를 생성할 수 있다 (Schmid-Grendelmeier *J Immunology*, 2002, 169: 1021-1027). 야생형 STAT-6, 예오타신-1 또는 IL-5 결핍 마우스의 폐에 기관내 투여에 의해 전달된 IL-13은 IL-13에 의해 촉발된 폐렴이 식도 호산구증의 발병과 연관됨을 확립하였다 (Mishra et al. *Gastroenterol* 2003; 125: 1419). 이들 데이터는 함께 식도 호산구증에서 IL-13의 역할을 대한 증거를 제공한다.

종양학 적용증

흥미로운 다른 중요한 영역은 특정 종류의 종양의 성장을 억제하기 위해 IL-13 또는 IL-13 수용체를 표적화하는데 있다. 타입 1 T 세포 매개 숙주 방어는 생체 내에서 최적 종양 거부를 매개하는 것으로 생각되고, Th2-타입 반응에 대한 편향은 종양 거부를 차단하고(하거나) 종양 재발의 촉진에 기여할 수 있다 (Kobayashi M et al. *J. Immunol.* 1998; 160:5869). 이식가능 종양 세포주를 사용한 여러 동물 연구에서는 Stat6, IL-4 및 IL-13 (부분적으로 NKT 세포에 의해 생산됨)이 종양 거부를 억제할 수 있음을 증명함으로써 상기 견해를 지지한다 (Terabe et al. *Nat. Immunol.* 2000; 1:515; Kacha et al. *J. Immunol.* 2000; 165:6024-28; Ostrand-Rosenberg et al. *J. Immunol.* 2000; 165:6015). Stat-6의 부재시의 강력한 항-종양 활성은 종양-특이적 IFN γ 생산 및 CTL 활성의 향상 때문인 것으로 생각되었다. 또한, NKT 세포의 손실은 종양 재발의 동반 상승과 함께 IL-13 생산을 감소시키는 것으로 나타났고, 이는 부분적으로 NKT 세포에 의해 생산된 IL-13이 면역감시에 중요함을 나타낸다 (Terabe et al. *Nat. Immunol.* 2000; 1:515). 따라서, 이들 발견은 IL-13 mAb를 포함한 IL-13 억제제 또는 신규한 IL-13 길항제가 종양 세포에 대한 면역 반응을 하향조절하는 음성 조절성 IL-13 역할을 저해함으로써 암 면역치료제로서 효과적일 수 있음을 제안한다.

Th-타입-1-연관 항-종양 방어를 증가시키는 것 외에, IL-13 억제제는 또한 종양 세포 성장을 보다 직접적으로 차단할 수 있다. 예를 들어, B-세포 만성 림프구성 백혈병 (B-CLL) 및 호지킨병(Hodgkin) 병에서, IL-13은 세포사멸을 차단하거나 종양 세포 증식을 촉진한다 (Chaouchi et al. *Blood* 1996; 87:1022; Kapp et al. *J. Exp Med.* 1999; 189:1939). B-CLL은 백혈병 세포에서 세포사멸 결함에 관여하는 B 림프구로부터 기원하는 임상적 이종성 질병이다. IL-13은 직접 성장 인자로서 작용하는 것으로 생각되지 않지만, 시험관 내에서의 자연적인 세포사멸로부터 종양 세포를 보호하고 (Chaouchi et al. *Blood* 1996; 87:1022; Lai et al. *J. Immunol.* 1999; 162:78) 신생물 세포 사멸을 방지함으로써 B-CLL에 기여할 수 있다.

호지킨병은 주로 젊은 성인층에 이환되는 림프종의 종류이고, 미국에서 매년 약 7,500명의 환자가 발생한다. 상기 암은 큰 다핵 호지킨/리이드-스테른베르크 (Reed-Sternberg) 세포 (H/RS)의 존재를 특징으로 한다. 대다수의 경우에, 악성 세포 집단은 B 세포로부터 발생한다. 몇몇 호지킨병-유래 세포주, 및 호지킨 림프종 환자로부터 취한 림프절 조직은 IL-13 및 (또는) IL-13 수용체를 과다발현한다 (Kapp et al. *J. Exp Med.* 1999; 189:1939, Billard et al. *Eur Cytokine Netw* 1997; 8:19; Skinnider et al. *Blood* 2001; 97:250; Ohshima et al, *Cell Immunol* 2001; 211:37). 항-IL-13 mAb 또는 IL-13 길항제를 중화시키면 H/RS 세포 증식을 용량 의존적 방식으로 억제하는 것으로 나타났다 (Kapp et al. *J. Exp*

Med. 1999; 189:1939; Oshima et al, Cell Immunol 2001; 211:37). 유사하게, 이식된 호지킨병-유래 세포주를 갖는 NOD/SCID 마우스에 가용성 IL-13Ra2 유인 수용체를 전달하면 종양 발현 및 성장을 지연시키고 생존을 향상시켰고, 이는 IL-13 중화가 시험관내 및 생체 내에서 호지킨 림프종 성장을 억제할 수 있음을 증명한다 (Trieu et al. Cancer Research 2004; 64:3271). 집합적으로, 이들 연구는 IL-13이 H/RS 세포의 증식을 자가분비 방식으로 자극함을 나타낸다 (Kapp et al. J. Exp Med. 1999; 189:1939; Ohshima et al. Histopathology 2001; 38:368).

따라서, IL-13의 중화는 동시에 항-종양 방어를 향상시키면서 종양 세포 성장을 억제함으로써 호지킨병 및 다른 B 세포-연관 암에 대한 매력적이고 효과적인 치료를 나타낼 수 있다.

염증성 장 질환

염증성 장 질환 (IBD)의 발병기전에서 IL-13에 대한 가능한 역할이 존재한다. 염증성 장 질환은 임상적으로 궤양성 대장염, 크론병 및 불확정 대장염으로 분류된 많은 질병을 포함한다. 그의 주요 소견은 장관 점막에서 Th1 및 Th2 림프구의 활성화에서 불균형과 함께 확대된 면역 반응으로 인한 만성 장관 염증이다. 이는 크론병 (Bamias et al. Gastroenterol 2005; 128:657) 및 궤양성 대장염 (Heller et al, Immunity 2002; 17:629)의 동물 모델에서 증명되었다. IL-13Ra2-Fc 투여에 의한 IL-13의 중화는 인간 궤양성 대장염의 쥐 Th2 모델에서 대장염을 예방하였다 (Heller et al, Immunity 2002; 17:629). 또한, 상기 모델에서 IL-13 생산은 신속하게 IL-4의 생산을 대체하고, IL-13 생산은 NKT 세포의 자극에 의해 유도될 수 있고, 이는 조직 손상이 상피 세포에 대한 IL-13의 독성 활성화로 생성될 수 있음을 제시한다. 상기 발견을 지지하는 몇몇 인간 데이터가 존재한다: 궤양성 대장염 환자로부터 IL-13 양성 직장 생검 시료의 빈도는 염증성 및 비염증성 대조 대상보다 유의하게 더 높고, 보다 높은 속도의 IL-4 및 IL-13 발현이 비급성 궤양성 대장염보다 급성형에서 관찰되었다 (Inoue et al. Am J Gastroenterol 1999; 94:2441). 또한, 아키도 (Akido) 등은 크론병 환자의 장관 절편으로부터 외부 근육에서 면역 활성을 특성화하였고, IL-4 및 IL-13이 STAT-6 경로를 통해 장관 평활근 세포의 과도수축성을 매개하는 것을 밝혔다. 저자는 상기 경로가 크론병에서 장관 근육의 과도수축성에 기여할 수 있는 것으로 결론지었다 (Akido et al., Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2005; 288:619).

따라서, IL-13 mAb는 가능하게는 다른 시토킨에 대해 작용하는 분자와 조합되어, IBD의 진행을 중지시키거나 느리게 하기 위한 방법을 제공할 수 있다.

건선 및 건선 관절염

건선은 각질세포의 과다증식, 및 표피 각질세포의 표현형에 영향을 미칠 수 있는 다양한 시토킨을 생산하는, 활성화된 T 세포를 포함하는 면역학적 세포성 침윤을 특징으로 하는 만성 피부 질환이다. CDw60은 건선 피부의 건선성 기저 및 초기 각질세포의 표면 상에서 상향조절되는 탄수화물 함유 분자이다. 건선 병변으로부터 유래된 T 세포로부터 분비된 IL-4 및 IL-13은 각질세포 상에서 CDw60의 발현을 강하게 상향조절하는 것으로 나타난 반면 (Skov et al., Am J Pathol 1997;15:675), 인터페론-감마는 배양된 각질세포 상에서 CDw60의 IL-4/IL-13 매개된 유도를 차단하였다 (Huang et al., J Invest Dermatol 2001;116:305). 따라서, 건선성 표피 각질세포 상의 CDw60 발현은 적어도 부분적으로 병변 내에서 활성화된 T 세포에 의해 분비된 IL-13에 의해 유도되는 것으로 생각된다. 또한, IL-13 Ra1 및 IL-4Ra (IL-13에 대한 수용체 복합체를 함께 형성하는 세포 표면 단백질)는 건선 및 건선이 없는 환자로부터의 피부 생검에서 상이하게 발현되고 (Cancino-Diaz et al., J Invest Dermatol 2002;119:1114; Wongpiyabovorn et al., J Dermatol Science 2003;33:31), 시험관내 실험에서는 IL-13 (IL-4는 아님)이 IL-13Ra1의 발현을 상향조절할 수 있음을 입증하였다 (Wongpiyabovorn et al., J Dermatol Science 2003;33:31). IL-13은 다양한 세포 종류에 대해 효과를 가지므로, 이들 연구는 IL-13 수용체가 건선의 초기 염증 과정에 일부 역할을 할 수 있음을 제안한다.

건선 관절염은 염증 유발 및 항-염증성 시토킨에 의해 매개된 윤활막염을 특징으로 한다. 다양한 형태의 관절염에서 IL-13의 역할에 관심이 증가하고 있다. 스파다로 (Spadaro) 등은 골관절염 환자보다 건선 관절염 및 류마티스성 관절염 환자의 윤활액에서 유의하게 더 높은 수준의 IL-13을 관찰하였다. 또한, IL-13의 윤활액 수준은 건선 관절염 환자의 혈청 내에서보다 유의하게 더 높았고, IL-13 윤활액/혈청 비는 류마티스성 관절염군에서보다 건선 관절염군에서 현저하게 더 높았고, 이는 건선 관절염 환자의 활막조직 내의 국소 생산된 IL-13에 대한 가능한 역할을 제안한다 (Spadaro et al., Ann Rheum Dis 2002; 61:174).

다른 병태에서 IL-13의 잠재적인 역할

급성 이식편 대 숙주병은 줄기세포 이식후 이환율 및 사망률의 심각한 원인이고 공여자와 수여자 간의 인간 백혈구 항원 (HLA) 부적합 정도와 직접 관련된다. 조단 (Jordan) 등은 비관련 비매칭 MLR (혼합 림프구 반응; 초기 HLA 타이핑 후 공

여자 선택을 미세 조정하기 위한 시험관내 분석) 동안 풍부하게 생산되는 전형적인 Th2 시토킨으로서 IL-13을 처음 확인하였다 (Jordan et al. J Immunol Methods; 2002;260:1). 동일한 집단은, 공여 T-세포에 의한 IL-13 생산이 비관련 공여 자 줄기세포 이식 후 급성 이식편 대 숙주병 (aGVHD)의 예측임을 후속적으로 보여주었다 (Jordan et al. Blood 2004; 103:717). 줄기세포 이식 후 중증의 등급 III aGVHD를 갖는 모든 환자는 그 공여자가 매우 큰 이식전 IL-13 반응을 나타냈고, 이는 IL-13 수준과 aGVHD 사이의 유의한 연관성을 입증하고 IL-13이 aGVHD 연관 병리학의 일부에 직접적인 원인일 수 있다는 가능성을 제기한다. 따라서, IL-13의 특이적 차단에 기초한 치료법은 줄기세포 이식후 aGVHD의 치료에 유용할 수 있다.

당뇨병성 신병증은 서구에서 말기 신장 질환의 주요 원인 중 하나이다. 타입 1 당뇨병으로 인한 신병증의 발병률은 감소하고 있지만, 타입 2 당뇨병은 현재 USA, 일본 및 유럽에서 신부전의 가장 일반적인 단일 병인이다. 또한, 상기 군의 환자는 심혈관 사건으로 인한 극히 높은 사망률 때문에 유지 투석시 예후가 매우 불량하다. 혈액학적, 대사적 및 구조적 변화가 상호연결되어 있음이 현재 점점 더 명백해지고, 상기 질병의 발병기전에서 역할을 하는 다양한 효소, 전사 인자 및 성장 인자가 확인되고 있다. 특히, TGF- β 는 신 비대의 발병 및 세포외 간질 성분의 축적에서 중요하고, 신장에서 콜라겐 형성을 매개하는데 있어서 중추적인 시토킨으로 여겨진다 (Cooper. Diabetologia 2001; 44:1957; Wolf. Eur J Clin Invest 2004; 34(12):785). 실험적 및 인간 당뇨병성 신병증에서, TGF-1 생물활성은 증가되고, 당뇨병 마우스에 TGF- β 1 항체를 투여하면 신 기능을 개선시키고 세포외 간질 축적을 감소시켰다. IL-13은 최근에 폐 섬유증의 트랜스제닉 마우스 모델에서 적어도 부분적으로 TGF- β 1의 생산 및 활성화와 콜라겐 침적을 조절함으로써 그의 효과를 매개하는 것으로 나타나서 (Lee et al. J. Exp. Med. 2001; 194:809; Zhu et al. J. Clin. Invest. 1999; 103:779), IL-13과 TGF- β 사이의 직접적 기능적 연관성을 확립한다. 따라서, 당뇨병 신장에서 TGF- β 1 활성을 조절하는데 있어서 IL-13에 대한 유사한 역할이 계획될 수 있고 IL-13 표적화된 개입이 잠재적으로 당뇨병성 신병증의 관리에서 역할을 할 수 있다.

섬유증 병태

폐 섬유증은 장애와 종종 사망을 일으키는 폐의 부적절하고 유해한 흉터형성이다. 상기 용어는 상이한 병인론, 병리학 및 치료에 대한 반응을 갖는 다양한 상이한 병태를 포함한다. 일부 경우에 섬유증의 원인이 확인된다. 원인은 (1) 흡입된 섬유증 촉진 (profibrosis) 물질, 예를 들어 석면 또는 실리콘, 또는 중금속 분진, (2) 그에 대해 환자가 섬유증을 유발하는 특이 면역학적 반응을 갖는 흡입된 유기 물질 (예를 들어 농부의 폐), (3) 약물, 예를 들어 니트로푸란토인, 아미오다론 및 메토크세이트, 및 (4) 전신 염증성 질환, 예를 들어 전신경화증 또는 류마티스성 관절염과의 연관을 포함한다.

그러나, 많은 경우에 원인 또는 근원적인 병태가 확인되지 않는다. 그러한 많은 환자는 특발성 폐 섬유증 (IPF)으로 진단된다. 이는 비교적 희귀한 병태이다 (유병률 20/100,000). 진단은 특정 방사선 및 병리학적 특징, 특히 CT 또는 폐 생검 상의 벌집 모양과 결합된 확인된 원인의 부재에 기초한다. 질환은 대체로 고령의 환자 (>50)에서 나타나고, 종종 사망을 유발하는 진행성 폐 손상의 끊임없는 과정이 이어지고, 평균 생존시간은 2-5년으로 말해진다. 또한, 환자는 수개월 또는 수년에 걸쳐 진행하는 가장 불쾌한 호흡곤란을 경험한다. 이는 초기에는 신체 활동을 제한하지만, 말기 상 (수개월 지속할 수 있음)에는 환자는 휴식시에도 숨이 차고 또한 산소 의존적으로 된다.

현재, 상기 질환에 대한 만족스러운 치료법이 없다. 현재의 치료는 일반적으로 코르티코스테로이드 및 면역억제제, 예를 들어 아자티오프린의 형태를 취한다. 그러나, 코르티코스테로이드는 많은 환자에게 무효할 수 있고 그의 부작용은 상황을 악화시킬 수 있다. 최근의 대규모 연구에서 개선된 생존율의 경향을 보인 인터페론 감마, 및 페르페니돈을 포함한 많은 잠재적인 치료법이 연구되고 있다.

IL-13 및 Th2 표현형과 연관된 시토킨이 조직 치유에서 섬유증의 과정에 관여된다는 증거가 존재한다 (Wynn TA, Nat. Rev. Immunol. 2004 4:583-594; Jakubzick et al, Am. J. Pathol. 2004 164(6): 1989-2001; Jakubzick et al, Immunol. Res. 2004 30(3):339-349; Jakubzick et al, J. Clin. Pathol. 2004 57:477-486). IL-13 및 IL-4는 다양한 섬유증 병태에 연관되었다. 주혈흡충 (Schistosoma)에 의해 유발된 간 섬유증이 IL-13 의존성인 것으로 나타나고, IL-13이 공피증의 발병기전에 관여된다는 제한된 증거가 존재한다 (Hasegawa et al, J. Rheumatol. 1997 24:328-332; Ricciieri et al, Clin. Rheumatol. 2003 22:102-106)

폐 섬유증 측면에서, 시험관내 연구에서는 IL-13이 섬유증유발 표현형을 촉진하는 것을 보여준다. 동물 연구에서는 인공적으로 유발된 섬유증 모델에서 상승된 수준의 IL-13 발현을 보여주고, 상기 섬유증은 IL-13의 제거에 의해 감소될 수 있다.

IL-13은 섬유증 촉진 표현형을 촉진한다. 세포 수준에서, IL-13이 섬유증을 촉진할 수 있는 몇가지 메커니즘이 존재한다. 이들 다양한 메커니즘의 시그널 경로 및 중요성은 잘 규정되지 않았다.

IL-13이 콜라겐의 생산을 촉진하고 그의 파괴를 차단하여, 섬유증 표현형을 촉진하도록 섬유모세포 상에 작용한다는 증거가 존재한다. 피부 섬유모세포는 IL-13 수용체를 갖고, 배양된 피부 섬유모세포를 IL-13에 노출시키면 콜라겐 생성을 상향조절시킨다 (Oriente et al, J. Pharmacol. Exp. Ther. 2000 292:988-994). IL-4는 또한 유사하지만 보다 일시적인 효과를 갖는다. 인간 폐 섬유모세포 세포주 (ICIG7)은 타입 II IL-4 수용체를 발현한다 (Jinnin et al, J. Biol. Chem 2004 279:41783-41791). 이들 세포를 IL-13에 노출시키면 다양한 염증 및 섬유증 촉진 매개체인 GM-CSF, G-CSF, VCAM 베타1 인테그린의 분비를 촉진한다 (Doucet et al, Int. Immunol. 1998 10(10):1421-1433).

IL-13은 EC 매트릭스의 파괴를 감소시키는 경향이 있는 피부 섬유모세포에 의한 IL-1a-유도된 기질 금속단백분해효소 1 및 3 단백질 생산을 억제한다 (Oriente et al, J. Pharmacol. Exp. Ther. 2000 292:988-994). IL-13은 금속단백분해효소 1 (TIMP-1)의 조직 억제제의 발현을 촉진하도록 천식 기도의 생검으로 얻은 인간 섬유모세포에 대해 TGF- β 와 상승적으로 작용한다. 세포의 간질의 파괴는 기질 금속단백분해효소에 의해 수행되고, 이는 TIMP-1에 의해 억제된다. 따라서, 상기 IL-13의 작용은 매트릭스 분해를 감소시키는 경향이 있을 것이다 (Zhou et al, Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2005 288:C435-C442).

트랜스제닉 마우스에서 IL-13의 과다발현은 상피화 섬유증, 상피 세포 비대, 배상세포 과다형성, 결정 침착 (산성 포유동물 키티나제), 기도 과다반응, 간질 섬유증, 타입 2 세포 비대 및 표면활성물질 축적을 일으킨다 (Zhu et al, J. Clin. Invest. 1999 103(6):779-788).

상이한 마우스주는 블레오마이신-유도된 폐 섬유증에 대한 상이한 감수성을 갖는다. 감수성인 C57B1/6J 마우스는 블레오마이신에 반응하여 IL-13, IL-13Ra 및 IL-4 (및 TGF β , TNFRa 및 IL1R)의 신속한 상향조절을 나타낸다. 감수성이 아닌 BALB/c 마우스는 IL-13의 상향조절을 나타내지 않는다.

벨페리오 (Belperio) 등 (Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 2002 27:419-427)은 마우스 블레오마이신 섬유증 모델에서 IL-13, IL-4 및 CC 케모카인 C10의 발현 및 역할을 연구하였다. IL-13 및 IL-4의 폐 조직 수준은 모두 블레오마이신에 반응하여 증가하였다. 폴리클로날 항-IL-13 항체를 사용한 IL-13의 사전 중화는 폐 히드록시프롤린 수준으로 평가할 때 블레오마이신에 반응한 폐 섬유증을 유의하게 감소시켰다. 동일한 모델에서 IL-4의 증가된 발현에도 불구하고, IL-4의 중화는 폐 섬유증에 대해 효과가 없었다.

BALB/c 마우스에서 FITC에 의해 유발된 급성 폐 섬유증의 다른 모델에서, IL-13의 부재 (낙아웃 (knockout) 상태) (IL-4는 아님)는 폐 섬유증에 대해 보호하였다. IL-13 낙아웃에서 IL-4를 낙아웃하여도 보호는 증가하지 않는다 (Kolodsick et al, J. Immunol. 2004 172:4068-4076). IL-13 부재의 보호 효과는 폐 내로의 세포 동원의 차이 때문이 아니고: 모든 낙아웃 및 BALB/c에서, 동원된 총 세포수는 유사하여, 초기 염증성 성분은 영향을 받지 않는 것으로 보인다. 호산구 동원은 BALB/c에 비해 IL-4 및 IL-13 낙아웃에서 더 낮지만, IL-4 -/-는 섬유증에 대해 보호되지 않았으므로 이는 섬유증에서의 차이를 설명할 수 없다. 놀랍게도, 아마도 IL10, MCP-1, 감마 인터페론, TGF-1에 대한 것을 포함하여 IL-13 +/- 와 -/- 사이에 시토킨 수준은 차이가 없었다. 또한, 동일한 수의 섬유모세포를 FITC 이후 상이한 동물의 폐로부터 분리하였지만, IL-13 -/- 마우스에서, 콜라겐 I의 생산이 감소된다. 이는 IL-13의 손실이 단순히 염증 반응을 예방하는 것이 아니라, 보다 특이적인 항-섬유증 역할을 갖는다는 것을 나타낸다. IL-13은 TGF-1을 통해 그의 섬유증 효과를 발휘할 수 있는 것으로 제안되었다 (Lee et al, J. Exp. Med. 2001 194:809-821). 그러나, 상기 FITC 모델에서 TGF-1 발현은 IL-13 낙아웃 마우스에서 감소하지 않았다.

인터루킨 4는 동일한 수용체를 통해 작용하므로 IL-13과 유사한 효과를 발휘하는 것으로 예상할 수 있다. IL-4는 블레오마이신 유도된 폐 섬유증의 마우스의 폐에서 유의하게 상향조절된다 (Gharaee-Kermani et al, Cytokine 2001 15:138-147). 그러나, IL-4를 과다발현하는 C57BL6/J 마우스에서 블레오마이신-유도 폐 섬유증, IL-4 낙아웃 및 야생형을 비교하면, 이즈비키 (Izbicki) 등 (Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol 2002 283(5):L1110-L1116)은 IL-4가 폐 섬유증에 관여된다는 증거를 찾지 못하였다. 섬유증은 IL-4 낙아웃에서 감소되지 않았고, IL-4 과다발현 마우스는 섬유증 수준이 증가하였다.

IL-13의 BAL 시토킨 수준은 다양한 형태의 폐 섬유증의 환자에서 유의하게 상승되지만, 상당한 변동이 있다. IL-13의 발현은 폐 섬유증의 환자로부터 얻은 폐포 대식세포에서 유의하게 상향조절된다.

가장 강한 임상적 증거는 미시건 대학교 (University of Michigan)의 연구에 있다. 자쿠브지크 (Jakubczik)와 공동연구자들은 폐 섬유증의 환자로부터 외과적 폐 생검에서 IL-13 및 IL-4와 그들의 수용체의 유전자 발현을 연구하였다. IL-13 유전자 발현은 정상 또는 다른 폐 섬유증 병태로부터의 폐보다 IPF에 걸린 폐로부터의 시료에서 현저하게 더 많다. IPF/UIP

환자로부터 배양한 섬유모세포는 정상 폐 또는 다른 형태의 폐 섬유증의 환자로부터의 생검에서 얻은 조직 및 섬유모세포에 비해 IL-13 및 IL-4 수용체의 발현 상승을 보인다. 특히, 아마도 질병 활성의 진원지인 섬유모세포 위치는 이들 수용체를 특히 강하게 염색한다 (Jakubzick et al, J. Immunol. 2003 171:2684-2693; Jakubzick et al, Am. J. Pathol. 2003 162:1475-1486; Jakubzick et al, Am. J. Pathol. 2004 164(6): 1989-2001; Jakubzick et al, Immunol. Res. 2004 30(3):339-349; Jakubzick et al, J. Clin. Pathol. 2004 57:477-486).

일반적으로 Th2 시토킨 및 특히 IL-13이 섬유증 촉진 표현형을 촉진한다는 우수한 시험관내 증거가 존재한다. 적어도 2개의 동물 모델에서, 화학-유도 섬유증이 IL-13의 제거 (유전자 녹아웃에서 또는 항-IL-13 항체에 의해)에 의해 감소될 수 있는 것으로 나타났다. 일부 증거는 폐 섬유증을 촉진하는데 있어서 IL-13이 IL-4보다 더 중요함을 나타낸다. 폐 섬유증에서 IL-13에 대한 임상적 증거는 IL-13 및 그의 수용체가 IPF의 환자의 폐에서 조절되지 않음을 제안한다.

다양한 섬유증 병태, 예를 들어 주혈흡충증-유도된 간 섬유증 및 다양한 형태의 폐 섬유증 (예를 들어 IPF [다른 곳에서 논의됨], 공피증)의 치료를 위한 IL-13에 기초한 치료법에 대한 중요한 역할을 제안하는 데이터가 많아지고 있다.

IL-4 및 IL-13이 억제된 실험은 몇몇 모델에서 IL-13을 섬유증의 주요 효과기 시토킨으로서 독립적으로 확인하였다 (Chiaramonte et al J. Clin. Invest. 1999; 104: 777-785; Blease et al. J. Immunol. 2001; 166:5219; Kumar et al. Clin. Exp. Allergy 2002; 32:1104). 주혈흡충증에서, 계란-유도된 염증 반응은 IL-13 차단에 의해 영향을 받지 않았지만, IL-4의 계속적이고 감소되지 않은 생산에도 불구하고 콜라겐 침착은 만성적으로 감염된 동물에서 85%를 초과하여 감소하였다 (Chiaramonte et al J. Clin. Invest. 1999; 104: 777; Chiaramonte et al Hepatology 2001: 34:273).

hIL-13에 대한 아미노산 서열을 서열 9로서 기재한다. (이는 성숙 단백질 서열이고, 즉, 시그널 서열이 존재하지 않는다). hIL-13을 코딩하는 cDNA를 서열 10에 기재한다. (이는 성숙 단백질 서열에 대한 DNA 서열이고, 즉, 시그널 서열이 존재하지 않는다).

본원에 개시된 모든 특허 및 문헌 (본원이 우선권을 주장하는 임의의 특허 출원 포함)은 그 전부가 본원에 참고로 명백하게 포함된다.

최근에 천식 치료를 위해 IL-13에 대한 면역 반응을 유발시키는 백신이 설명되었다 (WO 02/070711). 환경 알레르겐에 대한 피부 감각에서 IL-13의 역할이 또한 최근에 설명되었다 (Herrick et al., The Journal of Immunology, 2003, 170:2488-2495).

본 발명은 특히 6A1로 칭하는 항체를 제공한다. 아래에서 증명된 바와 같이, 6A1의 hIL-13과의 결합은 서열 9의 위치 107에서 아르기닌의 존재에 의존적인 것으로 보인다. 서열 9의 위치 107에서 아르기닌은 hIL-13/hIL-13R 상호작용에 관여되는 중요한 잔기인 것으로 보고되었다. 문헌 [Thompson JP and Debinski W (1999) J. Biol. Chem, vol.24, No:42 pp29944-29950]에서는 "hIL13 α-나선 A의 위치 13 및 16에서 글루탐산, 나선 C의 위치 66 및 69에서 아르기닌 및 세린, 및 나선 D의 위치 109에서 아르기닌이 그들의 특정 돌연변이가 기능 현상의 손실 및(또는) 획득을 일으켰으므로 생물학적 신호전달을 유도하는데 있어서 중요한 것으로 밝혀졌다" (요약 및 전문 참조)고 언급하였다. 상기 문헌의 위치 109에서 아르기닌은 상기 문헌의 저자가 사용한 것과 본 발명자들이 사용한 넘버링 방법이 상이하기 때문에 본 명세서의 서열 9의 107과 동등하다. 따라서, 6A1의 hIL-13과의 결합은 hIL-13/hIL-13R 상호작용에서 및 따라서 IL-13 경로의 생물학적 신호전달에서 중요한 것으로 이전에 확인된 hIL-13 상의 잔기 중 하나를 포함한다.

<발명의 개요>

따라서 본 발명은 hIL-13에 특이적으로 결합하고 hIL-13의 활성을 중화시키는 치료 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 제공한다. 예를 들어 하기 표 A를 참조한다.

본 발명의 항체 및 그의 항원 결합 단편과 관련하여 본 명세서 전체에서 사용될 때 용어 "특이적으로 결합하는"은 항체가 다른 인간 단백질, 특히 인간 IL-4에는 결합하지 않거나 무의미하게 결합하면서 hIL-13에 결합하는 것을 의미한다. 그러나, 상기 용어는 본 발명의 항체가 사이노몰거스 IL-13과 교차반응성일 수 있다는 사실을 배제하지 않는다.

본 발명의 다른 측면에서, hIL-13에 특이적으로 결합하고 hIL-13과 hIL-13R 사이의 상호작용을 조절하는 (예를 들어 억제하거나 차단하는) 치료 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 제공된다. 상기 억제는 경쟁적 억제를 포함하지만 이로 제한되지 않는다. 특정 실시태양에서, 본 발명의 항체는 적어도 hIL-13과 hIL-13R 사이의 상호작용을 억제하지만, 또한 hIL-13과 hIL-13R 사이의 상호작용을 차단하여 hIL-13/hIL-13R 신호전달 경로를 분리시킬 수 있다.

다른 측면에서, hIL-13에 특이적으로 결합하고 서열 3에 기재된 서열을 갖는 CDRH3을 포함하는 치료 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 제공된다.

본 발명의 다른 측면에서, hIL-13에 특이적으로 결합하고 서열 3에 기재된 서열의 변이체인 CDRH3을 포함하는 치료 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 제공되고, 여기서 상기 변이체의 CDRH3 내의 하나 또는 2개의 잔기는 서열 3에서 대응하는 위치의 잔기와 상이하다.

본 발명의 다른 측면에서, hIL-13에 특이적으로 결합하고 다음 CDR을 포함하는 치료 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 제공한다:

CDRH1: 서열 1

CDRH2: 서열 2

CDRH3: 서열 3

CDRL1: 서열 4

CDRL2: 서열 5

CDRL3: 서열 6

명세서 전반에 걸쳐, 항체 서열 내의 아미노산 잔기는 카바트 (Kabat) 방식에 따라 넘버링한다. 유사하게, 용어 "CDR", "CDRL1", "CDRL2", "CDRL3", "CDRH1", "CDRH2", "CDRH3"은 문헌 [Kabat et al; Sequences of Proteins of Immunological Interest NIH, 1987]에 기재된 카바트 넘버링 시스템을 따른다. "CDRH1"은 CDRH1의 카바트 정의 (잔기 31-35B), 및 또한 카바트 26-32를 포함하는 코티아 (Chothia)의 CDRH1 정의 (Chothia et al (1989); Conformations of immunoglobulin hypervariable regions; Nature 342, p877-883)를 모두 포함하는 서열의 범위로 의미된다. 따라서, 다음은 본 발명에 따른 CDR을 규정한다:

CDR: 잔기

CDRH1: 26-35B

CDRH2: 50-65

CDRH3: 95-102

CDRL1: 24-34

CDRL2: 50-56

CDRL3: 89-97

본 발명의 다른 측면에서, 서열 7에 기재된 서열을 갖는 VH 도메인 및 서열 8에 기재된 서열을 갖는 VL 도메인을 포함하는 치료 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 제공된다.

본 발명의 다른 측면에서, 서열 7 또는 11, 12, 13, 14를 포함하는 (또는 본질적으로 그로 이루어지거나 그로 이루어지는) 항체의 단리된 VH 도메인이 제공된다.

본 발명의 다른 측면에서, 서열 7 또는 11, 12, 13, 14로 이루어진 군 중에서 선택된 VH 도메인을 포함하는 치료 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 제공된다.

본 발명의 다른 측면에서, hIL-13에 대한 서열 3의 CDRH3을 포함하는 치료 항체의 결합을 경쟁적으로 억제하는 치료 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 제공된다.

본 발명의 다른 측면에서, hIL-13에 대한 서열 1, 2, 3, 4, 5 및 6의 CDR을 포함하는 치료 항체의 결합을 경쟁적으로 억제하는 치료 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 제공된다.

본 발명의 다른 측면에서, hIL-13에 대한 서열 18의 중쇄 및 서열 22의 경쇄를 포함하는 치료 항체의 결합을 경쟁적으로 억제하는 치료 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 제공된다.

본 발명에 따라, 서열 11, 12, 13, 14로 이루어진 군 중에서 선택된 VH 도메인 및 서열 15, 16으로 이루어진 군 중에서 선택된 VL 도메인을 포함하는 인간화 치료 항체가 제공된다.

본 발명의 다른 측면에서, 환자에게 치료 유효량의 본원에 기재된 치료 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 투여하는 단계를 포함하는, hIL-13과 hIL-13R 사이의 상호작용의 조절에 반응성인 질병 또는 질환 (예를 들어 천식, COPD, 알레르기성 비염, 아토피성 피부염)에 걸린 인간 환자를 치료하는 방법이 제공된다.

본 발명의 항체의 hIL-13과 hIL-13R 사이의 상호작용의 조절에 반응성인 질병 또는 질환 치료용 의약의 제조에 있어서의 용도가 또한 제공된다.

본 발명의 다른 측면에서, 인간 IL-13에 특이적으로 결합하는 치료 항체가 제공되고, 여기서 항체는 서열 9의 잔기 97 내지 108 사이에서 인간 IL-13에 특이적으로 결합한다. 하기 논의되는 결과를 기초로 당업계의 숙련인에게 명백한 바와 같이 "서열 9의 잔기 97 내지 108 사이"는 위치 97 및 108을 포함한다.

본 발명의 다른 측면에서, 인간 IL-13에 대한 서열 3의 CDRH3을 갖는 치료 항체 (예를 들어, 서열 18의 중쇄 및 서열 22의 경쇄를 포함하는 치료 항체)의 결합을 경쟁적으로 억제하는 치료 항체가 제공되고, 상기 경쟁 항체는 서열 9의 잔기 97 내지 108 사이에서 인간 IL-13에 특이적으로 결합한다.

본 발명의 다른 측면에서, 서열 9의 잔기 103 내지 107 사이에서 인간 IL-13에 특이적으로 결합하고 hIL-13과 hIL-13R 사이의 상호작용을 조절하는 (예를 들어 억제하거나 차단하는) 치료 항체가 제공된다.

본 발명의 한 실시태양에서, 서열 9의 잔기 103 내지 107 사이에서 hIL-13에 특이적으로 결합하고 hIL-13과 hIL-13R 사이의 상호작용을 조절하는 (예를 들어 억제하거나 차단하는) 복수의 모노클로날 치료 항체 (일반적으로 인간 또는 인간화 항체) 및 제약학적 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물이 제공된다.

본 발명의 다른 실시태양에서, 무혈청 배양 배지 내에서 제1 및 제2 벡터를 포함하는 재조합 숙주세포 (상기 제1 벡터는 항체의 중쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하고, 상기 제2 벡터는 항체의 경쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다)를 배양하는 단계를 포함하는, 서열 9의 잔기 103 내지 107 사이에서 hIL-13에 특이적으로 결합하고 hIL-13과 hIL-13R 사이의 상호작용을 조절하는 (예를 들어 억제하거나 차단하는) 치료 항체를 생산하는 방법이 제공된다. 하기 결과를 기초로 당업계의 숙련인에게 명백한 바와 같이, "서열 9의 잔기 103 내지 107 사이"는 위치 103 및 107을 포함한다.

본 발명의 다른 실시태양에서, 무혈청 배양 배지 내에서 제1 및 제2 벡터를 포함하는 재조합 숙주세포 (상기 제1 벡터는 항체의 중쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하고, 상기 제2 벡터는 항체의 경쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다)를 배양하는 단계를 포함하는, 서열 9의 잔기 97 내지 108 사이에서 hIL-13에 특이적으로 결합하고 hIL-13과 hIL-13R 사이의 상호작용을 조절하는 (예를 들어 억제하거나 차단하는) 치료 항체를 생산하는 방법이 제공된다.

본 발명의 다른 실시태양에서, 서열 9의 잔기 107과 상호작용하는, hIL-13에 결합하고 hIL-13과 hIL-13R 사이의 상호작용을 조절하는 (예를 들어 억제하거나 차단하는) 무손상 치료 항체가 제공된다.

본 발명의 다른 실시태양에서, hIL-13에 결합하고 hIL-13과 hIL-13R 사이의 상호작용을 조절하는 (예를 들어 억제하거나 차단하는) 무손상 치료 항체가 제공되고, 여기서 상기 치료 항체와 hIL-13 사이의 결합은 서열 9의 위치 107에서의 아르기닌 잔기의 존재에 의존적이다 (또는 그에 명확하게 상호관련된다).

다른 실시태양에서, hIL-13에 특이적으로 결합하고 hIL-13과 hIL-13R 사이의 상호작용을 조절하고 (예를 들어 억제하거나 차단하고) 해리 상수 k_{off} 가 1.4×10^{-4} 내지 $8.22 \times 10^{-5} s^{-1}$ 범위 (예를 들어 Biacore™에 의해 측정)인 치료 항체가 제공된다. 상기 항체는 서열 3의 CDRH3 또는 그의 변이체를 포함할 수 있고, 서열 3 또는 그의 변이체 외에 서열 1, 2, 4, 5 및 6을 추가로 포함할 수 있다.

다른 실시태양에서, hIL-13에 특이적으로 결합하고 hIL-13과 hIL-13R 사이의 상호작용을 조절하는 (예를 들어 억제하거나 차단하는) 항체가 제공되고, 상기 항체는 서열 3의 CDRH3을 포함하고, 임의로 각각의 서열 1의 CDRH1, 서열 2의 CDRH2, 서열 4의 CDRL1, 서열 5의 CDRL2 및 서열 6의 CDRL3을 추가로 포함하고, 상기 항체는 또한 사이노몰거스 IL-13 (cIL-13)과 교차반응성이다.

발명의 상세한 설명

1. 항체 구조체

1.1 무손상 항체

무손상 항체는 적어도 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄를 포함하는 이종다량체 당단백질을 포함한다. IgM을 제외하고, 무손상 항체는 대체로 2개의 동일한 경쇄 (L) 및 2개의 동일한 중쇄 (H)로 이루어진 약 150 Kda의 이종사량체 당단백질이다. 일반적으로, 각각의 경쇄는 하나의 공유 디설피드 결합에 의해 중쇄에 연결되는 한편, 상이한 면역글로불린 이소형의 중쇄 사이의 디설피드 연결의 수는 변한다. 각각의 중쇄 및 경쇄는 또한 사슬내 디설피드 다리를 갖는다. 각각의 중쇄는 한 말단에 가변 도메인 (VH)에 이어 많은 불변 도메인을 갖는다. 각각의 경쇄는 가변 도메인 (VL) 및 그의 다른 말단에서 불변 도메인을 갖고; 경쇄의 불변 도메인은 중쇄의 제1 불변 도메인과 정렬되고, 경쇄 가변 도메인은 중쇄의 가변 도메인과 정렬된다. 대부분의 척추동물 종으로부터의 항체의 경쇄는 불변 도메인의 아미노산 서열을 기초로 카파 및 람다로 불리는 2가지 종류 중 하나로 분류될 수 있다. 그들의 중쇄의 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라, 인간 항체는 5가지 상이한 클래스인 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM으로 분류될 수 있다. IgG 및 IgA는 서브클래스 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4; 및 IgA1 및 IgA2로 추가로 구분될 수 있다. 적어도 IgG2a, IgG2b를 갖는 마우스 및 래트에서 중 변이체가 존재한다. 항체의 가변 도메인은 상보성 결정 영역 (CDR)으로 불리는 특정 변동성을 나타내는 특정 영역을 갖는 항체 상에 결합 특이성을 부여한다. 가변 영역의 보다 보존된 부분은 프레임워크 영역 (FR)으로 불린다. 무손상 중쇄 및 경쇄 각각의 가변 도메인은 3개의 CDR에 의해 연결된 4개의 FR을 포함한다. 각각의 사슬 내의 CDR은 FR 영역에 의해 근접하여 함께 유지되고, 다른 사슬로부터의 CDR과 함께 항체의 항원 결합 부위의 형성에 기여한다. 불변 도메인은 항원에 대한 항체의 결합에 직접 관여되지 않지만, 다양한 효과기 기능, 예를 들어 항체 의존성 세포 매개 세포독성 (ADCC) 참여, Fcγ 수용체에 대한 결합을 통한 포식작용, 신생 Fc 수용체 (FcRn)를 통한 반감기/소실율 및 보체 캐스케이드의 C1q 성분을 통한 보체 의존성 세포독성을 나타낸다.

따라서, 한 실시태양에서, 본 발명자들은 hIL-13과 hIL-13R 사이의 상호작용을 조절하는 (예를 들어 억제하거나 차단하는), hIL-13에 특이적으로 결합하는 무손상 치료 항체를 제공한다. 무손상 치료 항체는 상기 설명된 임의의 이소형 또는 그의 서브클래스의 불변 도메인을 포함할 수 있다. 한 실시태양에서, 항체는 IgG 이소형, 특히 IgG1의 것이다. 항체는 래트, 마우스, 토끼, 영장류 또는 인간 유래의 것일 수 있다. 한 일반적인 실시태양에서, 항체는 영장류 (예를 들어 사이노몰거스, 구세계 원숭이 또는 대형 유인원, 예를 들어 WO99/55369, WO93/02108 참조) 또는 인간 유래의 것이다.

다른 실시태양에서, 서열 3의 CDRH3을 포함하는 단리된 무손상 치료 항체가 제공된다. 다른 실시태양에서, 서열 1, 2, 3, 4, 5 및 6의 CDR을 갖는 가변 영역을 포함하는 무손상 치료 항체가 제공된다.

다른 실시태양에서, 서열 7의 서열을 갖는 VH 도메인 및 서열 8의 서열을 갖는 VL 도메인을 포함하는 단리된 쥐 무손상 치료 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 제공된다.

1.1.2 인간 항체

인간 항체는 당업계의 숙련인에게 공지된 많은 방법에 의해 생산할 수 있다. 인간 항체는 인간 골수종 또는 마우스-인간 이종골수종 세포주를 사용한 하이브리도마 방법에 의해 제조할 수 있다 (Kozbor J. Immunol 133, 3001, (1984) 및 Brodeur, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp51-63 (Marcel Dekker Inc, 1987) 참

조). 대안적인 방법은 파지 라이브러리 또는 트랜스제닉 마우스의 사용을 포함하고, 이들 둘 모두는 인간 V 영역 레퍼토리를 이용한다 (Winter G, (1994), Annu. Rev. Immunol 12,433-455, Green LL (1999), J. Immunol. methods 231, 11-23 참조).

몇몇 트랜스제닉 마우스 주가 현재 이용가능하고, 여기서 그들의 마우스 면역글로불린 로커스는 인간 면역글로불린 유전자 절편으로 교체된다 (Tomizuka K, (2000) PNAS 97,722-727; Fishwild D.M (1996) Nature Biotechnol. 14, 845-851, Mendez MJ, 1997, Nature Genetics, 15, 146-156 참조). 항원 접종시, 상기 마우스는 그로부터 관심있는 항체가 선택될 수 있는 인간 항체의 레퍼토리를 생산할 수 있다. 인간 림프구가 방사선조사된 마우스 내로 이식되는 TrimerTM 시스템 (Eren R et al, (1998) Immunology 93:154-161 참조), 인간 (또는 다른 종) 림프구가 대량으로 모인 시험관내 항체 생성 절차에 이어 디컨벌레이션 (deconvulation), 제한 희석 및 선택 절차를 효과적으로 통과하는 선택된 림프구 항체 (Selected Lymphocyte Antibody) 시스템 (SLAM, Babcook et al, PNAS (1996) 93:7843-7848 참조) 및 Xenomouse IITM (압제닉스 인크 (Abgenix Inc))이 특히 중요하다. 대안적인 방법은 MorphodomaTM 기술을 이용하여 모르포테크 인크 (Morphotek Inc)로부터 이용가능하다.

인간 항체 (및 그의 단편)를 제조하기 위해 파지 디스플레이 기술이 사용될 수 있다 (McCafferty; Nature, 348, 552-553 (1990) 및 Griffiths AD et al (1994) EMBO 13:3245-3260 참조). 상기 기술에 따라, 항체 V 도메인 유전자는 필라멘트 형 박테리오파지, 예를 들어 M13 또는 fd의 단백질 유전자의 메이저 또는 마이너 코트 내로 인 프레임으로 클로닝되고, (보통 헬퍼 파지의 도움으로) 파지 입자의 표면 상에서 기능적 항체 단편으로서 제시된다. 항체의 기능적 특징을 기초로 하여 선택하면 상기 특징을 나타내는 항체를 코딩하는 유전자가 선택된다. 파지 디스플레이 기술이 상기한 질병 또는 질환에 걸린 개인으로부터 취하거나 별법으로 비면역화 인간 공여자로부터 취한 인간 B 세포로부터 제조된 라이브러리로부터 항원 특이적 항체를 선택하기 위해 사용될 수 있다 (Marks; J. Mol. Bio. 222,581-597, 1991 참조). Fc 도메인을 포함하는 무손상 인간 항체가 요망되는 경우, 파지 디스플레이된 유도된 단편을, 목적하는 불변 도메인을 포함하고 안정한 발현 세포주를 확립하는 포유동물 발현 벡터 내로 재클로닝하는 것이 필요하다.

친화도 포화 (Marks; Bio/technol 10,779-783 (1992)) 기술이 결합 친화도를 개선시키기 위해 사용될 수 있고, 여기서 일차 인간 항체의 친화도는 H 및 L 사슬 V 영역을 자연 발생 변이체로 순차적으로 교체하고 개선된 결합 친화도를 기초로 선택함으로써 개선된다. 상기 기술의 변형, 예를 들어 "에피토프 임프린팅 (imprinting)"이 또한 현재 이용가능하다 (WO 93/06213 참조). 또한 문헌 [Waterhouse; Nucl. Acids Res 21, 2265-2266 (1993)]을 참조한다.

따라서, 다른 실시태양에서, hIL-13에 특이적으로 결합하고 hIL-13과 hIL-13R 사이의 상호작용을 조절하는 (예를 들어 억제하거나 차단하는) 단리된 인간 무손상 치료 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 제공된다.

다른 측면에서, hIL-13에 특이적으로 결합하고 hIL-13과 hIL-13R 사이의 상호작용을 조절하는 (예를 들어 억제하거나 차단하는), 서열 3의 CDRH3을 포함하는 단리된 인간 무손상 치료 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 제공된다. 다른 측면에서, 상기 정의한 바와 같이 서열 1, 2, 3, 4, 5 및 6의 CDR을 갖는 가변 영역을 포함하는 단리된 인간 무손상 치료 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 제공된다.

1.2 키메릭 및 인간화 항체

인간 질병 또는 질환의 치료에서 무손상 비인간 항체의 사용은 현재 잘 확립된 면역원성의 문제에 대한 가능성을 갖고, 즉, 환자의 면역계가 비인간 무손상 항체를 비-자가인 것으로 인식하여 중화 반응에 착수할 수 있다. 이는 인간 환자에게 비인간 항체의 다중 투여시에 특히 분명하다. 이들 문제를 극복하기 위해 수년에 걸쳐 다양한 기술이 개발되었고, 일반적으로 무손상 항체 내에서 비인간 아미노산 서열의 조성을 감소시키면서 면역화 동물, 예를 들어 마우스, 래트 또는 토끼로부터 비인간 항체를 얻는데 있어서 상대적인 용이함을 얻는 것을 포함한다. 이를 달성하기 위해 대체로 2가지 방법이 이용되었다. 첫번째 방법은 일반적으로 인간 불변 도메인에 융합된 비인간 (예를 들어 설치류, 예를 들어 마우스) 가변 도메인을 포함하는 키메릭 항체이다. 항체의 항원 결합 부위는 가변 영역 내에 위치하기 때문에, 키메릭 항체는 항원에 대한 그의 결합 친화도를 보유하지만, 인간 불변 도메인의 효과기 기능을 획득하여 상기 설명된 바와 같은 효과기 기능을 수행할 수 있다. 키메릭 항체는 대개 재조합 DNA 방법을 이용하여 생산된다. 항체를 코딩하는 DNA (예를 들어 cDNA)는 통상적인 절차를 이용하여 (예를 들어 본 발명의 항체의 H 및 L 사슬을 코딩하는 유전자, 예를 들어 상기 설명된 서열 1, 2, 3, 4, 5 및 6을 코딩하는 DNA에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용함으로써) 단리되고 서열분석된다. 하이브리도마 세포가 그러한 DNA의 전형적인 원료로서 역할을 한다. 단리되면, DNA는 발현 벡터 내로 배치되고, 이어서 그렇지 않으면 항체의 합성을 얻기 위해 면역글로불린 단백질을 생산하지 않는 숙주세포, 예를 들어 이. 콜라이, COS 세포, CHO 세포 또는 골수종 세포 내로 형질감염된다. DNA는 인간 L 및 H 사슬에 대한 코딩 서열을 대응하는 비인간 (예를 들어 쥐) H 및 L 불변 도메인으로 치환함으로써 변형될 수 있다 (예를 들어 Morrison; PNAS 81, 6851 (1984) 참조).

두번째 방법은 가변 영역을 인간화함으로써 항체의 비인간 함량이 감소된 인간화 항체의 생성을 포함한다. 인간화를 위한 2가지 기술이 많이 이용되고 있다. 첫번째 기술은 CDR 그래프팅 (grafting)에 의한 인간화이다. CDR은 항체의 N-말단에 근접한 루프를 형성하고, 여기서 이들은 프레임워크 영역에 의해 제공된 스캐폴드 (scaffold) 내에 존재하는 표면을 형성한다. 항체의 항원 결합 특이성은 토폴로그래피 및 그의 CDR 표면의 화학 특성에 의해 주로 규정된다. 이들 특징은 다시 개별 CDR의 형상에 의해, CDR의 상대적인 배치에 의해, 및 CDR을 포함하는 잔기의 측쇄 특성과 배치에 의해 결정된다. 면역원성의 큰 감소는 비인간 (예를 들어 쥐) 항체 ("공여" 항체)의 CDR만을 인간 프레임워크 ("수용 프레임워크") 및 불변 도메인 상에 그래프팅함으로써 달성할 수 있다 (Jones et al (1986) Nature 321, 522-525 및 Verhoeyen M et al (1988) Science 239, 1534-1536 참조). 그러나, CDR 그래프팅 자체는 항원-결합 특성을 완전히 보유시킬 수 없고, 유의한 항원 결합 친화도가 회복되어야 하는 경우 공여 항체의 일부 프레임워크 잔기 (때때로 "복귀 돌연변이 (backmutation)"로서 칭함)가 인간화 분자 내에 보존될 필요가 있음이 종종 발견된다 (Queen C et al (1989) PNAS 86, 10,029-10,033, Co, M et al (1991) Nature 351, 501-502 참조). 이 경우에, 비인간 공여 항체에 가장 큰 서열 상동성을 보이는 인간 V 영역이 프레임워크 (FR)를 제공하기 위해 데이터베이스로부터 선택된다. 인간 FR의 선택은 인간 컨센서스 또는 개개의 인간 항체로부터 이루어질 수 있다. 필요한 경우, CDR 형상을 보존하기 위해 공여 항체로부터의 핵심 잔기가 인간 수용 프레임워크 내로 치환된다. 그러한 구조상 중요한 잔기를 확인하는 것을 돕기 위해 항체의 컴퓨터 모델링이 사용될 수 있다 (WO99/48523 참조).

별법으로, 인간화는 "베니어링 (veneering)" 과정에 의해 달성될 수 있다. 독특한 인간 및 쥐 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 통계학적으로 분석하면, 노출된 잔기의 정확한 패턴은 인간 및 쥐 항체에서 상이하고 대부분의 개별 표면 위치가 적은 수의 상이한 잔기를 크게 선호하는 것으로 밝혀졌다 (Padlan E.A. et al; (1991) Mol. Immunol. 28, 489-498 및 Pedersen J.T. et al (1994) J. Mol. Biol. 235; 959-973 참조). 따라서, 인간 항체 내에서 보통 발견되는 것과 상이한 그의 프레임워크 영역 내의 노출된 잔기를 교체함으로써 비인간 Fv의 면역원성을 감소시키는 것이 가능하다. 단백질 항원성은 표면 접근성과 상호관련될 수 있으므로, 표면 잔기의 교체는 마우스 가변 영역을 인간 면역계에 "보이지 않게" 하기에 충분할 수 있다 (또한 Mark G. E. et al (1994) in Handbook of Experimental Pharmacology vol.113: The pharmacology of monoclonal Antibodies, Springer-Verlag, pp105-134 참조). 상기 인간화 과정은 항체의 표면만 변경되고 지지 잔기는 변하지 않고 남기 때문에 "베니어링"으로 칭한다.

따라서, 본 발명의 다른 실시태양에서, hIL-13에 특이적으로 결합하고 hIL-13과 hIL-13R 사이의 상호작용을 조절하는 (예를 들어 억제하거나 차단하는), 인간 불변 도메인 (IgG 이소형, 예를 들어 IgG1의 것일 수 있는)에 융합된 비인간 (예를 들어 설치류) 가변 도메인을 포함하는 키메라 치료 항체가 제공된다.

다른 실시태양에서, hIL-13에 특이적으로 결합하고 서열 3의 CDRH3을 추가로 포함하는, 비인간 (예를 들어 설치류) 가변 영역 및 인간 불변 도메인 (IgG 이소형, 예를 들어 IgG1의 것일 수 있음)을 포함하는 키메라 치료 항체가 제공된다. 상기 항체는 IgG 이소형, 예를 들어 IgG1의 인간 불변 영역을 추가로 포함할 수 있다.

다른 실시태양에서, hIL-13에 특이적으로 결합하고 서열 1, 2, 3, 4, 5 및 6의 CDR을 갖는, 비인간 (예를 들어 설치류) 가변 영역 및 인간 불변 영역 (IgG 이소형, 예를 들어 IgG1의 것일 수 있음)을 포함하는 키메라 치료 항체가 제공된다.

다른 실시태양에서, hIL-13에 특이적으로 결합하고 hIL-13과 hIL-13R 사이의 상호작용을 조절하는 (예를 들어 억제하거나 차단하는), 서열 7의 VH 도메인과 서열 8의 VL 도메인 및 IgG 이소형, 예를 들어 IgG1의 인간 불변 영역을 포함하는 키메라 치료 항체가 제공된다.

다른 실시태양에서, hIL-13에 특이적으로 결합하고 hIL-13과 hIL-13R 사이의 상호작용을 조절하는 (예를 들어 억제하거나 차단하는) 인간화 치료 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 제공된다.

다른 실시태양에서, hIL-13에 특이적으로 결합하고 서열 3의 CDRH3을 포함하는 인간화 치료 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 제공된다. 상기 항체는 IgG 이소형, 예를 들어 IgG1의 인간 불변 영역을 포함할 수 있다.

다른 실시태양에서, hIL-13에 특이적으로 결합하고 서열 1, 2, 3, 4, 5 및 6의 CDR을 포함하는 인간화 치료 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 제공된다. 상기 항체는 IgG 이소형, 예를 들어 IgG1의 인간 불변 영역을 포함할 수 있다.

본 발명에 따르면, 서열 11, 12, 13, 14로 이루어진 군 중에서 선택된 VH 도메인 및 서열 15, 16으로 이루어진 군 중에서 선택된 VL 도메인을 포함하는 인간화 치료 항체가 제공된다. 상기 항체는 IgG 이소형, 예를 들어 IgG1의 인간 불변 영역을 포함할 수 있다.

다른 실시태양에서, 서열 11의 VH 도메인 및 서열 15의 VL 도메인을 포함하는 인간화 치료 항체가 제공된다.

다른 실시태양에서, 서열 12의 VH 도메인 및 서열 15의 VL 도메인을 포함하는 인간화 치료 항체가 제공된다.

다른 실시태양에서, 서열 13의 VH 도메인 및 서열 15의 VL 도메인을 포함하는 인간화 치료 항체가 제공된다.

다른 실시태양에서, 서열 14의 VH 도메인 및 서열 15의 VL 도메인을 포함하는 인간화 치료 항체가 제공된다.

다른 실시태양에서, 서열 11의 VH 도메인 및 서열 16의 VL 도메인을 포함하는 인간화 치료 항체가 제공된다.

다른 실시태양에서, 서열 12의 VH 도메인 및 서열 16의 VL 도메인을 포함하는 인간화 치료 항체가 제공된다.

다른 실시태양에서, 서열 13의 VH 도메인 및 서열 16의 VL 도메인을 포함하는 인간화 치료 항체가 제공된다.

다른 실시태양에서, 서열 14의 VH 도메인 및 서열 16의 VL 도메인을 포함하는 인간화 치료 항체가 제공된다.

본 발명의 다른 실시태양에서, hIL-13에 특이적으로 결합하는 인간화 치료 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 제공되고, 여기서 상기 항체 또는 그의 단편은 임의로 서열 1, 2, 4, 5 및 6의 CDR을 추가로 포함하는 CDRH3 (서열 3)을 포함하고, 여기서 인간 수용 중쇄 프레임워크 영역의 19, 38, 73 및 81로 이루어진 군 중에서 선택된 잔기와 인간 수용 경쇄 프레임워크의 위치 85의 잔기는 CDRH3이 유래되는 공여 항체 프레임워크에서 발견되는 대응하는 잔기로 치환된다.

용어 "유래된"은 물질에 대한 물리적인 기원이라는 의미에서 원료를 정의할 뿐만 아니라 물질과 구조적으로 동일하지만 (일차 아미노산 서열 면에서) 기준 원료로부터 기원하지 않는 물질을 정의하도록 의도됨이 당업계의 숙련인에게 명백할 것이다. 따라서, "CDRH3이 유래되는 공여 항체에서 발견되는 잔기"는 반드시 공여 항체로부터 정제될 필요는 없다.

다른 실시태양에서, hIL-13에 특이적으로 결합하는 인간화 치료 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 제공되고, 여기서 상기 항체 또는 그의 단편은 임의로 서열 1, 2, 4, 5 및 6의 CDR을 추가로 포함하는 서열 3의 CDRH3을 포함하고, 여기서 인간 중쇄 프레임워크는 하나 이상의 (예를 들어 모든) 다음 잔기 (또는 그의 보존 치환체)를 포함하고:

위치	잔기
38	I
19	R
73	T
81	R

인간 경쇄는 다음 잔기를 포함한다.

위치	잔기
85	V

특정 아미노산 치환이 "보존적"인 것으로 간주되는 것은 당업계에 잘 인정되고 있다. 아미노산은 공통적인 측쇄 특성을 기준으로 집단으로 나누어지고, 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 결합 친화도를 모두 또는 실질적으로 모두 유지하는 집단 내 치환이 보존적 치환으로 간주된다 (하기 표 참조):

측쇄	멤버
친수성	met, ala, val, leu, ile
중성 친수성	cys, ser, thr
산성	asp, glu
염기성	asn, gln, his, lys, arg
사슬 배향에 영향을 미치는 잔기	gly, pro
방향성	trp, tyr, phe

본 발명에 따르면, 서열 18, 19, 20, 21로 이루어진 군 중에서 선택된 중쇄 및 서열 22, 23으로 이루어진 군 중에서 선택된 경쇄를 포함하는 인간화 치료 항체가 제공된다.

본 발명의 한 실시태양에서, 서열 18의 중쇄 및 서열 22의 경쇄를 포함하는, hIL-13에 특이적으로 결합하는 인간화 치료 항체가 제공된다.

본 발명의 한 실시태양에서, 서열 19의 중쇄 및 서열 22의 경쇄를 포함하는, hIL-13에 특이적으로 결합하는 인간화 치료 항체가 제공된다.

본 발명의 한 실시태양에서, 서열 20의 중쇄 및 서열 22의 경쇄를 포함하는, hIL-13에 특이적으로 결합하는 인간화 치료 항체가 제공된다.

본 발명의 한 실시태양에서, 서열 21의 중쇄 및 서열 22의 경쇄를 포함하는, hIL-13에 특이적으로 결합하는 인간화 치료 항체가 제공된다.

본 발명의 한 실시태양에서, 서열 18의 중쇄 및 서열 23의 경쇄를 포함하는, hIL-13에 특이적으로 결합하는 인간화 치료 항체가 제공된다.

본 발명의 한 실시태양에서, 서열 19의 중쇄 및 서열 23의 경쇄를 포함하는, hIL-13에 특이적으로 결합하는 인간화 치료 항체가 제공된다.

본 발명의 한 실시태양에서, 서열 20의 중쇄 및 서열 23의 경쇄를 포함하는, hIL-13에 특이적으로 결합하는 인간화 치료 항체가 제공된다.

본 발명의 한 실시태양에서, 서열 21의 중쇄 및 서열 23의 경쇄를 포함하는, hIL-13에 특이적으로 결합하는 인간화 치료 항체가 제공된다.

1.3 이중특이적 항체

이중특이적 항체는 적어도 2개의 상이한 에피토프에 대한 결합 특이성을 갖는 항체이다. 상기 항체의 제조 방법은 당업계에 공지되어 있다. 전통적으로, 이중특이적 항체의 재조합 생산은 2개의 면역글로불린 H 사슬-L 사슬 쌍의 동시발현에 기초하고, 여기서 2개의 H 사슬은 상이한 결합 특이성을 갖는다 (Millstein et al, Nature 305 537-539 (1983), WO93/08829 및 Traunecker et al EMBO, 10, 1991, 3655-3659 참조). H 및 L 사슬의 랜덤한 재편성 (assortment) 때문에, 10가지 상이한 항체 구조체의 잠재적인 혼합물이 생산되고, 이 중 하나만이 목적하는 결합 특이성을 갖는다. 대안적인 방법은 목적하는 결합 특이성을 갖는 가변 도메인을 힌지 영역, CH2 및 CH3 영역의 적어도 일부를 포함하는 중쇄 불변 영역에 융합시키는 것을 포함한다. 경쇄 결합을 위해 필요한 부위를 함유하는 CH1 영역이 적어도 하나의 융합체 내에 존재하는 것이 바람직하다. 이들 융합체를 코딩하는 DNA, 및 원하는 경우 L 사슬이 별개의 발현 벡터 내로 삽입된 다음 적합한 숙주 장기 내로 동시형질감염된다. 2개 또는 3개의 모든 사슬에 대한 코딩 서열을 하나의 발현 벡터 내로 삽입하는 것도 역시 가능하다. 한 바람직한 방법에서, 이중특이적 항체는 한 팔에 제1 결합 특이성을 갖는 H 사슬과 다른 팔에 제2 결합 특이성을 제공하는 H-L 사슬 쌍으로 이루어진다 (WO94/04690 참조). 또한 문헌 [Suresh et al Methods in Enzymology 121, 210, 1986]을 참조한다.

본 발명의 한 실시태양에서, 항체의 적어도 하나의 결합 특이성이 hIL-13에 대한 것인 이중특이적 치료 항체가 제공되고, 여기서 상기 항체는 hIL-13과 IL-13R 사이의 상호작용을 조절한다 (예를 들어 억제하거나 차단한다). 상기 항체는 IgG 이소형, 예를 들어 IgG1의 인간 불변 영역을 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시태양에서, 이중특이적 치료 항체는 hIL-13에 대한 제1 결합 특이성을 가져서 hIL-13과 hIL-13R 사이의 상호작용을 조절하고 (예를 들어 억제하거나 차단하고), hIL-4에 대한 제2 결합 특이성을 가져서 hIL-4와 hIL-4에 대한 수용체 사이의 상호작용을 조절한다 (예를 들어 억제하거나 차단한다).

본 발명의 한 실시태양에서, 항체의 적어도 하나의 결합 특이성이 hIL-13에 대한 것인 이중특이적 치료 항체가 제공되고, 여기서 상기 항체는 서열 3의 CDRH3을 포함한다. 상기 항체는 IgG 이소형, 예를 들어 IgG1의 인간 불변 영역을 추가로 포함할 수 있다.

본 발명의 한 실시태양에서, 항체의 적어도 하나의 결합 특이성이 hIL-13에 대한 것인 이중특이적 치료 항체가 제공되고, 여기서 상기 항체는 적어도 서열 1, 2, 3, 4, 5 및 6의 CDR을 포함한다. 상기 항체는 IgG 이소형, 예를 들어 IgG1의 인간 불변 영역을 추가로 포함할 수 있다.

1.4 항체 단편

본 발명의 특정 실시태양에서, hIL-13과 hIL-13R 사이의 상호작용을 조절하는 치료 항체 단편이 제공된다. 상기 단편은 무손상 및(또는) 인간화 및(또는) 키메라 항체의 기능적 항원 결합 단편, 예를 들어 상기 설명된 항체의 Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, ScFv 단편일 수 있다. 전통적으로, 상기 단편은 무손상 항체의 단백질분해 소화에 의해, 예를 들어 파파인 소화 (예를 들어, WO 94/29348 참조)에 의해 제조되지만, 재조합 방식으로 형질전환된 숙주세포로부터 직접 제조될 수 있다. ScFv의 생산에 대해서는 문헌 [Bird et al:(1988) Science, 242, 423-426]을 참조한다. 또한, 항체 단편은 하기하는 바와 같은 다양한 공학처리 기술을 이용하여 제조할 수 있다.

Fv 단편은 그들의 2개의 사슬 사이에 상호작용 에너지가 Fab 단편보다 더 낮은 것으로 보인다. VH 및 VL 도메인의 회합을 안정화시키기 위해, 이들은 펩티드 (Bird et al, (1988) Science 242, 423-426, Huston et al, PNAS, 85, 5879-5883), 디설피드 다리 (Glockshuber et al, (1990) Biochemistry, 29, 1362-1367) 및 "노브 인 홀 (knob in hole)" 돌연변이 (Zhu et al (1997), Protein Sci., 6, 781-788)를 사용하여 연결되었다. ScFv 단편은 당업계의 숙련인에게 잘 공지된 방법에 의해 생산될 수 있다 (Whitlow et al (1991) Methods companion Methods Enzymol, 2, 97-105 및 Huston et al (1993) Int. Rev. Immunol 10, 195-217 참조). ScFv는 세균 세포, 예를 들어 이. 콜라이 내에서 생산될 수 있지만, 보다 바람직하게는 진핵 세포 내에서 생산된다. ScFv의 한가지 단점은 다가 결합으로 인한 증가된 결합력 (avidity)을 배제하는 생성물의 1가성, 및 그들의 짧은 반감기이다. 이들 문제를 극복하기 위한 시도는 화학 커플링 (Adams et al (1993) Can. Res 53, 4026-4034 및 McCartney et al (1995) Protein Eng. 8, 301-314)에 의해, 또는 페어링되지 않은 C 말단 시스템인 잔기를 함유하는 ScFv의 자연적인 부위-특이적 이량체화 (Kipriyanov et al (1995) Cell. Biophys 26, 187-204 참조)에 의해 추가의 C 말단 시스템을 함유하는 ScFv로부터 생산된 2가 (ScFv')₂를 포함한다. 별법으로, ScFv는 펩티드 링커를 3 내지 12개의 잔기로 짧게 하여 "디아바디"를 형성함으로써 다량체를 형성하도록 될 수 있다 (Holliger et al PNAS (1993), 90, 6444-6448 참조). 링커를 더욱 더 감소시키면 ScFv 삼량체 ("트리아바디", Kortt et al (1997) Protein Eng, 10, 423-433 참조) 및 사량체 ("테트라바디", Le Gall et al (1999) FEBS Lett, 453, 164-168 참조)를 형성시킬 수 있다. 2가 ScFv 분자의 제작은 "미니항체" (Pack et al (1992) Biochemistry 31, 1579-1584 참조) 및 "미니바디" (Hu et al (1996), Cancer Res. 56, 3055-3061 참조)를 형성하도록 단백질 이량체화 모티프를 사용하는 유전자 융합에 의해 또한 달성할 수 있다. ScFv-Sc-Fv 탠덤 (tandem) ((ScFv)₂)은 2개의 ScFv 단위를 제3 펩티드 링커에 의해 연결함으로써 또한 생산될 수 있다 (Kurucz et al (1995) J. Immunol. 154, 4576-4582 참조). 이중특이적 디아바디는 짧은 링커에 의해 다른 항체의 VL 도메인에 연결된 한 항체로부터의 VH 도메인으로 이루어진 2개의 단일 사슬 융합 생성물의 비공유 회합을 통해 생산될 수 있다 (Kipriyanov et al (1998), Int. J. Can 77,763-772 참조). 상기 이중특이적 디아바디의 안정성은 상기 설명된 디설피드 다리 또는 "노브 인 홀" 돌연변이의 도입에 의해, 또는 2개의 하이브리드 ScFv 단편이 펩티드 링커를 통해 연결되는 단쇄 디아바디 (ScDb)의 형성에 의해 향상될 수 있다 (Kontermann et al (1999) J. Immunol. Methods 226 179-188 참조). 4가 이중특이적 분자는 예를 들어 ScFv 단편을 IgG 분자의 CH3 도메인에 또는 Fab 단편에 힌지 영역을 통해 융합시킴으로써 이용가능하다 (Coloma et al (1997) Nature Biotechnol. 15, 159-163 참조). 별법으로, 4가 이중특이적 분자는 이중특이적 단쇄 디아바디의 융합에 의해 형성되었다 (Alt et al, (1999) FEBS Lett 454, 90-94 참조). 보다 작은 4가 이중특이적 분자는 또한 ScFv-ScFv 탠덤을 나선-루프-나선 모티프를 함유하는 링커 (DiBi 미니항체, Muller et al (1998) FEBS Lett 432, 45-49 참조) 또는 4개의 항체 가변 도메인 (VH 및 VL)을 분자간 페어링을 방지하는 배향으로 포함하는 단쇄 분자 (탠덤 디아바디, Kipriyanov et al, (1999) J. Mol. Biol. 293, 41-56 참조)와 이량체화하여 형성될 수 있다. 이중특이적 F(ab')₂ 단편은 Fab' 단편의 화학 커플링에 의해 또는 류신 지퍼를 통한 이중이량체화에 의해 형성될 수 있다 (Shalaby et al, (1992) J. Exp. Med. 175, 217-225 및 Kostelny et al (1992), J. Immunol. 148, 1547-1553 참조). 단리된 VH 및 VL 도메인 (도만티스 피엘시 (Domantis plc))이 또한 이용가능하다 (US 6,248,516; US 6,291,158; US 6,172,197 참조).

한 실시태양에서, hIL-13에 특이적으로 결합하고 hIL-13과 hIL-13R 사이의 상호작용을 조절하는 (예를 들어 억제하거나 차단하는) 상기 설명된 바와 같은 치료 항체 단편 (예를 들어 ScFv, Fab, Fab', F(ab')₂) 또는 공학처리된 항체 단편이 제공된다. 치료 항체 단편은 대개 서열 3의 서열을 갖는 CDRH3을 임의로 서열 1, 2, 4, 5 및 6에 기재된 서열을 갖는 CDR과 함께 포함한다.

1.5 이중컨쥬게이트 항체

이중컨쥬게이트 항체가 또한 본 발명의 한 실시태양을 형성한다. 이중컨쥬게이트 항체는 임의의 편리한 가교결합 방법을 이용하여 형성된 2개의 공유 결합된 항체로 구성된다. 예를 들어, US 4,676,980을 참조한다.

1.6 다른 변형

항체의 Fc 영역과 다양한 Fc 수용체 (FcγR) 사이의 상호작용은 항체-의존 세포 세포독성 (ADCC), 보체의 고정, 항체의 포식작용 및 반감기/소실을 포함하는 항체의 효과기 기능을 매개하는 것으로 생각된다. 목적하는 특성에 따라 본 발명의 항체의 Fc 영역에 대해 다양한 변형을 수행할 수 있다. 예를 들어, 다른 용해 (lytic) 항체를 비-용해성으로 만드는 Fc 영역에서의 특이적 돌연변이가 EP 0629 240B1 및 EP 0307 434B2에 설명되어 있거나, 혈청 반감기를 증가시키기 위해 셀비지 (salvage) 수용체 결합 에피토프를 항체 내로 포함시킬 수 있다 (US 5,739,277 참조). 현재 인정되는 5가지 인간 Fcγ 수용체가 존재한다: FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa 및 신생 FcRn. 문헌 [Shields et al, (2001) J. Biol. Chem 276, 6591-6604]에서는 IgG1 잔기의 공통 세트가 모든 FcγR의 결합에 관여되는 한편, FcγRII 및 FcγRIII는 상기 공통 세트 밖의 별개의 부위를 이용함을 증명하였다. 1군의 IgG1 잔기는 알라닌으로 변경될 때 모든 FcγR에 대한 결합을 감소시켰다: Pro-238, Asp-265, Asp-270, Asn-297 및 Pro-239. 이들은 모두 IgG CH2 도메인 내에 존재하고, CH1 및 CH2를 연결하는 힌지 부근에 밀집하였다. FcγRI는 결합을 위해 IgG1 잔기의 공통 세트만을 이용하는 반면, FcγRII 및 FcγRIII는 공통 세트에 추가로 별개의 잔기와 상호작용한다. 일부 잔기를 변경하면 FcγRII (예를 들어 Arg-292) 또는 FcγRIII (예를 들어 Glu-293)에 대한 결합만을 감소시켰다. 몇몇 변이체는 FcγRII 또는 FcγRIII에 대한 개선된 결합을 보였지만, 다른 수용체에 대한 결합에는 영향을 미치지 않았다 (예를 들어, Ser-267Ala는 FcγRII에 대한 결합을 개선시켰지만, FcγRIII에 대한 결합은 영향받지 않았다). 다른 변이체는 FcγRII 또는 FcγRIII에 대한 개선된 결합을 나타냈고, 다른 수용체에 대한 결합은 감소하였다 (예를 들어 Ser-298Ala는 FcγRIII에 대한 결합을 개선시키고 FcγRII에 대한 결합을 감소시켰다). FcγRIIIa에 대해, 최상의 결합 IgG1 변이체는 Ser-298, Glu-333 및 Lys-334에서 알라닌 치환을 혼합하였다. 신생 FcRn 수용체는 항체 소실 및 조직을 가로지르는 세포전달작용 (transcytosis) 모두에 관여하는 것으로 생각된다 (Junghans R.P (1997) Immunol. Res 16, 29-57 및 Ghetie et al (2000) Annu. Rev. Immunol. 18, 739-766 참조). 인간 FcRn과 직접 상호작용하는 것으로 결정된 인간 IgG1 잔기는 Ile253, Ser254, Lys288, Thr307, Gln311, Asn434 및 His435를 포함한다. 본 섹션에 설명된 이들 위치 중 임의의 위치에서의 변경은 본 발명의 항체의 증가된 혈청 반감기 및(또는) 변경된 효과기 특성을 실현할 수 있다.

다른 변형은 본 발명의 항체의 글리코실화 변이체를 포함한다. 그들의 불변 영역 내의 보존된 위치에서 항체의 글리코실화는 항체 기능, 특히 상기한 바와 같은 효과기 기능에 현저한 영향을 미치는 것으로 알려져 있다 (예를 들어 Boyd et al (1996), Mol. Immunol. 32, 1311-1318 참조). 하나 이상의 탄수화물 잔기가 첨가되거나 치환되거나 결손되거나 변형되는 본 발명의 치료 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 글리코실화 변이체가 고려된다. 아스파라긴-X-세린 또는 아스파라긴-X-트레오닌 모티프를 도입시키면 탄수화물 잔기의 효소적 부작을 위한 잠재적인 부위를 생성시켜, 항체의 글리코실화를 조작하기 위해 이용될 수 있다. 문헌 [Raju et al (2001) Biochemistry 40, 8868-8876]에서, TNFR-IgG 면역어드레신의 말단 시알릴화는 베타-1,4-갈락토실트랜스퍼라제 및(또는) 알파-2,3 시알릴 트랜스퍼라제를 사용하는 재갈락토실화 및(또는) 재시알릴화 과정을 통해 증가되었다. 말단 시알릴화를 증가시키면 면역글로불린의 반감기를 증가시키는 것으로 생각된다. 대부분의 당단백질처럼 항체는 대개 단백질형 (glycoform)의 혼합물로서 생산된다. 상기 혼합물은 항체가 진핵 세포, 특히 포유동물 세포 내에서 생산될 때 특히 명백하다. 규정된 단백질형을 제조하기 위해 다양한 방법이 개발되었다 (Zhang et al Science (2004), 303, 371, Sears et al, Science, (2001) 291, 2344, Wacker et al (2002) Science, 298 1790, Davis et al (2002) Chem. Rev. 102, 579, Hang et al (2001) Acc. Chem. Res 34, 727 참조). 따라서, 본 발명은 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 규정된 수 (예를 들어 7개 이하, 예를 들어 5개 이하, 예를 들어 2개 또는 1개)의 단백질형(들)을 포함하는 본원에 설명된 복수의 치료 (모노클로날) 항체 (IgG 이소형, 예를 들어 IgG1의 것일 수 있다)를 고려한다.

본 발명의 추가의 실시태양은 비-단백질성 중합체, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 폴리프로필렌 글리콜 또는 폴리옥시알킬렌에 커플링된 본 발명의 치료 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함한다. 단백질을 PEG에 컨쥬게이션하는 것은 단백질의 반감기를 증가시키고 단백질의 항원성 및 면역원성을 감소시키기 위한 확립된 기술이다. 상이한 분자량 및 유형 (선형 또는 분지형)의 PEG화를 사용하는 것은 무손상 항체 및 Fab' 단편을 사용하여 연구되었다 (Koumenis I. L. et al (2000) Int. J. Pharmaceut. 198:83-95 참조).

2. 경쟁 항체

본 발명은 또한 hIL-13에 특이적으로 결합하고, 서열 3의 CDRH3을 포함하는 본 발명의 치료 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 hIL-13에 대한 결합 및(또는) 서열 1, 2, 3, 4, 5 및 6의 CDR을 포함하는 치료 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 hIL-13에 대한 결합을 경쟁적으로 억제하는 항체 및 항체의 항원 결합 단편을 고려한다. 몇몇 실시태양에서, 치료 항체는 서열 7의 VH 도메인 및 서열 8의 VL 도메인을 포함하는 쥐 항체이다. 상기 경쟁 항체는 서열 1, 2, 3, 4, 5 및 6의 CDR을 포함하는 치료 항체에 의해 결합되는 것과 동일하거나, 겹치거나 공간적으로 인접한, hIL-13의 에피토프에 결합한다. 경쟁 항체 또는 항체 단편은 등몰 농도에서 적어도 25% 억제, 일반적으로 35% 이상, 보다 일반적으로 적어도 50% 억제를 나타낸다.

따라서, 본 발명의 한 실시태양에서, 후보 항체 또는 항체 단편이 본원에서 설명되는 경쟁 항체인지 결정하기 위해 후보 항체 또는 항체 단편을 스크리닝하는 방법이 제공되고, 상기 방법은 (a) 후보 항체 또는 항체 단편을 서열 3의 CDRH3을 포함하고, 임의로 서열 1, 2, 4, 5 및 6의 CDR을 추가로 포함하는 치료 항체 (예를 들어 서열 7의 VH 도메인 및 서열 8의 VL 도메인을 갖는 쥐 치료 항체 또는 서열 18의 중쇄 및 서열 22의 경쇄를 갖는 인간화 치료 항체 또는 서열 19의 중쇄 및 서열 23의 경쇄를 갖는 인간화 치료 항체) 또는 그의 항원 결합 단편과 함께 인큐베이팅하고; (b) 단계 (a)의 후보 항체 또는 그의 항체 단편이 치료 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 hIL-13에 대한 결합을 경쟁적으로 억제하는지를 결정하는 것을 포함한다.

또한, 서열 1, 2, 3, 4, 5 및 6에 제시된 서열을 갖는 CDR을 포함하는 치료 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 결합을 경쟁적으로 억제하는, 경쟁 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 제공된다.

다른 실시태양에서, 본 발명의 치료 항체의 hIL-13에 대한 결합을 경쟁적으로 억제하는 경쟁 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 제공되고, 상기 치료 항체는 서열 18의 중쇄 및 서열 22의 경쇄를 포함한다.

경쟁 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 임의의 상기 항체 구조체일 수 있다. 예를 들어, 경쟁 항체는 영장류 또는 인간 무손상 항체 또는 바람직하게는 IgG 이소형, 예를 들어 IgG1 또는 IgG4의 인간화 항체일 수 있다. 경쟁 항체 단편은 Fab, Fab', F(ab')₂, ScFv 등일 수 있다. 경쟁 항체는 본원 명세서에 개시된 방법에 따라 생산할 수 있다.

3. 제조 방법

본 발명의 항체는 폴리클로날 집단으로서 생산될 수 있지만, 보다 바람직하게는 모노클로날 집단 (즉, 특이적인 항원 결합 부위에 대해 작용하는 동일한 항체의 실질적으로 균일한 집단)으로서 생산될 수 있다. 물론, 당업계의 숙련인은 집단이 2 이상의 항체의 존재를 의미함을 알 것이다. 본 발명의 항체는 트랜스제닉 유기체, 예를 들어 염소 (Pollock et al (1999), J. Immunol. Methods 231:147-157 참조), 닭 (Morrow KJJ (2000) Genet. Eng. News 20:1-55 참조), 마우스 (Pollock et al 참조) 또는 식물 (Doran PM, (2000) Curr. Opinion Biotechnol. 11, 199-204, Ma JK-C (1998), Nat. Med. 4; 601-606, Baez J e. al, BioPharm (2000) 13: 50-54, Stoger E et al; (2000) Plant Mol. Biol. 42:583-590 참조)에서 생산될 수 있다. 항체는 또한 화학 합성에 의해 생산될 수 있다. 그러나, 본 발명의 항체는 일반적으로 당업계의 숙련인에게 잘 공지된 재조합 세포 배양 기술을 이용하여 생산된다. 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 단리하여 추가의 클로닝 (증폭) 또는 발현을 위해 복제가능 벡터, 예를 들어 플라스미드 내로 삽입한다. 하나의 유용한 발현 시스템은 특히 숙주세포가 CHO 또는 NSO (하기 참조)인 글루타메이트 신테타제 시스템 (예를 들어 론자 바이올로지스 (Lonza Biologies) 시판)이다. 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 통상적인 절차 (예를 들어 올리고뉴클레오티드 프로브)를 사용하여 쉽게 단리되고 서열분석된다. 사용될 수 있는 벡터는 플라스미드, 바이러스, 파지, 트랜스포존, 미니염색체 (minichromosome)을 포함하고, 이 중 플라스미드가 일반적인 실시태양이다. 일반적으로 상기 벡터는 발현을 용이하게 하기 위해 경쇄 및(또는) 중쇄 폴리뉴클레오티드에 작동가능하게 연결된 시그널 서열, 복제 기점, 하나 이상의 마커 유전자, 인핸서 성분, 프로모터 및 전사 종결 서열을 추가로 포함한다. 경쇄 및 중쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 별개의 벡터 내로 삽입되어 동일한 숙주세포 내로 형질감염될 수 있거나, 필요한 경우 중쇄와 경쇄가 모두 숙주세포의 형질감염을 위해 동일한 벡터 내로 삽입될 수도 있다. 따라서, 본 발명의 한 측면에 따라, 본 발명의 치료 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 경쇄 및(또는) 중쇄를 코딩하는 벡터를 제작하는 방법이 제공되고, 상기 방법은 벡터 내로 본 발명의 치료 항체의 경쇄 및(또는) 중쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 삽입하는 것을 포함한다.

본 발명의 다른 측면에서, 서열 24에 기재된 서열을 갖는 쥐 VH 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 제공된다.

본 발명의 다른 측면에서, 서열 25에 기재된 서열을 갖는 쥐 VL 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 제공된다.

다른 실시태양에서, 서열 26, 27, 28, 29로 이루어진 군 중에서 선택된 서열을 갖는 VH 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 제공된다.

다른 실시태양에서, 서열 30, 31로 이루어진 군 중에서 선택된 서열을 갖는 VL 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 제공된다.

본 발명에 따라, 본 발명의 중쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 제공되고, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열 32, 33, 34, 35로 이루어진 군 중에서 선택된다.

본 발명에 따라, 본 발명의 경쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 제공되고, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열 36, 37로 이루어진 군 중에서 선택된다.

본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 유전자 코드의 중복성 때문에, 본원에서 개시된 것에 대한 대안적 폴리뉴클레오티드도 이용할 수 있음을 당업계의 숙련인은 분명하게 알 것이다.

3.1 시그널 서열

본 발명의 항체는 성숙 단백질의 N 말단에 특이적 절단 부위를 갖는 이중 시그널 서열과의 융합 단백질로서 생산될 수 있다. 시그널 서열은 숙주세포에 의해 인식되어 처리되어야 한다. 원핵 숙주세포의 경우, 시그널 서열은 알칼린 포스파타제, 페니실리나제, 또는 열 안정한 장독소 II 리더일 수 있다. 효모 분비를 위해, 시그널 서열은 효모 인버타제 리더, α 인자 리더 또는 산 포스파타제 리더일 수 있다 (예를 들어 WO90/13646 참조). 포유동물 세포계에서, 바이러스 분비 리더, 예를 들어 단순 헤르페스 gD 시그널 및 천연 면역글로불린 시그널 서열을 이용할 수 있다. 일반적으로, 시그널 서열은 본 발명의 항체를 코딩하는 DNA에 해독 프레임으로 라이게이션된다.

3.2 복제 기점

복제 기점은 당업계에 공지되어 있고, pBR322는 대부분의 그람-음성 세균에 적합하고, 2 μ 플라스미드는 대부분의 효모에 적합하고, 다양한 바이러스 기점, 예를 들어 SV40, 폴리오마, 아데노바이러스, VSV 또는 BPV는 대부분의 포유동물 세포에 적합하다. 일반적으로, 복제 기점 성분은 포유동물 발현 벡터에 필요하지 않지만, SV40은 조기 프로모터를 포함하기 때문에 사용될 수 있다.

3.3 선택 마커

일반적인 선택 유전자는 (a) 항생제 또는 다른 독신, 예를 들어 암피실린, 네오마이신, 메토틱세이트 또는 테트라사이클린에 내성을 부여하거나 (b) 영양요구 결핍을 보완하거나 복합 배지에서 이용될 수 없는 영양소를 공급하는 단백질을 코딩한다. 선택 방법은 숙주세포의 성장 정지를 포함할 수 있다. 본 발명의 치료 항체를 코딩하는 유전자로 성공적으로 형질전환된 세포는 예를 들어 선택마커에 의해 부여된 약물 내성에 의해 생존한다. 다른 예는 소위 DHFR 선택마커로서, 형질전환체는 메토틱세이트의 존재 하에 배양된다. 일반적인 실시태양에서, 세포는 관심있는 외인성 유전자의 카피수를 증폭하기 위해서 증가량의 메토틱세이트의 존재 하에 배양된다. CHO 세포가 DHFR 선택을 위해 특히 유용한 세포주이다. 추가의 예는 글루타메이트 신테타제 발현 시스템 (론자 바이올로지스)이다. 효모에 사용하기 적합한 선택 유전자는 trp1 유전자이다 (Stinchcomb et al Nature 282, 38, 1979 참조).

3.4 프로모터

본 발명의 항체 발현에 적합한 프로모터는 항체를 코딩하는 DNA/폴리뉴클레오티드에 작동가능하게 연결된다. 원핵 숙주를 위한 프로모터는 phoA 프로모터, 베타-락타마제 및 락토스 프로모터 시스템, 알칼린 포스파타제, 트립토판 및 하이브리드 프로모터, 예를 들어 Tac를 포함한다. 효모 세포에서 발현에 적합한 프로모터는 3-포스포글리세레이트 키나제 또는 다른 해당 효소, 예를 들어 에놀라제, 글리세르알데히드 3 포스페이트 탈수소효소, 헥소키나제, 피루베이트 데카르복실라제, 포스포프럭토키나제, 글루코스 6 포스페이트 이소머라제, 3-포스포글리세레이트 뮤타제 및 글루코키나제를 포함한다. 유도가능 효모 프로모터는 알콜 탈수소효소 2, 이소시토크롬 C, 산 포스파타제, 메탈로티오네인 및 질소 대사 또는 말토스/갈락토스 이용에 작용하는 효소를 포함한다.

포유동물 세포계에서 발현을 위한 프로모터는 바이러스 프로모터, 예를 들어 폴리오마, 조류폭스 및 아데노바이러스 (예를 들어 아데노바이러스 2), 소 유두종 바이러스, 조류 육종 바이러스, 사이토메갈로바이러스 (특히 중간단계 초기 유전자 프로모터), 레트로바이러스, B형 간염 바이러스, 악틴, 라우스 육종 바이러스 (RSV) 프로모터 및 초기 또는 후기 시미안 바이러스 40을 포함한다. 물론, 프로모터의 선택은 발현에 사용된 숙주세포와의 적절한 적합성에 기초한다. 따라서, 한 실시태양에서, RSV 및(또는) SV40 및(또는) CMV 프로모터, 본 발명의 경쇄 V 영역 (VL)을 코딩하는 DNA, κ C 영역을 네오마이신 및 암피실린 내성 선택마커와 함께 포함하는 제1 플라스미드 및 RSV 또는 SV40 프로모터, 본 발명의 중쇄 V 영역 (VH)을 코딩하는 DNA, γ 1 불변 도메인을 코딩하는 DNA, DHFR 및 암피실린 내성 마커를 포함하는 제2 플라스미드가 제공된다.

3.5 인핸서 성분

적절한 경우, 예를 들어 보다 고등한 진핵세포에서의 발현을 위해, 벡터 내에서 프로모터 성분에 작동가능하게 연결된 인핸서 성분이 사용될 수 있다. 적합한 포유동물 인핸서 서열은 글로빈, 엘라스타제, 알부민, 태아단백질 및 인슐린으로부터의 인핸서 성분을 포함한다. 별법으로, 진핵 세포 바이러스, 예를 들어 SV40 인핸서 (bp 100-270), 사이토메갈로바이러스 초기 프로모터 인핸서, 폴리마 (polyma) 인핸서, 바칼로바이러스 인핸서 또는 쥐 IgG2a 로커스로부터의 인핸서 성분을 사용할 수 있다 (WO04/009823 참조). 인핸서는 바람직하게는 프로모터의 상류 부위에서 벡터에 위치한다.

3.6 숙주세포

본 발명의 항체를 코딩하는 벡터의 클로닝 또는 발현에 적합한 숙주세포는 원핵세포, 효모 또는 보다 고등한 진핵세포이다. 적합한 원핵 세포는 유박테리아, 예를 들어 장내세균과 (enterobacteriaceae), 예를 들어 에서리치아 (Escherichia), 예를 들어 이. 콜라이 (예를 들어 ATCC 31,446; 31,537; 27,325), 엔테로박터 (Enterobacter), 에르위니아 (Erwinia), 클렙시엘라 프로테우스 (Klebsiella Proteus), 살모넬라 (Salmonella), 예를 들어 살모넬라 티피무리움 (typhimurium), 세라티아, 예를 들어 세라티아 마르세스칸스 (marcescans) 및 시겔라 (Shigella) 및 바실러스 (Bacillus), 예를 들어 비. 섭틸리스 (B. subtilis) 및 비. 리체니포르미스 (B. licheniformis) (DD 266 710 참조), 슈도모나스 (Pseudomonas), 예를 들어 피. 아에루기노사 (P. aeruginosa) 및 스트렙토마이세스 (Streptomyces)를 포함한다. 효모 숙주세포 중에서, 사카로마이세스 세레비지에 (Saccharomyces cerevisiae), 스킴조사카로마이세스 폼베 (schizosaccharomyces pombe), 클루이베로마이세스 (Kluyveromyces) (예를 들어 ATCC 16,045; 12,424; 24178; 56,500), 야로위아 (yarrowia) (EP 402,226), 피치아 파스토리스 (Pichia Pastoris) (EP 183,070, 또한 Peng et al J. Biotechnol. 108 (2004) 185-192 참조), 칸디다 (Candida), 트코더마 레에시아 (Thchoderma reesia) (EP 244,234), 페니실린, 톨리포클라둠 (Tolypocladium) 및 아스퍼길러스 (Aspergillus) 숙주, 예를 들어 에이. 니들란스 (A. nidulans) 및 에이. 니거 (A. niger)도 고려된다.

원핵 및 효모 숙주세포가 본 발명에서 구체적으로 고려되지만, 바람직하게는 본 발명의 숙주세포는 보다 고등한 진핵 세포이다. 적합한 보다 고등한 진핵 숙주세포는 포유동물 세포, 예를 들어 COS-1 (ATCC No. CRL 1650), COS-7 (ATCC CRL 1651), 인간 배아 신장 세포주 293, 베이비 햄스터 신장 세포 (BHK) (ATCC CRL.1632), BHK570 (ATCC NO. CRL 10314), 293 (ATCC NO. CRL 1573), 차이니즈 햄스터 난소 세포 CHO (예를 들어 CHO-K1, ATCC NO. CCL 61, DHFR-CHO 세포주, 예를 들어 DG44 (Urlaub et al, (1986) Somatic Cell Mol. Genet. 12, 555-556) 참조), 특히 현탁 배양에 적당한 CHO 세포주, 마우스 세르톨리 세포, 원숭이 신장 세포, 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포 (ATCC CRL-1587), HELA 세포, 개 신장 세포 (ATCC CCL 34), 인간 폐 세포 (ATCC CCL 75), Hep G2 및 골수종 또는 림프종 세포 예를 들어 NSO (US 5,807,715 참조), Sp2/0, YO를 포함한다. 따라서, 본 발명의 한 실시태양에서, 본원에서 설명된 치료 항체의 중쇄 및(또는) 경쇄 또는 그의 항원 결합 단편을 코딩하는 벡터를 포함하는 안정하게 형질전환된 숙주세포가 제공된다. 바람직하게는, 상기 숙주세포는 경쇄를 코딩하는 제1 벡터 및 상기 중쇄를 코딩하는 제2 벡터를 포함한다.

세균 발효

세균 시스템이 항체 단편의 발현에 특히 적합하다. 상기 단편은 세포내 또는 주변세포질 내에 편재된다. 불용성 주변세포질 단백질은 당업계의 숙련인에게 공지된 방법에 따라 추출되고 재폴딩되어 활성 단백질을 형성할 수 있다 [Sanchez et al (1999) J. Biotechnol. 72, 13-20 및 Cupit PM et al (1999) Lett Appl Microbiol, 29, 273-277 참조].

3.7 세포 배양 방법

본 발명의 치료 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 코딩하는 벡터로 형질전환된 숙주세포는 당업계의 숙련인에게 공지된 임의의 방법으로 배양할 수 있다. 숙주세포는 스피너 플라스크, 롤러 바틀 또는 중공사 시스템에서 배양할 수 있지만, 대규모

생산을 위해 교반 탱크 반응기를 특히 현탁 배양을 위해 사용하는 것이 바람직하다. 바람직하게는, 교반 탱커는 예를 들어 살포기, 배플 또는 저전단 임펠러를 사용하여 폭기를 위해 개조된다. 버블 컬럼 및 공기부양 반응기를 위해, 공기 또는 산소 버블을 사용한 직접 폭기를 사용할 수 있다. 숙주세포를 무혈청 배양 배지에서 배양하는 경우, 폭기 공정의 결과로서 세포 손상의 예방을 돕기 위해 배지를 세포 보호제, 예를 들어 플루로닉(pluronic) F-68로 보충하는 것이 바람직하다. 숙주세포 특성에 따라, 앵커링(anchorage) 의존적 세포주를 위한 성장 기재로서 미세담체를 사용할 수 있거나, 세포를 현탁 배양(일반적인)에 적응시킬 수 있다. 숙주세포, 특히 무척추동물 숙주세포의 배양은 다양한 운전 방식, 예를 들어 유가식 배양, 반복된 배치 프로세싱(Drapeau et al (1994) cytotechnology 15: 103-109 참조), 연장된 배치 공정 또는 관류 배양을 이용할 수 있다. 재조합 방식으로 형질전환된 포유동물 숙주세포는 혈청 함유 배지, 예를 들어 소 태아 혈청(FCS)에서 배양할 수 있지만, 상기 숙주세포는 필요한 경우 에너지원, 예를 들어 글루코스 및 합성 성장 인자, 예를 들어 재조합 인슐린으로 보충된, 예를 들어 문헌 [Keen et al (1995) Cytotechnology 17:153-163]에 개시된 합성 무혈청 배지, 또는 상업적으로 입수가 가능한 배지, 예를 들어 ProCHO-CDM 또는 UltraCHO™ (캠브렉스(Cambrex), 미국 뉴저지)에서 배양하는 것이 바람직하다. 숙주세포의 무혈청 배양은 세포가 무혈청 조건에서 성장하도록 적응될 것을 필요로 할 수 있다. 한 적응 방법은 상기 숙주세포를 혈청 함유 배지에서 배양하고, 80%의 배양 배지를 무혈청 배지로 반복적으로 교체하여 숙주세포가 무혈청 조건에 적응하도록 하는 것이다(예를 들어 Scharfenberg K et al (1995), Animal Cell technology: Developments towards the 21st century (Beuvery E.C. et al eds), pp619-623, Kluwer Academic publishers 참조).

배지 내로 분비된 본 발명의 항체는 의도하는 용도에 적합한 정제 수준을 제공하기 위해 다양한 기술을 사용하여 회수 및 정제될 수 있다. 예를 들어, 인간 환자 치료를 위한 본 발명의 치료 항체는 일반적으로 적어도 95%의 순도, 보다 일반적으로 98% 또는 99% 이상의 순도(조 배양 배지에 비해)를 보여야 한다. 첫번째의 경우에서, 배양 배지로부터의 세포 파편은 일반적으로 원심분리, 이어서 예를 들어 미세여과, 한외여과 및(또는) 심층 여과를 사용한 상등액의 정화 단계를 사용하여 제거된다. 다양한 다른 기술, 예를 들어 투석 및 겔 전기영동 및 크로마토그래피 기술, 예를 들어 히드록시아파타이트(HA), 친화도 크로마토그래피(임의로 친화도 태깅 시스템, 예를 들어 폴리히스티딘 포함) 및(또는) 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC, US 5,429,746 참조)를 이용할 수 있다. 한 실시태양에서, 상이한 정화 단계 후의 본 발명의 항체는 단백질 A 또는 G 친화도 크로마토그래피, 이어서 추가의 크로마토그래피 단계, 예를 들어 이온 교환 및(또는) HA 크로마토그래피, 음이온 또는 양이온 교환, 크기 배제 크로마토그래피 및 황산암모늄 침전을 사용하여 포획된다. 일반적으로, 다양한 바이러스 제거 단계(예를 들어 DV-20 필터를 사용한 나노여과)도 사용된다. 상기 다양한 단계 후에, 적어도 75 mg/ml 이상, 예를 들어 100 mg/ml 이상의 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 정제된(바람직하게는 모노클로날) 제제가 제공되고, 따라서 본 발명의 실시태양을 형성한다. 적합하게는, 상기 제제에는 본 발명의 항체의 응집된 형태가 실질적으로 존재하지 않는다.

4. 제약 조성물

상기 설명된 본 발명의 항체의 정제된 제제(특히 모노클로날 제제)는 인간 질병 및 질환, 예를 들어 아토피성 질병, 예를 들어 천식, 알레르기성 비염, COPD의 치료에 사용하기 위한 제약 조성물 내로 포함될 수 있다. 일반적으로, 상기 조성물은 공지되고 허용되는 제약 실무에 의해 요구되는 제약약상 허용되는 담체를 포함한다(예를 들어 Remingtons Pharmaceutical Sciences, 16th edition, (1980), Mack Publishing Co. 참조). 상기 담체의 예는 멸균 담체, 예를 들어 적합한 버퍼로 5 내지 8의 pH로 완충된 염수, 링거액 또는 텍스트로스 용액을 포함한다. 주사(예를 들어 정맥내, 복강내, 피부내, 피하, 근육내 또는 문정맥내) 또는 연속 주입용 제약 조성물은 적합하게는 가시적인 입자 물질이 존재하지 않고, 0.1 ng 내지 100 mg의 항체, 바람직하게는 5 mg 내지 25 mg의 항체를 포함할 수 있다. 상기 제약 조성물의 제조 방법은 당업계의 숙련인에게 공지되어 있다. 한 실시태양에서, 제약 조성물은 단위 투여 형태의 0.1 ng 내지 100 mg의 본 발명의 치료 항체를, 임의로 사용 지시서와 함께 포함한다. 본 발명의 제약 조성물은 당업계의 숙련인에게 공지되거나 자명한 방법에 따라 투여 전에 재구성하기 위해 동결 건조될 수 있다. 본 발명의 실시태양이 본 발명의 항체를 IgG1 이소형과 함께 포함할 경우, 상기 이소형의 항체의 구리-매개된 분해 수준을 감소시키기 위해서 구리의 킬레이터, 예를 들어 시트레이트(예를 들어 시트르산 나트륨) 또는 EDTA 또는 히스티딘을 제약 조성물에 첨가할 수 있다(EP0612251 참조). 항-hIL-13 치료제는 경구, 흡입, 국소(예를 들어, 안내, 비강내, 직장내, 피부 상처 내로) 투여에 의해 제공될 수 있다.

본 발명의 항체 투여를 위한 효과적인 투여량 및 치료 요법은 일반적으로 경험적으로 결정되고, 환자의 연령, 체중 및 건강 상태 및 치료될 질병 또는 질환과 같은 요인에 따라 결정된다. 상기 요인은 담당 의사의 판단에 따른다. 적절한 투여량 선택을 위한 지침은 예를 들어 문헌 [Smith et al (1977) Antibodies in human diagnosis and therapy, Raven Press, New York]에 제시되어 있지만, 일반적으로 1 mg 내지 1000 mg일 것이다.

치료될 질병 또는 질환(특히 천식)에 따라, 치료 유효량의 본 발명의 항체를 포함하는 제약 조성물은 유효량의 다른 의약, 예를 들어 소염제(예를 들어 코르티코스테로이드 또는 NSAID), 항콜린제(특히 M1/M2/M3 수용체 길항제), β_2 아드레날

린 수용체 작용제, 항감염제 (예를 들어 항생제, 항바이러스제), 항히스타민제, PDE4 억제제와 동시에, 별개로 또는 순차적으로 사용될 수 있다. β_2 아드레날린 수용체 작용제의 예는 살메테롤, 살부타몰, 포르모테롤, 살메파롤, 페노테롤, 터부탈린을 포함한다. 바람직한 지속성 β_2 아드레날린 수용체 작용제는 WO02/66422A, WO02/270490, WO02/076933, WO03/024439 및 WO03/072539에 기재된 것을 포함한다. 적합한 코르티코스테로이드는 메틸 프레드니솔론, 프레드니솔론, 텍사메타손, 플루티카손 프로피오네이트, 6 α ,9 α -디플루오로-17 α -[(2-푸라닐카르보닐)옥시]-11 β -히드록시-16 α -메틸-3-옥소-안드로스타-1,4-디엔-17 β -카르보티오산 S-플루오로메틸 에스테르, 6 α ,9 α -디플루오로-11 β -히드록시-16 α -메틸-3-옥소-17 α -프로피오닐옥시-안드로스타-1,4-디엔-17 β -카르보티오산 S-(2-옥소-테트라히드로-푸란-3S-일) 에스테르, 베클로메탄손 에스테르 (예를 들어 17-프로피오네이트 에스테르 또는 17,21-디프로피오네이트 에스테르), 부데소니드, 플루니솔리드, 모메타손 에스테르 (예를 들어 푸르케이트 에스테르), 트리암시놀론 아세토니드, 로플레포니드, 시클레소니드 (16 α ,17-[[(R)-시클로헥실메틸렌]비스(옥시)]-11 β ,21-디히드록시-프레그나-1,4-디엔-3,20-디온), 부티소코르트 프로피오네이트, RPR-106541 및 ST-126을 포함한다. 바람직한 코르티코스테로이드는 플루티카손 프로피오네이트, 6 α ,9 α -디플루오로-11 β -히드록시-16 α -메틸-17 α -[(4-메틸-1,3-티아졸-5-카르보닐)옥시]-3-옥소-안드로스타-1,4-디엔-17 β -카르보티오산 S-플루오로메틸 에스테르 및 6 α ,9 α -디플루오로-17 α -[(2-푸라닐카르보닐)옥시]-11 β -히드록시-16 α -메틸-3-옥소-안드로스타-1,4-디엔-17 β -카르보티오산 S-플루오로메틸 에스테르, 보다 바람직하게는 6 α ,9 α -디플루오로-17 α -[(2-푸라닐카르보닐)옥시]-11 β -히드록시-16 α -메틸-3-옥소-안드로스타-1,4-디엔-17 β -카르보티오산 S-플루오로메틸 에스테르를 포함한다.

트랜스활성화 (transactivation)보다는 트랜스억제 (transrepression)에 대한 선택을 가질 수 있고 조합 요법에 유용할 수 있는 글루코코르티코이드 효과를 갖는 비스테로이드 화합물은 WO03/082827, WO01/10143, WO98/54159, WO04/005229, WO04/009016, WO04/009017, WO04/018429, WO03/104195, WO03/082787, WO03/082280, WO03/059899, WO03/101932, WO02/02565, WO01/16128, WO00/66590, WO03/086294, WO04/026248, WO03/061651, WO03/08277에 개시된 것을 포함한다.

적합한 소염제는 비스테로이드 소염약 (NSAID)을 포함한다.

적합한 NSAID은 나트륨 크로모글리케이트, 네도크로밀 나트륨, 포스포디에스테라제 (PDE) 억제제 (예를 들어 테오필린, PDE4 억제제 또는 혼합된 PDE3/PDE4 억제제), 류코트리엔 길항제, 류코트리엔 합성 억제제 (예를 들어 몬텔루카스트), iNOS 억제제, 트립타제 및 엘라스타제 억제제, 베타-2 인테그린 길항제 및 아데노신 수용체 작용제 또는 길항제 (예를 들어 아데노신 2a 작용제), 시토킨 길항제 (예를 들어 케모카인 길항제, 예를 들어 CCR3 길항제) 또는 시토킨 합성 억제제, 또는 5-리폭시제나제 억제제를 포함한다. 적합한 다른 β_2 -아드레날린 수용체 작용제는 살메테롤 (예를 들어 크시나포에이트로서), 살부타몰 (예를 들어 술피이트 또는 유리 염기로서), 포르모테롤 (예를 들어 푸마레이트로서), 페노테롤 또는 터부탈린 및 그의 염을 포함한다. iNOS (유도가능 산화질소 신타제 억제제)가 경구 투여에 바람직하다. 적합한 iNOS 억제제는 WO93/13055, WO98/30537, WO02/50021, WO95/34534 및 WO99/62875에 개시된 것을 포함한다. 적합한 CCR3 억제제는 WO02/26722에 기재된 것을 포함한다.

특히 관심의 대상은 포스포디에스테라제 4 (PDE4) 억제제와 조합된 본 발명의 항체의 용도이다. 본 발명의 상기 측면에 유용한 PDE4-특이적 억제제는 PDE4 효소를 억제하는 것으로 알려지거나 PDE4 억제제로서 작용하는 것으로 밝혀지고, 단지 PDE4 억제제인 임의의 화합물일 수 있고, PDE4 뿐만 아니라 PDE 패밀리의 다른 멤버, 예를 들어 PDE3 및 PDE5를 억제하는 화합물은 포함되지 않는다.

관심있는 화합물은 시스-4-시아노-4-(3-시클로펜틸옥시-4-메톡시페닐)시클로헥산-1-카르복실산, 2-카르보메톡시-4-시아노-4-(3-시클로프로필메톡시-4-디플루오로메톡시페닐)시클로헥산-1-온 및 시스-[4-시아노-4-(3-시클로프로필메톡시-4-디플루오로메톡시페닐)시클로헥산-1-올]을 포함한다. 또한, 1996년 9월 3일 등록된 미국 특허 5,552,438에 기재된 시스-4-시아노-4-[3-(시클로펜틸옥시)-4-메톡시페닐]시클로헥산-1-카르복실산 (실로밀라스트로도 알려짐) 및 그의 염, 에스테르, 전구약물 또는 물리적 형태도 포함된다 (상기 특허 및 개시된 화합물은 그 전부가 본원에 참고로 포함된다).

엘비온 (Elbion)의 AWD-12-281 (Hofgen, N. et al. 15th EFMC Int Symp Med Chem (Sept 6-10, Edinburgh) 1998, Abst P.98; CAS 참조 번호 247584020-9); NCS-613 (INSERM)로 명명된 9-벤질아데닌 유도체; 치로사이언스 (Chiroscience) 및 셰링-플로 (Schering-Plough)의 D-4418; CI-1018 (PD-168787)로서 확인되고 화이자 (Pfizer)에서 공급하는 벤조디아제핀 PDE4 억제제; WO99/16766 (교와 하꼬 (Kyowa Hakko))에 개시된 벤조디아옥솔 유도체; 교와 하꼬의 K-34; 나프 (Napp)의 V-11294A (Landells, L.J. et al. Eur Resp J [Annu Cong Eur Resp Soc (Sept 19-23, Geneva) 1998] 1998, 12 (Suppl. 28): Abst P2393); 로플루밀라스트 (CAS 참조 번호 162401-32-3) 및 비크-굴렌

(Byk-Gulden)의 프탈라지논 (WO99/47505, 그 개시 내용이 본원에 참고로 포함됨); 비크-굴덴 (현재는 알타나 (Altana))에 의해 제조되어 시판되는 혼합된 PDE3/PDE4 억제제인 푸마펜트린, (-)-p-[(4aR*,10bS*)-9-에톡시-1,2,3,4,4a,10b-헥사하이드로-8-메톡시-2-메틸벤조[c][1,6]나프티리딘-6-일]-N,N-디이소프로필벤즈아미드; 알미랄-프로데스파르마 (Almirall-Prodesfarma)에서 개발 중인 아로필린; 베르날리스 (Vernalis)의 VM554/UM565; 또는 T-440 (Tanabe Seiyaku; Fuji, K. et al. J Pharmacol Exp Ther, 1998, 284(1): 162), 및 T2585도 관심있는 화합물이다.

관심있는 추가의 화합물은 공개된 국제 특허 출원 WO04/024728 (글락소 그룹 엘티디 (Glaxo Group Ltd)), PCT/EP2003/014867 (글락소 그룹 엘티디) 및 PCT/EP2004/005494 (글락소 그룹 엘티디)에 개시되어 있다.

적합한 항콜린제는 무스카린 수용체에서 길항제로서 작용하는 화합물, 특히 M_1 또는 M_3 수용체의 길항제, M_1/M_3 또는 M_2/M_3 수용체의 이중길항제 또는 $M_1/M_2/M_3$ 수용체의 범용 길항제인 화합물이다. 흡입을 통한 투여를 위한 예시적인 화합물은 이프라트로퓜 (예를 들어 브로마이드, CAS 22254-24-6, 상표명 Atrovent로 시판), 옥시트로퓜 (예를 들어 브로마이드로서, CAS 30286-75-0) 및 티오토로퓜 (예를 들어 브로마이드로서, CAS 136310-93-5, 상표명 Spiriva로 시판)을 포함한다. 레바트로페이트 (예를 들어 히드로브로마이드로서, CAS 262586-79-8) 및 LAS-34273 (WO01/04118에 개시됨)도 해당된다. 경구 투여를 위한 예시적인 화합물은 피렌제핀 (CAS 28797-61-7), 다리페나신 (CAS 133099-04-4, 또는 히드로브로마이드의 경우 CAS 133099-07-7, 상표명 Enablex로 시판), 옥시부티닌 (CAS 5633-20-5, 상표명 Ditropan으로 시판), 테로딜린 (CAS 15793-40-5), 톨테로딘 (CAS 124937-51-5 또는 타르트레이트의 경우 CAS 124937-52-6, 상표명 Detrol로 시판), 오틀로늄 (예를 들어 브로마이드로서, CAS 26095-59-0, 상표명 Spasmomen으로 시판), 트로스퓜 클로라이드 (CAS 10405-02-4) 및 솔리페나신 (CAS 242478-37-1, 또는 숙시네이트의 경우 CAS 242478-38-2, YM-905로도 알려지고 상표명 Vesicare로 시판)을 포함한다.

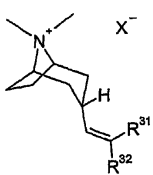
다른 적합한 항콜린제는 예를 들어 (3-엔도)-3-(2,2-디-2-티에닐에테닐)-8,8-디메틸-8-아조니아비시클로[3.2.1]옥탄 브로마이드;

(3-엔도)-3-(2,2-디페닐에테닐)-8,8-디메틸-8-아조니아비시클로[3.2.1]옥탄 브로마이드;

(3-엔도)-3-(2,2-디페닐에테닐)-8,8-디메틸-8-아조니아비시클로[3.2.1]옥탄 4-메틸벤젠술포네이트;

(3-엔도)-8,8-디메틸-3-[2-페닐-2-(2-티에닐)에테닐]-8-아조니아비시클로[3.2.1]옥탄 브로마이드; 및(또는)

(3-엔도)-8,8-디메틸-3-[2-페닐-2-(2-피리디닐)에테닐]-8-아조니아비시클로[3.2.1]옥탄 브로마이드를 포함하여 미국 특허 출원 60/487981에 개시된 화학식 (XXI)의 화합물을 포함한다.



여기서, 트로판 고리에 부착된 알킬쇄의 바람직한 배향은 엔도이고;

R^{31} 및 R^{32} 는 바람직하게는 1 내지 6개의 탄소 원자를 갖는 직쇄 또는 분지쇄 저급 알킬기, 5 내지 6개의 탄소 원자를 갖는 시클로알킬기, 6 내지 10개의 탄소 원자를 갖는 시클로알킬-알킬, 2-티에닐, 2-피리디닐, 페닐, 4개의 탄소 원자를 초과하지 않는 알킬기로 치환된 페닐 및 4개의 탄소 원자를 초과하지 않는 알콕시기로 치환된 페닐로 이루어진 군 중에서 독립적으로 선택되고;

X^- 는 N 원자의 양전하와 회합된 음이온을 나타낸다.

X^- 는 클로라이드, 브로마이드, 요오다이드, 술페이트, 벤젠 술포네이트 및 톨루엔 술포네이트일 수 있으나, 이로 제한되지 않는다.

추가적 적합한 항콜린제는 예를 들어 (엔도)-3-(2-메톡시-2,2-디-티오펜-2-일-에틸)-8,8-디메틸-8-아조니아-비시클로[3.2.1]옥탄 요오다이드;

3-((엔도)-8-메틸-8-아자-비시클로[3.2.1]옥트-3-일)-2,2-디페닐-프로피오니트릴;

(엔도)-8-메틸-3-(2,2,2-트리페닐-에틸)-8-아자-비시클로[3.2.1]옥탄;

3-((엔도)-8-메틸-8-아자-비시클로[3.2.1]옥트-3-일)-2,2-디페닐-프로피온아미드;

3-((엔도)-8-메틸-8-아자-비시클로[3.2.1]옥트-3-일)-2,2-디페닐-프로피온산;

(엔도)-3-(2-시아노-2,2-디페닐-에틸)-8,8-디메틸-8-아조니아-비시클로[3.2.1]옥탄 요오다이드;

(엔도)-3-(2-시아노-2,2-디페닐-에틸)-8,8-디메틸-8-아조니아-비시클로[3.2.1]옥탄 브로마이드;

3-((엔도)-8-메틸-8-아자-비시클로[3.2.1]옥트-3-일)-2,2-디페닐-프로판-1-올;

N-벤질-3-((엔도)-8-메틸-8-아자-비시클로[3.2.1]옥트-3-일)-2,2-디페닐-프로피온아미드;

(엔도)-3-(2-카르바모일-2,2-디페닐-에틸)-3,8-디메틸-8-아조니아-비시클로[3.2.1]옥탄 요오다이드;

1-벤질-3-[3-((엔도)-8-메틸-8-아자-비시클로[3.2.1]옥트-3-일)-2,2-디페닐-프로필]-우레아;

1-에틸-3-[3-((엔도)-8-메틸-8-아자-비시클로[3.2.1]옥트-3-일)-2,2-디페닐-프로필]-우레아;

N-[3-((엔도)-8-메틸-8-아자-비시클로[3.2.1]옥트-3-일)-2,2-디페닐-프로필]-아세트아미드;

N-[3-((엔도)-8-메틸-8-아자-비시클로[3.2.1]옥트-3-일)-2,2-디페닐-프로필]-벤즈아미드;

3-((엔도)-8-메틸-8-아자-비시클로[3.2.1]옥트-3-일)-2,2-디-티오펜-2-일-프로피오니트릴;

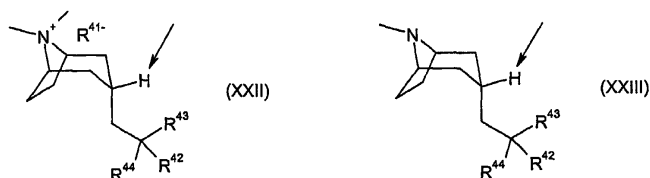
(엔도)-3-(2-시아노-2,2-디-티오펜-2-일-에틸)-8,8-디메틸-8-아조니아-비시클로[3.2.1]옥탄 요오다이드;

N-[3-((엔도)-8-메틸-8-아자-비시클로[3.2.1]옥트-3-일)-2,2-디페닐-프로필]-벤젠술폰아미드;

[3-((엔도)-8-메틸-8-아자-비시클로[3.2.1]옥트-3-일)-2,2-디페닐-프로필]-우레아;

N-[3-((엔도)-8-메틸-8-아자-비시클로[3.2.1]옥트-3-일)-2,2-디페닐-프로필]-메탄술폰아미드; 및(또는)

(엔도)-3-{2,2-디페닐-3-[(1-페닐-메타노일)-아미노]-프로필}-8,8-디메틸-8-아조니아-비시클로[3.2.1]옥탄 브로마이드를 포함하여 미국 특허 출원 60/511009에 개시된 화학식 (XXII) 또는 (XXIII)의 화합물을 포함한다.



여기서, 나타낸 H 원자는 엑소 위치에 존재하고;

R⁴¹⁻는 N 원자의 양전하와 회합된 음이온을 나타내고, R⁴¹⁻는 클로라이드, 브로마이드, 요오다이드, 술페이트, 벤젠 술폰네이트 및 톨루엔 술폰네이트일 수 있으나, 이로 제한되지 않고;

R⁴² 및 R⁴³은 직쇄 또는 분지쇄 저급 알킬기 (바람직하게는 1 내지 6개의 탄소 원자를 갖는), 시클로알킬기 (5 내지 6개의 탄소 원자를 갖는), 시클로알킬-알킬 (6 내지 10개의 탄소 원자를 갖는), 헤테로시클로알킬 (5 내지 6개의 탄소 원자 및 헤테로원자로서 N 또는 O를 갖는), 헤테로시클로알킬-알킬 (6 내지 10개의 탄소 원자 및 헤테로원자로서 N 또는 O를 갖는), 아릴, 임의로 치환된 아릴, 헤테로아릴, 및 임의로 치환된 헤테로아릴로 이루어진 군 중에서 독립적으로 선택되고;

R⁴⁴는 (C₁-C₆)알킬, (C₃-C₁₂)시클로알킬, (C₃-C₇)헤테로시클로알킬, (C₁-C₆)알킬(C₃-C₁₂)시클로알킬, (C₁-C₆)알킬 (C₃-C₇)헤테로시클로알킬, 아릴, 헤테로아릴, (C₁-C₆)알킬-아릴, (C₁-C₆)알킬-헤테로아릴, -OR⁴⁵, -CH₂OR⁴⁵, -CH₂OH, -CN, -CF₃, -CH₂O(CO)R⁴⁶, -CO₂R⁴⁷, -CH₂NH₂, -CH₂N(R⁴⁷)SO₂R⁴⁵, -SO₂N(R⁴⁷)(R⁴⁸), -CON(R⁴⁷)(R⁴⁸), -CH₂N(R⁴⁸)CO(R⁴⁶), -CH₂N(R⁴⁸)SO₂(R⁴⁶), -CH₂N(R⁴⁸)CO₂(R⁴⁵), -CH₂N(R⁴⁸)CONH(R⁴⁷)로 이루어진 군 중에서 독립적으로 선택되고;

R⁴⁵는 (C₁-C₆)알킬, (C₁-C₆)알킬(C₃-C₁₂)시클로알킬, (C₁-C₆)알킬(C₃-C₇)헤테로시클로알킬, (C₁-C₆)알킬-아릴, (C₁-C₆)알킬-헤테로아릴로 이루어진 군 중에서 독립적으로 선택되고;

R⁴⁶은 (C₁-C₆)알킬, (C₃-C₁₂)시클로알킬, (C₃-C₇)헤테로시클로알킬, (C₁-C₆)알킬(C₃-C₁₂)시클로알킬, (C₁-C₆)알킬 (C₃-C₇)헤테로시클로알킬, 아릴, 헤테로아릴, (C₁-C₆)알킬-아릴, (C₁-C₆)알킬-헤테로아릴로 이루어진 군 중에서 독립적으로 선택되고;

R⁴⁷ 및 R⁴⁸은 H, (C₁-C₆)알킬, (C₃-C₁₂)시클로알킬, (C₃-C₇)헤테로시클로알킬, (C₁-C₆)알킬(C₃-C₁₂)시클로알킬, (C₁-C₆)알킬(C₃-C₇)헤테로시클로알킬, (C₁-C₆)알킬-아릴 및 (C₁-C₆)알킬-헤테로아릴로 이루어진 군 중에서 독립적으로 선택된다.

본 발명에 유용한 보다 바람직한 화합물은

(엔도)-3-(2-메톡시-2,2-디-티오펜-2-일-에틸)-8,8-디메틸-8-아조니아-비시클로[3.2.1]옥탄 요오다이드;

(엔도)-3-(2-시아노-2,2-디페닐-에틸)-8,8-디메틸-8-아조니아-비시클로[3.2.1]옥탄 요오다이드;

(엔도)-3-(2-시아노-2,2-디페닐-에틸)-8,8-디메틸-8-아조니아-비시클로[3.2.1]옥탄 브로마이드;

(엔도)-3-(2-카르바모일-2,2-디페닐-에틸)-8,8-디메틸-8-아조니아-비시클로[3.2.1]옥탄 요오다이드;

(엔도)-3-(2-시아노-2,2-디-티오펜-2-일-에틸)-8,8-디메틸-8-아조니아-비시클로[3.2.1]옥탄 요오다이드; 및(또는)

(엔도)-3-{2,2-디페닐-3-[(1-페닐-메타노일)-아미노]-프로필}-8,8-디메틸-8-아조니아-비시클로[3.2.1]옥탄 브로마이드를 포함한다.

적합한 항히스타민제 (H1-수용체 길항제로도 불림)는 H1-수용체를 억제하고 인간에게 사용하기 안전한 것으로 알려진 임의의 하나 이상의 많은 길항제를 포함한다. 제1 세대 길항제는 에탄올아민, 에틸렌디아민 및 알킬아민의 유도체, 예를 들어 디페닐히드라민, 피릴아민, 클레마스틴, 클로로페니라민을 포함한다. 비진정성의 제2 세대 길항제는 로라티딘, 데스로라티딘, 터페나딘, 아스테미졸, 아크리바스틴, 아젤라스틴, 레보세티리진 펙소페나딘 및 세티리진을 포함한다.

바람직한 항히스타민제의 예는 로라티딘, 데스로라티딘, 펙소페나딘 및 세티리진을 포함한다.

다른 고려되는 조합제는 항-IL-4 약제 (예를 들어 항-IL-4 항체, 예를 들어 파스콜리주맵) 및(또는) 항-IL-5 약제 (예를 들어 항-IL-5 항체, 예를 들어 메폴리주맵) 및(또는) 항-IgE 약제 (예를 들어 항-IgE 항체, 예를 들어 오말리주맵 (Xolair™) 또는 탈리주맵)과 조합된 본 발명의 항체의 용도를 포함한다.

편리하게는, 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 키트를 상기 다른 의약과 함께, 임의로 사용 지시서와 함께 포함하는 제약 조성물이 본 발명에 의해 또한 고려된다.

본 발명은 또한 hIL-13과 hIL-13R 사이의 상호작용의 조절에 반응성인 질병의 치료를 위한, 치료 유효량의 본원에 기재된 모노클로날 치료 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 제약 조성물을 고려한다.

본 발명에 따르면, 치료 유효량의 모노클로날 인간화 치료 항체를 포함하는 제약 조성물이 제공되고, 상기 항체는 서열 11, 12, 13, 14로 이루어진 군 중에서 선택된 VH 도메인 및 서열 15, 16으로 이루어진 군 중에서 선택된 VL 도메인을 포함한다.

본 발명에 따르면, 모노클로날 치료 항체를 포함하는 제약 조성물이 제공되고, 상기 항체는 서열 18, 19, 20, 21로 이루어진 군 중에서 선택된 중쇄 및 서열 22, 23으로 이루어진 군 중에서 선택된 경쇄를 포함한다.

본 발명에 따르면, 서열 18의 중쇄 및 서열 22의 경쇄를 포함하는 모노클로날 치료 항체 및 제약학상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물이 제공된다.

본 발명에 따르면, 서열 18의 중쇄 및 서열 22의 경쇄를 포함하는 (또는 필수적으로 이루어지는) 모노클로날 항체 및 제약학상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물이 제공된다.

본 발명에 따르면, 제약학상 허용되는 담체 및 치료 유효량의 서열 18의 중쇄 및 서열 22의 경쇄를 포함하는 치료 항체의 모노클로날 집단을 포함하는 제약 조성물이 제공된다.

5. 임상 용도

본 발명의 항체는 아토피성 질병/질환 및 만성 염증성 질병/질환의 치료에 사용될 수 있다. 특히 흥미로운 것은 천식, 예를 들어 알레르기성 천식, 특히 중증 천식 (전신 투여된 코르티코스테로이드를 포함하는 현재의 치료법에 미반응성인 천식; Busse WW et al, J Allergy Clin. Immunol 2000, 106:1033-1042 참조), "난치성 (difficult)" 천식 (처방된 흡입된 스테로이드의 최대 권장 투여량에도 불구하고 조절할 수 없는 것을 특징으로 하는 천식 표현형, Barnes PJ (1998), Eur Respir J 12:1208-1218 참조), "불안정성 (brittle)" 천식 (흡입된 스테로이드의 고투여량에도 불구하고 넓은 피크 호기 유량 (PEF) 변동성을 유지하는, 중증의 불안정한 천식 환자의 하위군을 규정, Ayres JG et al (1998) Thorax 58:315-321 참조), 야간 천식, 월경전 천식, 스테로이드 내성 천식 (Woodcock AJ (1993) Eur Respir J 6:743-747 참조), 스테로이드 의존성 천식 (경구 스테로이드의 고투여량으로만 조절될 수 있는 천식), 아스피린 유발 천식, 성인 발병 천식, 소아 천식 치료에서의 그의 용도이다. 본 발명의 항체는 급성 천식 에피소드 (천식 지속 상태)의 예방, 그 빈도의 감소 또는 그 효과의 진정을 위해 사용될 수 있다. 본 발명의 항체는 또한 천식의 치료에 사용된 다른 의약의 필요한 투여 (투여량 또는 투여 빈도의 측면에서)를 감소시키기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 항체는 천식의 스테로이드 치료, 예를 들어 코르티코스테로이드 치료를 위해 필요한 투여량을 감소 ("스테로이드 절약")시키기 위해 사용될 수 있다. 본 발명의 항체를 사용하여 치료될 수 있는 다른 질병 또는 질환은 아토피성 피부염, 알레르기성 비염, 크론병, 만성 폐쇄성 폐질환 (COPD), 호산구성 식도염, 섬유증 질병 또는 질환 예를 들어 특발성 폐 섬유증, 진행성 전신경화증 (공피증), 간 섬유증, 간 육아종, 주혈흡충증, 리슈만편모충증, 및 세포 주기 조절의 질병, 예를 들어 호지킨병, B 세포 만성 림프구성 백혈병을 포함한다. 본 발명의 항체를 사용하여 치료될 수 있는 추가의 질병 또는 질환을 상기 발명의 배경 섹션에 상세히 설명한다.

본 발명의 한 실시태양에서, 환자에게 치료 유효량의 본 발명의 항체를 투여하는 단계를 포함하는, 코르티코스테로이드를 사용하는 치료에 불응성인 천식 질환에 걸린 인간 환자를 치료하는 방법이 제공된다.

다른 실시태양에서, 환자에게 치료 유효량의 본 발명의 항체를 투여하는 단계를 포함하는, 인간 환자에서 급성 천식 발작을 예방하는 방법이 제공된다.

다른 실시태양에서, 환자에게 치료 유효량의 본 발명의 항체를 투여하는 단계를 포함하는, 인간 환자에서 급성 천식 발작의 빈도를 감소시키고(시키거나) 효과를 경감시키는 방법이 제공된다.

본 발명의 다른 실시태양에서, 인간 환자에게 치료 유효량의 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 투여하는 단계를 포함하는, 상기 환자에서 염증성 및(또는) 알레르기성 손상 (insult) 후에 T 헬퍼 세포 반응을 Th1 타입 반응 쪽으로 편향시키는 방법이 제공된다.

본 발명의 다른 실시태양에서, 환자에게 치료 유효량의 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 투여하는 단계를 포함하는, 천식, 예를 들어 중증 천식에 걸린 Q130hIL-13 변이체를 갖는 인간 환자를 치료하는 방법이 제공된다.

본 발명을 주로 인간 질병 또는 질환의 치료와 관련하여 설명하였지만, 본 발명은 비인간 포유동물의 유사한 질병 또는 질환 치료에도 사용될 수 있다.

이제 본 발명을 단지 예시하고자 설명한다.

실시예

1. 모노클로날 항체의 생성 및 마우스 모노클로날 항체 6A1의 특성화

모노클로날 항체 (mAb)는 일반적으로 문헌 [E Harlow and D Lane, Antibodies a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988]에 제시된 방법에 따라 하이브리도마 세포에 의해 제조된다. 마우스 골수종 세포와 표적항원으로 면역처리한 마우스로부터의 B-림프구의 융합의 결과로, 하이브리도마 세포는 골수종 융합 파트너에 의해 불사 상태가 되고, 항체를 생산하는 능력은 B 림프구에 의해 제공된다.

이. 콜라이 (캠브리지 바이오사이언스 (Cambridge Bioscience), 카탈로그 번호 CH-013)로부터 유래한 2 μ g의 재조합 인간 IL-13으로 5마리의 SJL 마우스를 면역처리하였다. 마우스에서 고역가의 항-인간 IL-13 항체 면역 반응을 발생시키기 위해서 면역처리 계획을 사용하였다. 64일에 걸친 5마리의 면역처리 후에, 마우스를 치사시키고 비장 세포를 수거하였다. 3마리의 마우스로부터의 비장 세포를 제거하고, B 림프구를 PEG1500 (보링거 (Boehringer))을 사용하여 P3X 세포로부터 유래한 마우스 골수종 세포와 융합시켜 하이브리도마를 생성시켰다. 개개의 하이브리도마 세포주를 제한 희석 (E Harlow and D Lane, 상기 문헌)에 의해 클로닝하였다. 단일 콜로니를 함유하는 웰은 현미경으로 확인하고, 상등액을 활성화에 대해 시험하였다. 가장 활성이 큰 클론으로부터의 세포를 동결보존, 항체 생산 등을 위해 팽창시켰다.

초기에, 하이브리도마 상등액을 샌드위치 분석 포맷으로 이. 콜라이-발현된 재조합 det-1 태깅된 (tagged) 인간 IL-13 단백질 (자체 제조)에 대한 결합 활성에 대해 스크리닝하였다. 상기 양성 하이브리도마의 2차 스크리닝은 det-1 태깅된 인간 IL-13 단백질에 대한 결합을 검출하기 위해서 BIAcore™ 방법을 사용하여 완결하였다. 이어서 이들 하이브리도마로부터의 샘플을 TF-1 세포 생물학적 분석에서 이. 콜라이-발현된 재조합 인간 IL-13 (캠브리지 바이오사이언스, 카탈로그 번호 CH-013)의 생물활성을 증화시키는 능력에 대해 시험하였다.

인간 IL-13 중화 생물학적 분석으로 확인한 6개의 양성 샘플을 제한 희석에 의해 서브클로닝하여 안정한 모노클로날 세포주를 생성시켰다. 무혈청 조건에서 세포 공장에서 성장한 상기 하이브리도마로부터의 면역글로불린을 고정된 단백질 A 컬럼을 사용하여 정제하였다. 이어서, 상기 정제된 mAb를 다음 분석 시스템에서 재스크리닝하였다.

- 이. 콜라이-발현된 재조합 인간 IL-13에 대한 결합 (샌드위치 ELISA 포맷에서)
- 이. 콜라이-발현된 재조합 det-1 태깅된 인간 IL-13의 두 IL-13 수용체 사슬에 대한 결합의 억제 (샌드위치 ELISA 포맷에서)
- 인간 또는 사이노몰거스 이. 콜라이-발현된 재조합 IL-13의 중화 (TF-1 세포 생물학적 분석에서)
- 포유동물-발현된 인간 IL-13의 중화 (TF-1 세포 생물학적 분석에서)
- 이. 콜라이-발현된 재조합 Q130 인간 IL-13 변이체의 중화 (TF-1 세포 생물학적 분석에서)
- 항-IL-4 ELISA에서 인간 IL-4에 대한 mAb 교차반응성의 평가에 의한 인간 IL-13에 대한 결합 특이성 및 IL5 중화 생물학적 분석에서 인간 IL5에 대한 mAb 교차반응성의 평가
- 인간 IL-13에 대한 결합 친화도 측정을 위한 BIAcore™ 분석

모노클로날 항체 6A1은 인간 및 사이노몰거스 IL-13 생물활성을 모두 중화시키는 항체로서 확인되었다. 다음 분석은 이들 분석에서 모노클로날 항체 6A1에 대한 프로필을 설명한다.

1.1 이. 콜라이-발현된 재조합 인간 IL-13에 대한 결합

6A1은 샌드위치 ELISA에서 이. 콜라이-발현된 재조합 인간 IL-13에 결합하였다. 실질적으로 섹션 7에 설명된 바와 같은 방법. 도 1 참조.

1.2 ELISA 포맷에서 IL-13Ra1 및 IL-13Ra2에 대한 이. 콜라이-발현된 재조합 det-1 태깅된 인간 IL-13 결합의 억제

6A1은 두 인간 IL-13 수용체 사슬에 대한 이. 콜라이-발현된 재조합 det-1 태깅된 인간 IL-13의 결합을 억제하였다. 또한, 6A1은 상업적으로 입수가 가능한 항-인간 IL-13 폴리클로날 및 항-인간 IL-13 모노클로날 항체 시약 (알앤디 시스템즈 (R&D Systems))보다 더 효과적으로 결합을 억제하였다. 모노클로날 항체 6A1에 의한 인간 IL-13Ra1에 대한 인간 IL-13 결합의 억제를 위한 IC_{50} 값은 $0.165 \mu\text{g/ml}$ 로 계산되었다. 모노클로날 항체 6A1에 의한 인간 IL-13Ra2에 대한 인간 IL-13 결합의 억제를 위한 IC_{50} 값은 $0.056 \mu\text{g/ml}$ 로 계산되었다 (도 2A 및 2B 참조). 특이성이 무관한 대조군 IgG는 검출 가능한 활성을 보이지 않았다.

1.3 TF-1 세포 증식 생물학적 분석에서 이. 콜라이-발현된 재조합 인간 및 사이노몰거스 IL-13의 중화

TF-1 세포는 인간 IL-13 및 사이노몰거스 IL-13에 반응하여 증식할 수 있다. 인간 및 사이노몰거스 IL-13-유도 TF-1 세포 증식에 대한 항-IL-13 mAb의 중화 능력을 평가하기 위한 생물학적 분석을 개발하였다. 6A1은 TF-1 세포 생물학적 분석에서 재조합 인간 및 사이노몰거스 IL-13의 생물활성을 모두 중화시켰다. 또한, 이는 상업적으로 입수가 가능한 항-인간 IL-13 폴리클로날 및 항-인간 IL-13 모노클로날 항체 시약 (알앤디 시스템즈)보다 더 강하게 인간 및 사이노몰거스 IL-13을 모두 중화시켰다. 도 3 참조.

모노클로날 항체 6A1에 의한 TF-1 세포 생물학적 분석에서 5 ng/ml 이. 콜라이-발현된 재조합 인간 IL-13 생물활성의 중화를 위한 평균 ND_{50} 값은 $0.0783 \mu\text{g/ml}$ 로 계산되었다. 모노클로날 항체 6A1에 의한 TF-1 세포 생물학적 분석에서 5 ng/ml 이. 콜라이-발현된 재조합 사이노몰거스 IL-13 생물활성의 중화를 위한 평균 ND_{50} 값은 $0.04 \mu\text{g/ml}$ 로 계산되었다. [ND_{50} (중화 용량) 값은 IL-13의 설정 농도에 반응하여 TF-1 세포 증식을 50% 감소시키는데 필요한 모노클로날 항체의 농도이다].

1.4 TF-1 세포 증식 생물학적 분석에서 포유동물-발현된 (CHO 세포) 인간 IL-13의 중화

CHO 세포로부터 발현된 인간 IL-13에 대한 모노클로날 항체 6A1의 중화 용량을 TF-1 세포 증식 분석으로 평가하였다. 6A1은 ND_{50} 값으로 측정시에 상업적으로 입수가 가능한 항-인간 IL-13 폴리클로날 시약보다 더 강하게 포유동물-발현된 인간 IL-13을 중화시켰다. 모노클로날 항체 6A1에 의한 TF-1 세포 생물학적 분석에서 $\sim 50 \text{ ng/ml}$ 포유동물-발현된 인간 IL-13의 중화를 위한 ND_{50} 값은 $0.037 \mu\text{g/ml}$ 로 계산되었다. 도 4 참조.

1.5 TF-1 세포 증식 생물학적 분석에서 재조합 Q130 인간 IL-13 변이체의 중화

이. 콜라이-발현된 재조합 Q130 인간 IL-13 (페프로테크 (Peprotech), 카탈로그 번호 200-13A)에 대한 모노클로날 항체 6A1의 중화 용량은 TF-1 세포 증식 분석으로 평가하였다. 6A1은 상업적으로 입수가 가능한 항-인간 IL-13 폴리클로날 시약보다 더 강하게 Q130 인간 IL-13을 중화시켰다. 모노클로날 항체 6A1에 의한 TF-1 세포 생물학적 분석에서 60 ng/ml Q130 인간 IL-13 생물활성의 중화를 위한 ND_{50} 값은 $0.11 \mu\text{g/ml}$ 로 계산되었다. 도 5 참조.

1.6 인간 IL-13에 대한 결합 특이성

인간 IL-4는 구조적으로 및 기능적으로 인간 IL-13과 대부분의 특성을 공유하기 때문에, 인간 IL-13에 대한 모노클로날 항체 6A1의 특이성을 인간 IL-4 결합 ELISA로 평가하였다. 6A1은 검출가능하게 이. 콜라이-발현된 재조합 인간 IL-4에 결합하지 않았고, 이것은 상기 모노클로날 항체의 인간 IL-13에 대한 높은 수준의 특이성을 나타낸다. 또한, 6A1은 TF-1 세포 생물학적 분석에서 이. 콜라이-발현된 재조합 인간 IL5의 생물활성을 검출가능하게 교차중화시키지 않았다. 도 6 및 7 참조.

1.7 BIAcore™ 분석

재조합 인간 및 사이노몰거스 IL-13에 대한 6A1의 친화도는 BIAcore™ 분석으로 평가하였다. 표 1 참조.

[표 1]

IL13 샘플	온 레이트 Ka (1/Ms)	오프 레이트 Kd (1/s)	친화도 상수 (KD)
det-1 태깅된 인간 IL13	2.25×10^6	7.2×10^{-5}	32 pM
인간 IL13 (CA)	6.82×10^5	1.84×10^{-4}	270 pM
사이노몰거스 IL-13 (CA)	9.14×10^5	5.6×10^{-5}	61.2 pM

이들 데이터는 6A1이 인간 및 사이노몰거스 IL-13 모두에 대한 친화도를 가짐을 나타낸다. [2가지 상이한 인간 IL-13 샘플 (모두 이. 콜라이에서 생성됨)을 본 분석에 사용하였다. IL-13은 이. 콜라이 내에서 생산될 때 실질적으로 불용성이지만, 시험관 내에서 가용화되고 재폴딩될 수 있다. 2개의 재폴딩된 IL-13 샘플의 품질 차이는 이들 인간 IL-13 샘플 각각에 대한 결합 친화도의 차이를 설명할 수 있다].

2. 클론 6A1의 가변 영역의 클로닝

총 RNA를 클론 6A1 하이브리도마 세포로부터 추출하고, 소정의 이소형 (IgG1/κ)에 따라 쥐 리더 서열 및 항체 불변 도메인에 특이적인 프라이머를 사용하여 중쇄 및 경쇄 가변 도메인의 cDNA를 역전사에 의해 생산하였다. 이어서, 가변 중쇄 및 경쇄 도메인의 cDNA를 서열 결정을 위해 벡터 pCR2.1에 클로닝하였다.

2.1 RNA 추출

프로메가 (Promega)의 SV 총 RNA 단리 시스템을 제조자의 지시에 따라 사용하여 총 RNA를 약 10^6 세포의 하이브리도마 클론 6A1의 펠렛으로부터 추출하였다.

2.2 역전사

쥐 리더 서열 및 쥐 IgG1/κ 불변 영역에 특이적인 프라이머를 사용하여 RNA를 가변 중쇄 및 경쇄 도메인의 cDNA를 생성시키기 위해 역전사시켰다. 사용된 프라이머의 혼합물은 문헌 [Jones ST and Bendig MM Bio/technology 9:88-89 (1991)]에 제시된 바 있다.

쥐 VH 및 VL 리더 서열 전방향 프라이머의 풀을 50 μM로 제조하였다. 쥐 IgG1 및 κ 불변 영역 역방향 프라이머도 50 μM로 제조하였다.

2.3 역전사 PCR (RT-PCR)

프로메가의 액세스 (Access) RT-PCR 시스템을 제조자의 지시에 따라 사용하여 가변 중쇄 및 경쇄 영역을 코딩하는 RNA의 역전사를 2회 수행하였다. VH 및 VL 전방향 및 역방향 프라이머는 상기 설명한 바와 같았다.

2.4 RT-PCR 생성물의 겔 정제

RT-PCR의 생성물 (2xVH 및 2xVL)을 0.01% 에티듐 브로마이드를 포함하는 예비 1% 아가로스 겔 상의 겔 로딩 용액에 로딩하고, 100V에서 1 h 동안 TAE 버퍼에서 전개시키고, V 영역 밴드를 절제하였다. 또한, VH 및 VL 밴드를 확인하기 위해서 100 bp DNA 래더를 겔 상에서 전개시켰다.

DNA 단편을 추출하고, 퀴아젠 (Qiagen)의 QIAquick™ 겔 추출 키트를 제조자의 지시에 따라 사용하여 겔로부터 정제하였다.

2.5 라이게이션

인비트로젠 (Invitrogen)의 TA 클로닝 키트를 제조자의 지시에 따라 사용하여 정제된 RT-PCR 단편 (2xVH 및 2xVL)을 pCR2.1 벡터 내로 클로닝하였다.

2.6 형질전환

라이게이션된 플라스미드를 TA 클로닝 키트 지시에 따라 TOP10F' 세포 내로 형질전환시켰다. 50 μ l 및 200 μ l의 형질전환된 세포를 100 μ g/ml 암피실린을 포함하는 L-아가 플레이트 상에 퍼지게 하고, DMF 중의 8 μ l의 500 mM IPTG 용액 및 16 μ l의 50 mg/ml X-Gal 용액으로 코팅하였다. 플레이트를 37°C에서 철야 인큐베이팅하였다.

2.7 서열 결정

콜로니를 집어 100 μ g/ml 암피실린으로 보충된 5 ml LB 배지에서 37°C에서 철야 배양하였다. 퀴아젠 QIAprep Spin Miniprep 키트를 제조자의 지시에 따라 사용하여 6A1 VH 및 VL 도메인을 포함하는 pCR2.1 플라스미드를 추출하고 정제하였다. 프라이머 T7, M13 전방향 및 M13 역방향을 사용하여 VH 및 VL 도메인의 서열을 결정하였다.

6A1 VH 영역 아미노산 서열 (2회의 RT-PCR 반응으로부터의 10개 클론의 컨센서스): 서열 7

6A1 VL 영역 아미노산 서열 (2회의 RT-PCR 반응으로부터의 10개 클론의 컨센서스): 서열 8

3. 키메릭 항체

모 쥐 V 영역으로 구성된 키메릭 항체 (섹션 2.7에서 설명됨)를 인간 IgG1/k 야생형 C 영역 상에 이식하였고, 이것은 정확한 쥐 V 영역의 클로닝을 확인하고 인간화 구성체의 시험시에 참고물질로서 사용하기 위해 디자인하였다. 키메릭 항체를 CHO 세포에서 발현시키고, 정제하여 ELISA에 의해 인간 IL-13에 대한 결합에 대해 시험하였다.

3.1 PCR 증폭

포유동물 발현 벡터 RId 및 RIn 내로 클로닝하기 위해 필요한 제한 부위를 도입하기 위해 클로닝된 쥐 V 영역을 PCR에 의해 증폭하였다. VH 도메인을 프레이밍하고, 인간 γ 1 야생형 C 영역을 포함하는 변형 RId 벡터 내로의 클로닝을 허용하기 위해서 HindIII 및 SpeI 부위를 디자인하였다. VL 도메인을 프레이밍하고, 인간 κ C 영역 영역을 포함하는 변형 RIn 벡터 내로의 클로닝을 허용하기 위해서 HindIII 및 BsiWI 부위를 디자인하였다.

VH 전방향 프라이머:

5'-GAT GAA GCT TGC CAC CAT GAA ATG CAG CTG GGT CAT C-3' (서열 86)

HindIII 제한 부위는 밑줄로 표시하고, Kozak 서열은 굵은 글씨로 표시하였다.

VH 역방향 프라이머:

5'-GAT GGA CTA GTG TTC CTT GAC CCC AGT A-3' (서열 87)

SpeI 제한 부위는 밑줄로 표시하였다.

VL 전방향 프라이머:

5'-GAT GAA GCT TGC CAC CAT GAA GTT GCC TGT TAG GCT G-3' (서열 88)

HindIII 제한 부위는 밑줄로 표시하고, Kozak 서열은 굵은 글씨로 표시하였다.

VL 역방향 프라이머:

5'-GAT GCG TAC GTT TGA TTT CCA GCT TGG TGC C-3' (서열 89)

BsiWI 제한 부위는 밑줄로 표시하였다.

PCR 반응: 물 66 μl

10x PCR 버퍼 10 μl

dNTP (2 mM) 10 μl

프라이머 1 (5 μM) 4 μl

프라이머 2 (5 μM) 4 μl

AmpliTaq 폴리머라제 2 μl

정제된 플라스미드 4 μl

총 부피 100 μl

프라이머 1: VH 또는 VL 전방향 프라이머

프라이머 2: VH 또는 VL 역방향 프라이머

정제된 플라스미드: 퀴아겐 Minipreps에 의해 정제된 pCR2.1 VH 또는 VL 플라스미드 (200x 희석)

PCR 사이클: 1 - 95°C, 4분

2 - 95°C, 1분

3 - 55°C, 1분

4 - 72°C, 1분

5 - 72°C, 7분

단계 2 내지 4: 30회 반복

3.2 포유동물 발현 벡터 내로의 클로닝

퀴아겐의 MinElute PCR 정제 키트를 제조자의 지시에 따라 사용하여 PCR 생성물을 정제하였다.

VH PCR 생성물 및 RId hC γ 1 wt 포유동물 발현 벡터를 HindIII-SpeI로 소화하였다:

10x 버퍼 (NEBuffer2) 5 μl

BSA 100x (NEB) 0.8 μl

DNA 5 μl

HindIII (프로메가) 2 μl

SpeI (NEB) 2 μl

물 35.5 μl

총 부피 50 μl

DNA: 정제된 VH PCR 생성물 또는 RId hC γ 1 wt 벡터 (0.25 mg/ml)를 37°C에서 2시간 인큐베이팅하였다.

VL PCR 생성물 및 RIn hC κ 포유동물 발현 벡터를 HindIII-BsiWI로 소화하였다.

10x 버퍼 (NEBuffer2) 5 μl

DNA 5 μl

HindIII (프로메가) 2 μl

물 38 μl

총 부피 50 μl

DNA: 정제된 VL PCR 생성물 또는 RIn hC κ 벡터 (0.25 mg/ml)를 37°C에서 2시간 인큐베이팅하였다. 2 μl 의 BsiWI (NEB)를 첨가하고, 55°C에서 2시간 인큐베이팅하였다.

제한 소화 생성물을 0.01 % 에티듐 브로마이드를 포함하는 예비 1% 아가로스 겔 상의 겔 로딩 용액에 로딩하고, 100V에서 1시간 동안 TAE 버퍼 중에서 전개시키고, RId 및 RIn 벡터 및 VH 및 VL PCR 단편 밴드를 절제하였다. VH, VL 및 벡터 밴드를 확인하기 위해서 100 bp DNA 래더도 전개시켰다. 퀴아겐의 QIAquick 겔 추출 키트를 제조자의 지시에 따라 사용하여 DNA를 추출하고 정제하였다.

HindIII-SpeI 소화된 VH PCR 단편을 HindIII-SpeI 소화된 RId hC γ 1 wt 벡터 내로 라이게이션시켰다. HindIII-BsiWI 소화된 VL PCR 단편을 HindIII-BsiWI 소화된 RIn hC κ 벡터 내로 라이게이션시켰다. 라이게이션은 프로메가의 LigaFast Rapid DNA 라이게이션 시스템을 제조자의 지시에 따라 사용하여 수행하였다.

VH: 벡터: HindIII-SpeI 소화된 RId hC γ 1 wt

삽입물: HindIII-SpeI 소화된 VH PCR 단편

VL: 벡터: HindIII-BsiWI 소화된 RIn hC- κ

삽입물: HindIII-BsiWI 소화된 VL PCR 단편

라이게이션된 생성물을 DH5 α 적격 세포 내로 형질전환시켰다. 200 μl DH5 α 바이알을 빙상에서 해동시켰다. 50 μl 분취액을 형질전환 튜브에서 제조하였다. 2 μl 의 라이게이션 혼합물을 첨가하고, 피펫 끝부분으로 부드럽게 혼합한 후, 30분 동안 빙상에서 인큐베이팅하였다. 혼합물을 진탕하지 않으면서 45초 동안 42°C에서 인큐베이팅하였다. 이어서, 이를 2분 동안 얼음으로 옮겼다. 450 μl SOC 배지를 첨가하고, 튜브를 1h 동안 37°C에서 진탕 인큐베이터에서 인큐베이팅하였다. 100 μl 의 배양액을 100 $\mu\text{g/ml}$ 암피실린으로 보충된 L-아가 플레이트 상에 퍼지게 하고, 37°C에서 철야 인큐베이팅하였다.

3.3 서열 결정

VH 및 VL 클론을 100 µg/ml 암피실린으로 보충된 5 ml LB 배지 중에서 37°C에서 철야 배양하였다. 퀴아겐의 QIAprep Spin Miniprep 키트를 제조자의 지시에 따라 사용하여 각각 VH 및 VL 도메인을 포함하는 RId 및 RIn 플라스미드를 추출하고 정제하였다. RId 벡터 내의 전방향 프라이머 및 인간 C γ 1 영역 내의 시그널 서열 및 역방향 프라이머를 사용하여 VH 영역의 서열을 결정하였다.

RIn 벡터 내의 전방향 프라이머 및 인간 C κ 영역 내의 시그널 서열 및 역방향 프라이머를 사용하여 VL 영역의 서열을 결정하였다. 정확한 VH 및 VL 서열을 갖는 클론을 확인하고, CHO 세포에서의 발현을 위한 플라스미드를 제조하였다.

3.4 CHO 세포에서 키메라 항체 발현

각각 6A1 VH 및 VL 도메인을 포함하는 RId 및 RIn 플라스미드를 CHO 세포 내로 일시적으로 동시형질감염시켜 발현시켰다. 생산된 키메라 항체를 단백질 A 세파로스 상에서 친화도 크로마토그래피에 의해 세포 배양 상등액으로부터 정제하였다.

3.4.1 플라스미드 정제

RId-6A1VH 및 RIn-6A1VL 플라스미드를 포함하는 DH5 α 세포를 100 µg/ml 암피실린으로 보충된 5 ml의 LB 배지에서 진탕 인큐베이터에서 8h 동안 37°C에서 배양하였다. 100 µg/ml 암피실린으로 보충된 200 ml의 LB 배지에 1 ml의 1일 배양액을 접종하고, 진탕 인큐베이터에서 37°C에서 철야 인큐베이션하였다. 퀴아겐의 QIAfilter 플라스미드 맥시 (Maxi) 키트를 제조자의 지시에 따라 사용하여 플라스미드를 추출하고, 정제하였다. 에탄올 펠렛을 200 µl TE 버퍼에 재현탁시키고, 플라스미드 농도를 원액의 100배 희석 후에 260 nm에서의 흡광도에 의해 측정하였다.

3.4.2 형질감염

CHO 세포를 37°C에서 4x175cm² BD Falcon 조직 배양 플라스크에서 초저 소 태아 혈청 및 1% 페니실린-스트렙토마이신으로 보충된 둘베코 (Dulbecco)의 글루타맥스 (Glutamax)-1 함유 MEM (DMEM) 배지에서 융합시까지 배양하였다. 각각의 플라스크에 대해, 50 ml Falcon 튜브에 다음 물질을 첨가하고 혼합하였다.

8 ml 글루타맥스-1 함유 옵티멤 (Optimem) 1

20 µg RId-6A1VH 정제된 플라스미드

20 µg RIn-6A1VL 정제된 플라스미드

240 µl 복탕성 하의 TransFast 형질감염 시약

혼합물을 실온에서 10-15분 동안 인큐베이션하였다. DMEM 배지를 플라스크에서 제거하고, 혼합물을 볼텍싱한 후 플라스크에 넣었다. 혼합물을 37°C에서 1h 동안 인큐베이션하였다. 32 ml 옵티멤을 플라스크에 첨가하고, 37°C에서 48-72h 동안 인큐베이션하였다.

3.4.3 키메라 항체의 정제

모든 175 cm² 플라스크로부터의 배지를 모아서 1500 rpm에서 3분 동안 MSE Mistral 2000에서 원심분리하고, 상등액을 500 mL 필터 시스템 0.22 µm CA에 통과시켰다. 항체를 Unicorn 소프트웨어를 사용하여 아머샴 바이오사이언시스 (Amersham Biosciences) Akta Explorer 상에서 투명한 상등액으로부터 정제하였다. 사용된 컬럼은 1 ml HiTrap r단백질 A 세파로스 FF이었다. 유속은 1 ml/min이었다.

컬럼을 10 CV의 둘베코 PBS로 평형화시킨 후, 펌프 A를 통해 투명한 상등액을 로딩하였다. 컬럼을 20 CV의 둘베코 PBS로 세척하고, 펌프 A를 세척하고, 상등액의 완전한 소실을 보장하기 위해 추가의 10 CV의 둘베코 PBS를 컬럼에 통과시켰다.

항체를 10 CV의 ImmunoPure IgG 용출 버퍼 (피어스 (Pierce))로 용출시키고, 100 μ l의 1 M Trizma-HCl (pH8.0) 중화 버퍼를 함유하는 1 ml 분획에 수거하였다. 컬럼을 5 CV의 돌베코 PBS로 재평형화시켰다.

10 부피의 ImmunoPure IgG 용출 버퍼 + 1 부피의 1 M Trizma-HCl (pH8.0)을 포함하는 블랭크 용액에 대해 280 nm에서의 흡광도를 관독하여 용출액 분획 중의 항체를 정량화하고, 충분한량의 순수 항체를 갖는 분획을 모아서 100 μ l 분취액 중에 -20℃에서 보관하였다.

3.4.4 키메릭 항체의 분석

상등액 및 정제된 6A1 키메릭 항체 (6A1c)를 인간 및 사이노몰거스 IL-13 결합 ELISA로 분석하였다. 키메릭 6A1 모노클로날 항체로 일시적으로 형질감염된 CHO 세포로부터의 상등액은 샌드위치 ELISA에서 이. 콜라이-발현된 재조합 인간 및 사이노몰거스 IL-13 모두에 결합되었다. 또한, 정제된 항체도 샌드위치 ELISA에서 이. 콜라이-발현된 재조합 인간 및 사이노몰거스 IL-13에 결합하였다 (데이타 미제시). 도 8 참조.

사이노몰거스 IL-13에 대한 아미노산 서열 및 cDNA 서열 (시그날 서열 포함)을 각각 서열 90 및 91로서 나타낸다.

이들 결과는 정확한 6A1 가변 영역이 성공적으로 클로닝되어 인간 및 사이노몰거스 IL-13에 결합할 수 있는 항원 결합 키메릭 항체를 생성시켰음을 확인해 준다.

4. 클론 6A1의 인간화

4.1 인간화 전략

4.1.1 마우스 데이타베이스의 탐색

6A1 VH 아미노산 서열에 대해 가장 큰 상동성을 갖는 12개의 마우스 서열 및 VL 아미노산 서열에 대해 가장 큰 상동성을 갖는 11개의 마우스 서열을 펩티드 데이타베이스 (Genbank)를 탐색하여 확인하였다. 6A1 VH 아미노산 서열을 데이타베이스 탐색에 의한 모든 12개의 마우스 서열과 비교하고, 다음 프레임워크 잔기를 유의한 것으로서 확인하였다:

위치 6A1 VH 마우스 발생

19 R K 12/12

38 I K 12/12

81 R Q 12/12

위치는 카바트 등의 넘버링 시스템에 따른 것이다.

6A1 VL 아미노산 서열을 데이타베이스 탐색에 의한 11개의 마우스 서열과 비교하였고, 어떠한 프레임워크 잔기도 유의한 것으로 확인되지 않았다.

4.1.2. 인간 데이타베이스 검색

EasyBlast를 사용하여 펩티드 데이타베이스에서 6A1 VH 및 VL 프레임워크에 가장 큰 상동성을 갖는 인간 프레임워크 서열을 확인하였다.

인간화를 위해 그의 하기 프레임워크가 선택된 6A1 VH에 대해 한 세트의 인간 서열을 확인하였다: 서열 92

다음 프레임워크 잔기가 친화도 회복에 잠재적으로 중요한 것으로 확인되었고, 복귀 돌연변이될 필요가 있을 수 있다.

위치 (카바트#) 인간 VH 6A1 VH

19 K R

38 R I

73 E T

81 E R

상이한 복귀 돌연변이를 갖는 4개의 인간화 VH 구성체를 디자인하였고, 하나는 상기 제시된 CDR의 정의에 따른 직선 이식이고 (A1), 나머지는 상이한 복귀 돌연변이를 갖는다 (A2, A3, A4). 따라서, A2는 A1 + R38I이고, A3은 A2 + E73T 이고, A4는 A3 + K19R + E81R이다.

인간화를 위해 그의 하기 프레임워크가 선택된 6A1 VL에 대해 한 세트의 인간 서열을 확인하였다: 서열 93

다음 프레임워크 잔기가 친화도 회복에 잠재적으로 중요한 것으로 확인되었고, 복귀 돌연변이될 필요가 있을 수 있다.

위치 (카바트#) 마우스 6A1 VL 인간 VL

85 V I

2개의 구성체가 디자인되었고, 하나는 직선 이식이고 (L1), 다른 하나는 복귀 돌연변이 (L2) (즉 I85V를 갖는 L1)이다.

인간화 VH 구성체 A1:

서열 11

인간화 VH 구성체 A2:

서열 12

인간화 VH 구성체 A3:

서열 13

인간화 VH 구성체 A4:

서열 14

인간화 VL 구성체 L1:

서열 15

인간화 VL 구성체 L2:

서열 16

4.2 6A1의 인간화

인간화 VH 및 VL 구성체는 RId 및 RIn 포유동물 발현 벡터 내로 클로닝된 제한 부위 및 인간 시그널 서열을 포함하는 겹치는 올리고뉴클레오타이드의 축적에 의해 드 노보 (de novo)로 제조하였다. 인간 γ 1 야생형 불변 도메인을 포함하는 RId 내로 클로닝하기 위해 인간 시그널 서열을 포함하는 VH 도메인을 프레임하기 위해 HindIII 및 SpeI 제한 부위를 도입하였다. 인간 카파 불변 도메인을 포함하는 RIn 내로 클로닝하기 위해 인간 시그널 서열을 포함하는 VL 도메인을 프레임하기 위해 HindIII 및 BsiWI 제한 부위를 도입하였다.

인간 시그날 서열: 서열 17

4개의 인간화 VH 구성체 및 2개의 인간화 VL 구성체를 디자인하였다. 이것은 8개의 상이한 중쇄-경쇄 조합을 생성시킬 것이다.

약 18개 염기가 겹치는 약 60개 염기 길이의 약 10개의 올리고뉴클레오타드를 축적을 위해 디자인하였다.

4.2.1 올리고뉴클레오타드 축적

올리고뉴클레오타드 풀 용액을 5 μl 의 각각의 올리고뉴클레오타드 원액으로부터 100 μM 로 제조하였다. 겹치는 올리고뉴클레오타드의 축적에 의한 인간화 VH 및 VL 유전자의 합성은 일반적으로 문헌 [Ertl PF et al (2003) Methods 31:199-206]에 기재된 소프트웨어를 사용하여 문헌 [Stemmer WP et al (1995) Gene 164(1):49-53]에 따라 수행하였다.

4.2.1.1 대표적인 조립 PCR 반응:

물 41.5 μl

10xProofStart PCR 버퍼 5 μl

dNTP (10 mM) 1.5 μl

올리고뉴클레오타드 풀 1 μl

ProofStart DNA 폴리머라제 1 μl

총 부피 50 μl

조립 PCR 사이클: 1 - 94°C, 2 min

2 - 94°C, 30 sec

3 - 40°C, 2 min

4 - 72°C, 10 sec

5 - 94°C, 15 sec

6 - 40°C, 30 sec

7 - 72°C, 20 sec + 3 sec/사이클

단계 4 내지 7을 25회 반복하였다.

4.2.1.2 대표적인 회수 PCR

프라이머 1 및 2는 조립 PCR에 사용된 처음 상부 및 하부 올리고뉴클레오타드이었다. 회수 PCR은 완전한 V 유전자의 증폭을 허용한다.

회수 PCR 반응:

물 42 μl

10xProofStart PCR 버퍼 4 μl

dNTP (10 mM) 1.5 μ l

프라이머 1 (100 μ M) 0.5 μ l

프라이머 2 (100 μ M) 0.5 μ l

조립 PCR 반응액 1 μ l

ProofStart DNA 폴리머라제 0.5 μ l

총 부피 50 μ l

회수 PCR 사이클: 1 - 94°C, 2 min

2 - 94°C, 45 sec

3 - 60°C, 30 sec

4 - 72°C, 2 min

5 - 72°C, 4 min

단계 2 내지 4를 25회 반복하였다.

회수 PCR 생성물은 퀴아겐의 MinElute PCR 정제 키트를 제조자의 지시에 따라 사용하여 정제하였다.

4.2.2 제한 소화

섹션 3에 기재된 바와 유사하게, 인간화 6A1 VH 구성체 A1, A2, A3, A4를 HindIII-SpeI로 소화시키고, 인간화 6A1 VL 구성체 L1, L2를 HindIII-BsiWI로 소화시켰다.

4.2.3 겔 정제

제한 소화 생성물을 섹션 3과 유사하게 정제하였다.

4.2.4 라이게이션

HindIII-SpeI 소화된 6A1 인간화 VH 단편을 HindIII-SpeI 소화된 RId hC γ 1 wt 벡터 내로 라이게이션시켰다.

HindIII-BsiWI 소화된 6A1 인간화 VL 단편을 HindIII-BsiWI 소화된 RIn hC κ 벡터 내로 라이게이션시켰다.

라이게이션은 프로메가의 LigaFast Rapid DNA 라이게이션 시스템을 제조자의 지시에 따라 사용하여 수행하였다.

4.2.5 형질전환

섹션 3에서 설명한 바와 유사하게 수행하였다.

4.2.6 대표적인 서열 결정 방법

각각의 반응 플레이트로부터의 콜로니를 100 μ g/ml 암피실린으로 보충된 5 ml LB 배지에서 37°C에서 철야 배양하였다. 퀴아겐의 QIAprep Spin Miniprep 키트를 제조자의 지시에 따라 사용하여 플라스미드를 추출하여 정제하였고, 상기 섹션 3에서 설명한 바와 같은 프라이머를 사용하여 서열을 결정하였다. 정확한 인간화 VH 및 VL 서열을 갖는 클론을 확인하고, CHO 세포에서 발현을 위한 플라스미드를 제조하였다.

5. 인간화 항체의 발현 및 특성화

4개의 인간화 VH 구성체 (A1, A2, A3, A4) 및 2개의 인간화 VL 구성체 (L1 및 L2)를 RId hC γ 1 wt 및 RIn hC κ 포유동물 발현 벡터에 제조하였다. 8개의 플라스미드 중쇄-경쇄 조합체 (A1L1, A1L2, A2L1, A2L2, A3L1, A3L2, A4L1, A4L2)를 CHO 세포 내로 일시적으로 동시형질감염시키고, 8개의 상이한 인간화 항체를 제공하기 위해 소규모로 발현시켰다. CHO 세포 상등액에 생성된 항체를 인간 IL-13 결합 ELISA로 분석하였다.

5.1 대표적인 플라스미드 정제 방법

상기한 플라스미드의 하나를 포함하는 DH5 α 세포를 진탕 인큐베이터에서 100 μ g/ml 암피실린으로 보충된 5 ml의 LB 배지 중에서 8h 동안 37°C에서 배양하였다. 100 μ g/ml 암피실린으로 보충된 200 ml의 LB 배지에 1 ml의 1일 배양액을 접종하고, 진탕 인큐베이터에서 37°C에서 철야 인큐베이션하였다. 퀴아겐의 QIAfilter 플라스미드 맥시 키트를 제조자의 지시에 따라 사용하여 플라스미드를 추출하고, 정제하였다. 에탄올 펠렛을 200 μ l TE 버퍼에 재현탁시키고, 플라스미드 농도를 원액의 100배 희석 후에 260 nm에서의 흡광도에 의해 측정하였다.

5.2 대표적인 형질감염 방법

9웰의 Corning Costar 3506 6-웰 플레이트에 10⁶ CHO 세포를 씨딩하고, 37°C에서 초저 소 태아 혈청 및 1% 페니실린-스트렙토마이신으로 보충된 돌베코의 글루타맥스-1 함유 MEM (DMEM) 배지에서 철야 배양하였다. 각각의 웰에 대해, 각각의 형질감염체가 상이한 조합의 경쇄 및 중쇄를 포함하도록 5 ml의 Bijou에 다음 물질을 첨가하였다.

1 ml 글루타맥스-1 함유 옵티멤 1

5 μ g 인간화 VH 함유 플라스미드

5 μ g 인간화 VL 함유 플라스미드

30 μ l 복탕싱 하의 TransFast 형질감염 시약

인큐베이션은 실온에서 10-15분 동안 실시하였다. DMEM 배지를 웰에서 제거하고, 혼합물을 볼텍싱한 후 적절한 웰에 넣었다. 인큐베이션을 37°C에서 1h 동안 실시하였다. 2 ml 옵티멤을 각 웰에 첨가하고, 37°C에서 48-72h 동안 인큐베이션하였다.

5.3 인간화 항체의 분석

각각의 웰로부터 배지를 회수하고, 에펜도르프 5415R 벤치 원심분리기로 13000 rpm에서 1 min 동안 원심분리하고, 상등액을 0.2 μ m Pall Acrodisc 25 mm 주사기 필터에 통과시켰다. 세포 상등액을 ELISA에서 인간 IL-13에 대한 결합에 대해 평가하였다. 모든 8개의 인간화 항체는 인간 IL-13 결합 ELISA에서 6A1 키메릭 항체와 유사한 프로파일로 인간 IL-13에 결합하였다. 도 9 참조.

인간화 항체 L1+A1 및 L2+A1을 발현 규모 확대, 정제 및 추가의 분석을 위해 선택하였다.

6. 인간화 항-인간 IL-13 항체 L1+A1 및 L2+A1의 평가

6.1 인간 및 사이노물거스 IL-13 결합 ELISA에서의 활성

L1+A1 및 L2+A1을 확대된 규모로 성공적으로 생성시키고, 이. 콜라이-발현된 인간 및 사이노물거스 IL-13에 대한 결합을 ELISA로 평가하였다. 도 10a 및 10b와 표 B 참조.

[표 B]

ELISA	mAb	EC ₅₀ (μg/ml)
인간 IL-13 결합	6A1 모 mAb	0.049
	키메릭 6A1	0.015
	L1+A1	0.018
	L2+A1	0.024
사이노몰거스 IL-13 결합	6A1 모 mAb	0.039
	키메릭 6A1	0.018
	L1+A1	0.021
	L2+A1	0.028

L1+A1 및 L2+A1은 모두 유사한 프로파일로 이. 콜라이-발현된 인간 및 사이노몰거스 IL-13에 결합하였다. EC₅₀ 값 (엑셀 'Robosage' 곡선 피팅 함수를 사용하여 생성)은 결합 활성이 키메릭 6A1 mAb 표준과 매우 유사함을 나타내었다.

6.2 천연 (PBMC 유래) 인간 IL-13에 결합하기 위한 L1+A1 및 L2+A1의 평가

항-CD3 및 항-CD28로 자극된 CD4⁺ Th2 세포로부터의 상등액 (인간 PBMC 배양액으로부터 생성됨)을 사용하여 키메릭 6A1 mAb, L1+A1 및 L2+A1의 천연 (PBMC 유래) 인간 IL-13에 대한 결합을 평가하였다. ELISA에서, 모든 3개의 항체는 모 6A1 mAb와 매우 유사한 수준으로 Th2 세포 상등액 내의 천연 인간 IL-13에 결합하였다. 도 11 참조.

또한, Th2 세포 상등액에 존재하는 천연 인간 IL-13의 수준을 결정하기 위해서 상업적으로 입수가 가능한 시약을 사용하여 표준 곡선을 작성하였다. 모든 3개의 항체 및 상업적으로 입수가 가능한 항-인간 IL-13 mAb는 Th2 상등액 샘플에서 등량의 IL-13을 검출하였다. 하기 표 2 참조.

[표 2]

mAb	천연 IL-13 (ng/ml)
6A1 모 mAb	22.5
키메릭 6A1	19.6
L1+A1	25.1
L2+A1	22.7
+ 대조군 mAb	28.0

6.3 IL-13 수용체 결합 ELISA에서 인간 IL-13에 대한 L1+A1 및 L2+A1의 억제 활성

경쟁 ELISA에서 인간 IL-13의 IL-13Ra1 및 IL-13Ra2 사슬에 대한 결합을 억제하는 능력에 대해 6A1 모 마우스 mAb, 키메릭 6A1, L1+A1 및 L2+A1을 평가하였다. 도 12a 및 12b와 하기 표 3 참조.

[표 3]

ELISA	mAb	IC ₅₀ (μg/ml)
인간 IL-13Ra1 경쟁	6A1 모 mAb	0.039
	키메릭 6A1	0.034
	L1+A1	0.044
	L2+A1	0.056

인간 IL-13R α 2 경쟁	6A1 모 mAb	0.020
	키메릭 6A1	0.040
	L1+A1	0.113
	L2+A1	0.117

모든 항체는 이. 콜라이-발현된 det-1 태깅된 인간 IL-13의 인간 IL-13Ra1에 대한 결합을 유사한 프로필로 억제하였다. 유사하게, 본 분석에서 L1+ A1 및 L2+ A1에 대한 효능의 일부 감소가 있었지만, 모든 항체는 이. 콜라이-발현된 det-1 태깅된 인간 IL-13의 인간 IL-13Ra2에 대한 결합을 억제하였다 (IC₅₀ 값은 엑셀 'Robosage' 곡선 피팅 함수를 사용하여 생성됨).

6.4 인간 IL-13에 결합하기 위한 L1+A1 및 L2+A1의 친화도 평가

BIACore™ 시스템을 사용하여 인간 IL-13에 대한 L1+ A1 및 L2+ A1의 결합 동역학을 평가하였다. 사용된 방법에 대해서는 하기 섹션 7 참조.

분석 1:

인간 및 사이노몰거스 IL-13 (이. 콜라이-발현된 단백질) 모두에 대해 수행하였다. 인용된 KD 값은 5개의 상이한 IL-13 농도 곡선 (3회 실시)의 평균이다. 질량 전달 문제가 본 분석에서 분명히 존재하였고, 변형 실험 프로토콜 (상기 문제를 보정하기 위해)을 분석 4에서 완성하였다 (질량 전달 문제가 존재하지 않음). 표 4 참조.

【표 4】

IL-13 샘플	mAb	온 레이트 ka (Ms ⁻¹)	오프 레이트 kd (s ⁻¹)	친화도 상수 KD (pM)
인간 IL-13	6A1 모 mAb	1.96x10 ⁶	6.78x10 ⁻⁵	35
	키메릭 6A1	4.64x10 ⁵	2x10 ⁻⁵	43
	L1+A1	5.07x10 ⁵	1.55x10 ⁻⁴	300
	L2+A1	5.07x10 ⁵	1.56x10 ⁻⁴	310
사이노몰거스 IL-13	6A1 모 mAb	9.14x10 ⁵	5.6x10 ⁻⁵	61
	키메릭 6A1	5.92x10 ⁵	3.27x10 ⁻⁵	55
	L1+A1	4.46x10 ⁵	1.55x10 ⁻⁵	35
	L2+A1	5.77x10 ⁵	5.58x10 ⁻⁵	97

분석 2:

L1+ A1에 대한 인간 IL-13 (이. 콜라이-발현된 단백질)의 결합에 대해 분석하였다. 표 5 참조.

【표 5】

IL-13 샘플	mAb	온 레이트 ka (Ms ⁻¹)	오프 레이트 kd (s ⁻¹)	친화도 상수 KD (pM)
인간 IL-13	L1+A1	4.66 x 10 ⁵	6.95 x 10 ⁻⁵	149

분석 3:

16mer 비오틴화된 인간 IL-13 펩티드 번호 24 (모 mAb 6A1에 대한 선형 결합 에피토프로서 확인됨, 섹션 6.7 참조)에 대해 분석하였다. 펩티드 리간드 결합에 대해 얻은 절대 KD 값은 종종 전체 단백질 표적에 대한 결합시에 관찰되는 것과 매우 상이함을 주목한다. 그러나, 키메릭 6A1과 L1+ A1 사이에 약 3배의 친화도 감소를 나타냈기 때문에 상기 데이터는 전체 단백질 데이터 및 IL-13 중화 데이터 (TF-1 생물학적 분석에서)와 일치하는 것으로 생각된다. 표 6 참조.

[표 6]

IL-13 샘플	mAb	온 레이트 k_a ($M s^{-1}$)	오프 레이트 k_d (s^{-1})	친화도 상수 KD (nM)
펩티드 24	6A1 모 mAb	2.95×10^5	9.15×10^{-4}	3.11
	키메릭 6A1	2.57×10^5	9.19×10^{-4}	3.58
	L1+A1	1.95×10^5	1.7×10^{-3}	9.03
	L2+A1	1.79×10^5	1.67×10^{-3}	9.35

분석 4:

인간 및 사이노몰거스 IL-13 (이. 콜라이-발현된 단백질) 모두에 대해 수행하였다. 인용된 KD 값은 5개의 상이한 IL-13 농도 곡선 (3회 실시)의 평균이다. 상기 데이터 세트에 대해 질량 전달 문제가 존재하지 않음을 주목한다. 표 7 참조.

[표 7]

IL-13 샘플	mAb	온 레이트 k_a ($M s^{-1}$)	오프 레이트 k_d (s^{-1})	친화도 상수 KD (pM)
인간 IL-13	키메릭 6A1	1.05×10^6	4×10^{-5}	38
	L1+A1	8.24×10^5	1.4×10^{-4}	170
	L2+A1	9.07×10^5	1.39×10^{-4}	153
사이노몰거스 IL-13	키메릭 6A1	8.85×10^5	2.65×10^{-5}	30
	L1+A1	7.3×10^5	5.86×10^{-5}	80
	L2+A1	7.72×10^5	4.25×10^{-5}	55

이 결과는 인간화 구성체 L1+ A1과 L2+ A1 사이에 유의한 차이가 없음을 나타낸다.

L1+ A1은 약 168 pM의 인간 IL-13에 대한 친화도를 나타낸다. 동역학은 항체의 유의한 중화 활성으로부터 예상되는 바와 같이 예외적으로 느린 오프 레이트라는 특징을 갖는다. 결합 상수 k_{on} 에 대한 데이터는 일관되게 대략 $6 \times 10^5 M^{-1}s^{-1}$ 이었다. 해리 상수 k_{off} 의 추정치는 보다 가변적이고, 1.4×10^{-4} 내지 $8.22 \times 10^{-5} s^{-1}$ 이고, 이것은 느린 오프 레이트에 대한 정밀한 정량화를 위한 기술적 문제를 반영한다.

6.5 IL-13 중화 생물학적 분석에서 L1+A1 및 L2+A1의 활성

6A1 모 마우스 mAb, 키메릭 6A1, L1+ A1 및 L2+ A1을 시험관내 TF-1 세포 생물학적 분석에서 IL-13 중화 활성에 대해 평가하였다 (이 생물학적 분석은 IL-13 생물활성의 평가 및 상업적으로 공급되는 항-IL-13 항체의 중화 용량의 평가에

대한 산업적 표준임). 이. 콜라이-발현된 인간 IL-13, 이. 콜라이-발현된 사이노물거스 IL-13, 이. 콜라이-발현된 Q130 인간 IL-13 (천식-연관 변이체), 및 포유동물 CHO 세포-발현된 인간 IL-13을 포함하는 많은 IL-13 변이체를 본 분석에서 평가하였다 (주의: Th2 세포 상등액 샘플 내의 천연 인간 IL-13은 상기 상등액이 TF-1 세포를 증식시킬 수 있는 다른 시토킨도 포함하기 때문에 상기 생물학적 분석에 사용될 수 없다) (도 13a, 13b, 13c 및 13d 참조).

시험된 모든 항체는 상기 생물학적 분석 시스템에서 모든 IL-13 변이체의 생물활성을 중화시켰고, 각각의 IL-13 변이체에 대한 각각의 항체의 중화 용량을 결정하여 ND₅₀ 값으로 표현하였다. 표 8 참조.

[표 8]

IL-13 변이체	mAb	두 분석에 대한 평균 ND ₅₀ (μg/ml)
이. 콜라이-발현된 인간 IL-13	키메릭 6A1	0.119
	L1+A1	0.428
	L2+A1	0.608
	6A1 모 mAb	0.193
이. 콜라이-발현된 사이노물거스 IL-13	키메릭 6A1	0.059
	L1+A1	0.078
	L2+A1	0.120
	6A1 모 mAb	0.078
이. 콜라이-발현된 Q130 인간 IL-13	키메릭 6A1	0.128
	L1+A1	0.438
	L2+A1	0.705
	6A1 모 mAb	0.213
CHO-발현된 인간 IL-13	키메릭 6A1	0.285
	L1+A1	0.975
	L2+A1	1.200
	6A1 모 mAb	0.440

주의: TF-1 세포를 상기 생물학적 분석에서 동일한 정도로 증식시키기 위해 상이한 양의 각각의 IL-13 변이체가 필요하기 때문에, 사용되는 각각의 IL-13 변이체에 걸쳐 하나의 특정 항체에 의해 생성된 ND₅₀ 값을 비교하는 것은 바람직하지 않을 수 있다. 그러나, 단일 IL-13 변이체에 대해 각각의 항체에 의해 생성된 ND₅₀ 값을 비교하는 것은 적절하다.

일반적으로, 모 6A1 mAb 및 키메릭 6A1에 의해 달성된 중화 수준은 유사하였고, 이것은 모 mAb와 키메라 사이에 검출 가능한 효능의 상실이 존재하지 않음을 나타낸다. 그러나, L1+A1 및 L2+A1의 효능은 시험된 각각의 개개의 IL-13 변이체에 대해 모 6A1 mAb와 키메릭 6A1 모두에 비해 평균적으로 약 3 내지 4배 측정가능하게 감소하였다. 이들 데이터는 BIAcore™ 평가로부터 얻은 데이터와 매우 일치하였다.

6.6 인간 IL-13 결합에 대한 L1+A1 및 L2+A1의 특이성

결합 ELISA에서 인간 IL-4 및 인간 GM-CSF에 대한 교차반응성 잠재력 분석에 의해 인간 IL-13에 대한 L1+A1 및 L2+A1의 특이성을 평가하였다. 도 14a 및 14b 참조.

이들 mAb는 IL-13에 대한 결합에 특이적이고, 30 μg/ml 이하의 mAb 농도에서 인간 IL-4 또는 인간 GM-CSF에 대해 교차반응성을 갖지 않는 것으로 밝혀졌다. 또한, 상기 mAb는 IL5 생물학적 분석에서 인간 IL5의 생물활성을 교차중화시키지 않았다. 도 14c 참조.

6.7 비오티닐화된 펩티드를 사용한 6A1의 에피토프 맵핑

인간 IL-13 및 사이노몰거스 IL-13 단백질을 변성 SDS-PAGE 겔 상에서 전개시켰다. 마우스 mAb 6A1을 사용한 웨스턴 블로팅은 인간 (이. 콜라이 발현됨, 자체 실험에서) 및 사이노몰거스 (이. 콜라이 발현됨, 자체 실험에서) IL-13 단백질 모두에 대해 예상된 크기의 밴드를 검출하였다. 6A1은 기술적 실패로 추정되는 요인에 의해 hIL-13 (이. 콜라이 발현됨, 캄브리지 바이오사이언스)을 검출하지 못했다. 본 분석은 mAb 6A1이 인간 및 사이노몰거스 IL-13 서열 내의 선형 펩티드 에피토프를 인식함을 제시하였다 (데이타 미제시).

인간 및 사이노몰거스 IL-13 상의 mAb 6A1에 의해 인식되는 B 세포 에피토프의 위치를 맵핑하기 위해 오프셋 4의 비오티닐화된 16 mer 펩티드를 합성하였다. ELISA 방법을 사용하여 고정된 비오티닐화된 펩티드의 모 mAb 6A1에 대한 결합을 검출하였다.

16 mer 맞춤 디자인된 펩티드의 상세 내역: 오프셋 4의 88 x 16 mer (미모토펬스 (Mimotopes), 호주).

포맷: 펩티드 25 & 44 = 비오티-SGSG-펩티드-산

펩티드 2-24 & 27-43 = 비오티-SGSG-펩티드-아미드

소수성 분자량 N-말단 서열 C-말단

2 0.42 2,311.66 비오티- 서열 38 -NH₂

3 0.27 2,453.82 비오티- 서열 39 -NH₂

4 0.38 2,326.70 비오티- 서열 40 -NH₂

5 0.31 2,231.58 비오티- 서열 41 -NH₂

6 0.43 2,289.66 비오티- 서열 42 -NH₂

7 0.59 2,190.57 비오티- 서열 43 -NH₂

8 0.57 2,260.64 비오티- 서열 44 -NH₂

9 0.62* 2,255.64 비오티- 서열 45 -NH₂

10 0.51 2,197.56 비오티- 서열 46 -NH₂

11 0.56 2,144.52 비오티- 서열 47 -NH₂

12 0.46 2,090.38 비오티- 서열 48 -NH₂

13 0.29 2,219.54 비오티- 서열 49 -NH₂

14 0.29 2,180.53 비오티- 서열 50 -NH₂

15 0.36 2,318.70 비오티- 서열 51 -NH₂

16 0.32 2,303.73 비오티- 서열 52 -NH₂

17 0.47 2,209.57 비오티- 서열 53 -NH₂

18 0.48 2,257.60 비오티- 서열 54 -NH₂

19 0.17 2,273.57 비오틴- 서열 55 -NH₂
 20 0.27 2,300.60 비오틴- 서열 56 -NH₂
 21 0.29 2,383.77 비오틴- 서열 57 -NH₂
 22 0.35 2,401.83 비오틴- 서열 58 -NH₂
 23 0.45 2,407.92 비오틴- 서열 59 -NH₂
 24 0.42 2,541.08 비오틴- 서열 60 -NH₂
 25 0.33 2,513.97 비오틴- 서열 61 -OH
 27 0.42 2,283.64 비오틴- 서열 62 -NH₂
 28 0.27 2,425.81 비오틴- 서열 63 -NH₂
 29 0.57 2,228.57 비오틴- 서열 64 -NH₂
 30 0.62* 2,223.57 비오틴- 서열 65 -NH₂
 31 0.51 2,165.49 비오틴- 서열 66 -NH₂
 32 0.56 2,112.45 비오틴- 서열 67 -NH₂
 33 0.27 2,207.56 비오틴- 서열 68 -NH₂
 34 0.33 2,345.73 비오틴- 서열 69 -NH₂
 35 0.29 2,330.76 비오틴- 서열 70 -NH₂
 36 0.45 2,236.60 비오틴- 서열 71 -NH₂
 37 0.43 2,276.64 비오틴- 서열 72 -NH₂
 38 0.12 2,292.62 비오틴- 서열 73 -NH₂
 39 0.22 2,319.64 비오틴- 서열 74 -NH₂
 40 0.24 2,402.82 비오틴- 서열 75 -NH₂
 41 0.33 2,387.80 비오틴- 서열 76 -NH₂
 42 0.43 2,393.90 비오틴- 서열 77 -NH₂
 43 0.39 2,527.05 비오틴- 서열 78 -NH₂
 44 0.35 2,471.88 비오틴- 서열 79 -OH

(*는 높은 소수성 값을 나타낸다)

예: 상기 분석을 위한 전형적인 96웰 플레이트 셋-업

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
B	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
C	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
D	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
E	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38
F	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38
G	39	39	40	40	41	41	42	42	43	43	44	44
H	+VE (4)	+VE (16)	+VE (32)	+VE (4)	+VE (16)	+VE (32)	-VE (4)	-VE (16)	-VE (32)	-VE (4)	-VE (16)	-VE (32)

주의: 숫자는 각각의 웰 내의 펩티드를 나타낸다

괄호안의 숫자는 대조 항체의 희석 팩터를 나타낸다.

96웰의 490 nm에서의 흡광도

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.057	0.067	0.079	0.063	0.072	0.061	0.084	0.061	0.075	0.064	0.075	0.066
B	0.068	0.070	0.105	0.065	0.075	0.072	0.071	0.070	0.064	0.061	0.062	0.063
C	0.119	0.081	0.099	0.064	0.073	0.077	0.060	0.061	0.090	0.144	2.109	2.200
D	0.115	0.129	0.141	0.060	0.090	0.063	0.104	0.078	0.076	0.135	2.148	2.210
E	0.060	0.074	0.098	0.062	0.064	0.071	0.088	0.082	0.089	0.073	0.068	0.067
F	0.082	0.078	0.071	0.062	0.056	0.057	0.084	0.067	0.090	0.074	0.063	0.056
G	0.057	0.055	0.060	0.060	0.058	0.058	0.104	0.108	2.236	2.237	2.229	2.229
H	1.499	1.197	0.739	1.548	1.209	0.976	0.077	0.080	0.072	0.072	0.082	0.103

상기 결과 (많은 시도 중의 하나)는 아래 나타난 펩티드 24, 25, 43 및 44 (및 양성 대조군 펩티드)에 대한 양성 결과와 상호관련된다. 도 15 참조. 모든 시도는 펩티드 24, 25, 43 및 44가 양성임을 입증하였다.

펩티드 24: QFVKDLLHLKKLFRE (서열 80)

펩티드 25: DLLLHLKKLFRGGRFN (서열 81)

펩티드 43: QFVKDLLVHLKKLFRE (서열 82)

펩티드 44: DLLVHLKKLFRGGRFN (서열 83)

펩티드 24 및 25는 hIL-13으로부터 유래된다. 펩티드 43 및 44는 cynoIL-13으로부터 유래된다.

또한, 키메릭 6A1, L1+A1 및 L2+A1 mAb 모두가 인간 및 사이노물거스 IL-13에서 C-말단 영역의 동일한 선형 에피토프에 결합하였다 (키메릭 6A1, L1+A1 및 L2+A1 mAb에 대한 데이터는 제시하지 않음).

요약하면, ELISA 결과는 모 마우스 mAb 6A1, 키메릭 6A1, L1+A1 및 L2+A1 mAb 모두가 인간 IL-13 단백질로부터의 서열 84 및 사이노물거스 IL-13 단백질로부터의 서열 85 내에서 결합함을 나타내었다:

DLLLHLKKLFRE (서열 84)

DLLVHLKKLFRE (서열 85)

주의: 굵은 표시는 인간 IL-13과 사이노몰거스 IL-13 상동분자종 (orthologue) 사이의 잔기 차이를 나타낸다.

따라서, 모 마우스 mAb 6A1, 키메릭 6A1, L1+ A1 및 L2+ A1 mAb는 서열 9의 잔기 97 내지 108 사이에서 인간 IL-13에 면역특이적으로 결합하는 것으로 결정되었다.

6.8 비오틴화된 펩티드를 사용한 6A1의 에피토프 미세 매핑

인간 IL-13에 대한 결합을 위해 KDLLLHLKKLFREG 및 사이노몰거스 IL-13에 대한 결합을 위해 KDLLVHLKKLFREG를 기초로 한 펩티드 세트를 사용하여 mAb 6A1에 대한 결합 에피토프를 결정하였다. mAb 6A1에 대한 정밀한 선형 결합 에피토프를 규정하기 위해서 펩티드를 배열하고 이들 모 펩티드 서열 (즉 KDLLLHLKKLFREG 또는 KDLLVHLKKLFREG)의 N 또는 C-말단으로부터 1개의 아미노산을 순차적으로 제거하였다.

ELISA 방법을 사용하여 고정된 비오틴화된 펩티드의 모 mAb 6A1에 대한 결합을 검출하였다.

펩티드 확인 번호 (413 내지 447) 및 대응하는 서열을 아래 나타낸다.

펩티드 서열:

펩티드 # N-말단 서열 C-말단

413 비오틴- 서열 94 -NH₂

414 비오틴- 서열 95 -NH₂

415 비오틴- 서열 96 -NH₂

416 비오틴- 서열 97 -NH₂

417 비오틴- 서열 98 -NH₂

418 비오틴- 서열 99 -NH₂

419 비오틴- 서열 100 -NH₂

420 비오틴- 서열 101 -NH₂

421 비오틴- 서열 102 -NH₂

422 비오틴- 서열 103 -NH₂

423 비오틴- 서열 104 -NH₂

424 비오틴- 서열 105 -NH₂

425 비오틴- 서열 106 -NH₂

426 비오틴- 서열 107 -NH₂

427 비오틴- 서열 108 -NH₂

428 비오틴- 서열 109 -NH₂

429 비오틴- 서열 110 -NH₂

430 비오틴- 서열 111 -NH₂

431 비오틴- 서열 112 -NH₂

432 비오틴- 서열 113 -NH₂

433 비오틴- 서열 114 -NH₂

434 비오틴- 서열 115 -NH₂

435 비오틴- 서열 116 -NH₂

436 비오틴- 서열 117 -NH₂

437 비오틴- 서열 118 -NH₂

438 비오틴- 서열 119 -NH₂

439 비오틴- 서열 120 -NH₂

440 비오틴- 서열 121 -NH₂

441 비오틴- 서열 122 -NH₂

442 비오틴- 서열 123 -NH₂

443 비오틴- 서열 124 -NH₂

444 비오틴- 서열 125 -NH₂

445 비오틴- 서열 126 -NH₂

446 비오틴- 서열 127 -NH₂

447 비오틴- 서열 128 -NH₂

44 (대조군) 비오틴- 서열 79 -OH

예: 상기 분석을 위한 96웰 플레이트 셋-업

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424
B	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424
C	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436
D	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436
E	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	44
F	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	44
G	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK
H	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK

주의: 숫자는 각각의 웰 내의 펩티드를 나타낸다

96웰의 490 nm에서의 흡광도

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2.456	2.501	2.434	2.419	2.746	2.661	2.224	2.407	0.059	0.052	0.052	2.527
B	2.480	2.452	2.444	2.624	2.639	3.106	2.188	2.473	0.059	0.055	0.052	2.568
C	2.472	0.099	0.065	0.059	0.070	0.058	0.053	0.054	0.162	2.479	2.389	2.883
D	2.399	0.100	0.067	0.053	0.049	0.051	0.052	0.047	0.485	2.838	2.783	2.640
E	2.582	2.359	2.585	2.512	0.096	0.052	0.054	0.048	0.049	0.183	0.051	2.424
F	2.431	2.872	2.522	2.243	0.097	0.059	0.052	0.049	0.057	0.047	0.050	2.342
G	0.056	0.051	0.058	0.065	0.056	0.067	0.049	0.047	0.053	0.057	0.052	0.056
H	0.047	0.052	0.050	0.070	0.054	0.047	0.056	0.053	0.049	0.050	0.052	0.049

도 16a 및 16b 참조. 상기 결과는 모 mAb 6A1이 인간 IL-13과 사이노몰거스 IL-13 상동분자종 모두의 C-말단 영역 내의 선형 아미노산 에피토프 KKLFR에 결합함을 나타낸다.

또한, 키메릭 6A1, L1+ A1 및 L2+ A1 mAb는 모두 인간 IL-13에서 C-말단 영역의 동일한 선형 에피토프 (즉, KKLFR)에 결합하였다 (키메릭 6A1, L1+ A1 및 L2+ A1 mAb에 대한 데이터는 제시하지 않음). 후속적으로, 모 mAb 6A1은 사이노몰거스 IL-13에서 동일한 에피토프에 결합하는 것으로 밝혀졌다.

요약하면, ELISA 결과는 모 마우스 mAb 6A1, 키메릭 6A1, L1+ A1 및 L2+ A1 mAb 모두가 인간 IL-13 단백질로부터의 서열 KKLFR 내에서 결합함을 나타내었다.

6.9 비오틴화된 펩티드를 사용한 6A1 결합 에피토프의 알라닌 스캐닝

IL-13의 mAb 6A1과의 상호작용에 관련되는 중요한 특정 잔기를 확인하기 위해서, KKLFR 결합 에피토프를 포함하는 모 펩티드 서열 (즉, QFVKDLLLHLKKLFREGRFN)을 사용하는 알라닌 스캐닝 방법을 사용하였다. 본 분석을 위해, 한 아미노산이 KKLFR 에피토프 내의 각각의 아미노산 위치에서 알라닌 잔기 대신에 (및 상기 에피토프에 직접 인접하는 각각의 아미노산 대신에) 순차적으로 치환된 펩티드를 생성시켰다 (아나스펙 인크 (AnaSpec Inc)에서 공급).

ELISA 방법을 사용하여 고정된 비오틴화된 펩티드의 모 mAb 6A1 및 L1+ A1에 대한 결합을 검출하였다.

본 분석에서 생성된 펩티드 및 대응하는 펩티드 확인 번호를 아래 나타낸다.

펩티드 # N-말단 서열

1 비오틴 서열 129

62 비오틴 서열 130

63 비오틴 서열 131

64 비오틴 서열 132

65 비오틴 서열 133

66 비오틴 서열 134

67 비오틴 서열 135

68 비오틴 서열 136

결과: 490 nm에서의 흡광도

평균 시험 결과 (n=2).

모 (쥐) 6A1 mAb의 경우:

펩티드 번호	1	62	63	64	65	66	67	68
평균 A ₄₉₀	3.543	3.489	3.2795	1.468	3.8495	3.5995	0.595	3.581

L1+ A1의 경우:

펩티드 번호	1	62	63	64	65	66	67	68
평균 A ₄₉₀	2.8535	2.832	2.6535	1.8175	3.0165	2.84	0.816	2.8085

도 17a 및 17b 참조.

이들 데이터는 mAb 6A1 또는 L1+ A1의 인간 IL-13과의 상호작용에 관련되는 중요한 아미노산 잔기가 위치 107의 아르기닌 (R), 및 위치 103의 리신 (K)임을 제시한다.

본 분석을 반복하되, 특정 mAb 희석 범위에 걸쳐 상기 효과를 확인하기 위해서 일정 범위의 농도에서 6A1 및 L1+ A1 mAb를 사용하였다.

모 마우스 mAb 6A1 (도 17c) 및 인간화 후보 L1+ A1 (도 17d)를 상이한 농도에서 알라닌 스캐닝 펩티드 (서열 129, 131-135)에 대한 결합에 대해 분석하였다. 펩티드를 2개의 96 웰 플레이트에 걸쳐 분리시켜야 하기 때문에, 알라닌 치환을 포함하지 않는 모 서열 펩티드 (서열 129)를 두 플레이트에 대해, 따라서 그래프당 2개의 결과로 분석하였다. 이것은 임의의 주요한 플레이트 대 플레이트 변동이 존재하는지를 결정하기 위한 것이고, 두 경우 모두에서 변동은 보이지 않았다.

치환 K103A, L105A 및 F106A를 포함하는 펩티드 (각각 서열 131, 133 및 134, 서열 9에 제시된 잔기 넘버링)는 모 펩티드 (서열 129)와 매우 유사한 mAb에 대한 결합을 보였고, 따라서 이들 잔기는 6A1/L1+ A1의 IL-13에 대한 결합에 중요하지 않은 것이다. 그러나, 치환 K104A 및 R107A를 포함하는 펩티드 (각각 서열 132 및 135, 서열 9에 제시된 잔기 넘버링)는 특히 더 낮은 농도에서 6A1/L1+ A1의 결합 감소를 보였고, 이것은 이들 잔기가 6A1/L1+ A1의 IL-13에 대한 최적 결합을 위해 중요함을 나타낸다. 도 17c 및 17d 참조.

이들 데이터는 모 (즉, 쥐) 6A1 또는 L1+ A1과 인간 IL-13의 상호작용에 관련되는 중요한 아미노산 잔기가 서열 9의 위치 107의 아르기닌 (R) 및 위치 103의 리신 (K)임을 나타낸다.

섹션 7 - 물질 및 방법

하기 섹션에서, 다음 물질 및 방법을 적절한 경우 사용하였다. 이들은 대표적인 물질 및 방법이다. 물질 및 방법의 약간의 변화가 반복 실험에서 일어날 수 있다.

물질

SV 총 RNA 단리 시스템: 프로메가 Z3100

Access RT-PCR 시스템: 프로메가 A1250

QIAquick 겔 추출 키트: 퀴아겐 28704

겔 로딩 용액: 시그마 (Sigma) G7654

아가로스: 인비트로젠 15510-019

에티뒀 브로마이드: 시그마 E1510

TAE 버퍼: 자체 제조

100 bp DNA 래더: 뉴 잉글랜드 바이오랩스 (New England Biolabs) N3231S

TA 클로닝 키트: 인비트로젠 45-0046

TOP10F' 세포: 인비트로젠 44-0300

L-아가 + 100 μ g/ml 암피실린: 자체 제조

X-Gal, DMF 중의 50 mg/ml: 프로메가 V394A

AmpliTaq DNA 폴리머라제: 어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems)

10x PCR 버퍼: 어플라이드 바이오시스템즈

E-Ge1 1.2% 아가로스: 인비트로젠 G501801

LB 배지 + 100 μ g/ml 암피실린: 자체 제조

QIAprep Spin Miniprep 키트: 퀴아겐 27106

MinElute PCR 정제 키트: 퀴아겐 28004

NEBuffer2 10x 농축: 뉴 잉글랜드 바이오랩스 B7002S

정제된 BSA 100x 농축: 뉴 잉글랜드 바이오랩스 B9001S

BsiWI: 뉴 잉글랜드 바이오랩스 R0553L

HindIII: 프로메가 R604A

SpeI: 뉴 잉글랜드 바이오랩스 R0133S

LigaFast Rapid DNA 라이게이션 시스템: 프로메가 M8225

최대 효율 DH5 α 화학적 적격 세포: 인비트로젠 18258-012

SOC 배지: 자체 제조

QIAfilter 플라스미드 맥시 키트: 퀴아겐 12263

글루타맥스-1 함유 둘베코 MEM: 인비트로젠 31966-021

글루타맥스-1 함유 옵티멤 1: 인비트로젠 51985-026

TransFast 형질감염 시약: 프로메가 E2431

1 ml HiTrap r단백질 A 세파로스 FF: 아머삼 바이오사이언시스 17-5079-01

둘베코 PBS: 시그마 D8537

ImmunoPure IgG 용출 버퍼: 피어스 21009

1M Trizma-HCl pH8.0: 시그마 T2694

ProofStart DNA 폴리머라제: 퀴아젠 1016816

ProofStart PCR 버퍼: 퀴아젠 1016961

7.1. 인간 또는 사이노몰거스 IL-13 결합 ELISA

본 분석은 항체의 인간 또는 사이노몰거스 IL-13에 대한 결합을 검출하는 ELISA를 설명한다. 이는 샌드위치 ELISA 포맷이다.

7.1.1 물질

1. Nunc 면역플레이트 1 F96 Maxisorp (라이프 테크놀로지스 (Life Technologies), 4-39454A)
2. 인간 IL-13 (캠브리지 바이오사이언스, 카탈로그 번호 CH1-013)
3. 사이노몰거스 IL-13 (글락소스미스클라인 (GlaxoSmithkline) 제조)
4. 염소 항-인간 IL-13 폴리클로날 항체 (알앤디 시스템즈, 카탈로그 번호 AF-213-NA)
5. 항-인간 IgG-HRP (시그마, 카탈로그 번호 A-6029)
6. 항-마우스 IgG-HRP (시그마, 카탈로그 번호 A-9309)
7. 카르보네이트/비카르보네이트 버퍼 (시그마; 카탈로그 번호 C-3041)
8. TBST [Tris 완충 염수 (6.06 g Tris + 8.06 g NaCl + 0.2 g KCl + 1 L가 되도록 하는 H₂O) + 0.05% Tween 20]
9. BSA (시그마 A-7030)
10. OPD (시그마, 카탈로그 번호 P-9187)
11. 황산

7.1.2 방법

1. 차단 용액은 3% BSA+ TBST이다.
2. 세척 용액은 TBST이다.

3. 'Nunc Maxisorp' ELISA 플레이트를 카르보네이트/비카르보네이트 버퍼 (시그마; 카탈로그 번호 C-3041, 제조자의 지시에 따라 제조) 중의 50 μl 의 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 염소 항-인간 IL-13 폴리클로날 항체 (알앤디 시스템즈, 카탈로그 번호 AF-213-NA, 제조자의 지시에 따라 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 원액 농도에서 제조하여 분취액으로 -20°C에서 보관)로 코팅하고, 플레이트 밀봉기로 덮고, 4°C에서 O/N으로 인큐베이팅한다.
4. 100 μl 의 3% BSA/TBST로 차단하고, 실온/실압 (rtp)에서 1 hr 인큐베이팅한다.
5. TBST로 3회 세척한다 (적어도 200 μl 세척액/웰/세척).
6. 차단 용액 중의 웰당 20 ng (50 μl 부피 중의)의 인간 IL-13 (캠브리지 바이오사이언스, 카탈로그 번호 CH1-013, 제조자의 지시에 따라 100 ng/ μl 의 원액 농도에서 제조하여 분취액으로 -20°C에서 보관) 또는 웰당 20 ng의 사이노몰거스 IL-13을 첨가하고, 실온에서 1 hr 인큐베이팅한다.
7. TBST로 3회 세척한다.
8. 차단 용액 중의 50 μl 항체 샘플 (필요한 경우 종말점 역가 데이터를 얻기 위해 적정)을 첨가하고, rtp에서 1 hr 인큐베이팅한다.
9. TBST로 3회 세척한다.
10. 6A1 키메릭 항체 또는 인간화 항체에 대해, 차단 용액 중에서 1/2000 희석액에서 1 hr 동안 rtp에서 항-인간 IgG-HRP (시그마, 카탈로그 번호 A-6029)을 50 μl /웰로 사용하여 결합을 검출한다. 6A1 마우스 모노클로날 항체에 대해, 차단 용액 중에서 1/2000 희석에서 1 hr 동안 rtp에서 항-마우스 IgG-HRP (시그마, 카탈로그 번호 A-9309)를 50 μl /웰로 사용하여 결합을 검출한다.
11. TBST로 3회 세척한다.
12. 100 μl OPD (시그마, 카탈로그 번호 P-9187, 제조자의 지시에 따라 제조)로 현상하고, 50 μl 3M H₂SO₄로 정지시키고, 490 nm에서 흡광도를 판독한다. 현상 시간은 ~12분이다.

7.2. 인간 IL-13Ra1 사슬에 대한 인간 IL-13 결합: ELISA

본 ELISA는 인간 IL-13Ra1 사슬에 대한 인간 IL-13 결합을 항체가 억제할 수 있는지를 결정한다.

7.2.1 물질

1. Nunc 면역플레이트 1 F96 Maxisorp (라이프 테크놀로지스, 4-39454A)
2. 인간 IL-13Ra1-Fc (알앤디 시스템즈, 카탈로그 번호 146-IR)
3. Det-1 태깅된 인간 IL-13 (자체 제조)
4. 비오틴화된 항-인간 IL-13 (알앤디 시스템즈, 카탈로그 번호 BAF213)
5. 스트렙타비딘-HRP
6. 카르보네이트/비카르보네이트 버퍼 (시그마; 카탈로그 번호 C-3041)
7. TBST [Tris 완충 염수 (6.06 g Tris + 8.06 g NaCl + 0.2 g KCl + 1 L가 되도록 하는 H₂O) + 0.05% Tween 20]
8. BSA (시그마 A-7030)

9. OPD (시그마, 카탈로그 번호 P-9187)

10. 황산

7.2.2 방법

1. 차단 용액은 3% BSA+ TBST이다.

2. 세척 용액은 TBST이다.

3. 'Nunc Maxisorp' ELISA 플레이트를 카르보네이트/비카르보네이트 버퍼 중의 50 μl 의 5 ng/ μl 인간 IL-13Ra1-Fc로 코팅한다. 플레이트 밀봉기로 덮고, 4°C에서 철야 인큐베이팅한다.

4. 100 μl 의 3% BSA/TBST로 차단하고, rtp에서 1 hr 인큐베이팅한다.

5. TBST로 3회 세척한다 (적어도 200 μl 세척액/웰/세척).

6. 50 μl 의 총 부피에서, 0.04 ng/ μl 의 det-1 태깅된 인간 IL-13을 항체 샘플 (적정됨)과 차단 용액 중에서 30분 동안 예비인큐베이팅한다. 예비인큐베이팅된 샘플을 수용체-코팅된 ELISA 플레이트에 첨가하고, 실온에서 1 hr 동안 인큐베이팅한다.

7. TBST로 3회 세척한다

8. 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 희석된 비오틀화된 항-인간 IL-13을 50 μl /웰로 사용하여 임의의 결합된 인간 IL-13을 검출한다. 실온에서 1시간 동안 인큐베이팅한다.

9. TBST로 3회 세척한다

10. 스트렙타비딘-HRP 컨쥬게이트를 1/1000 희석액으로 50 μl /웰로 첨가한다. 실온에서 1시간 동안 인큐베이팅한다.

11. TBST로 3회 세척한다

12. 웰당 100 μl OPD (시그마, 카탈로그 번호 P-9187. 제조자의 지시에 따라 제조)로 현상하고, 웰당 50 μl 3M H₂SO₄로 정지시키고, 490 nm에서 흡광도를 판독한다. 현상 시간은 ~2분이다.

7.3. 인간 IL-13Ra2 사슬에 대한 인간 IL-13 결합: ELISA

본 ELISA는 인간 IL-13Ra2 사슬에 대한 인간 IL-13 결합을 항체가 억제할 수 있는지를 결정한다.

7.3.1 물질

1. Nunc 면역플레이트 1 F96 Maxisorp (라이프 테크놀로지스, 4-39454A)

2. 항-인간 IgG (시그마, 카탈로그 번호 I-3382)

3. 인간 IL-13Ra2-Fc (알앤디 시스템즈, 카탈로그 번호 614-IR)

4. Det-1 태깅된 인간 IL-13 (자체 제조)

5. 비오틀화된 항-인간 IL-13 (알앤디 시스템즈, 카탈로그 번호 BAF213)

6. 스트렙타비딘-HRP

7. 카르보네이트/비카르보네이트 버퍼 (시그마; 카탈로그 번호 C-3041)
8. TBST [Tris 완충 염수 (6.06 g Tris + 8.06 g NaCl + 0.2 g KCl + 1 L가 되도록 하는 H₂O) + 0.05% Tween 20]
9. BSA (시그마 A-7030)
10. OPD (시그마, 카탈로그 번호 P-9187)
11. 황산

7.3.2 방법

1. 차단 용액은 3% BSA+ TBST이다.
2. 세척 용액은 TBST이다.
3. 'Nunc Maxisorp' ELISA 플레이트를 카르보네이트/비카르보네이트 버퍼 중에 1/1000로 희석된 50 μ l의 항-인간 IgG로 코팅한다. 플레이트 밀봉기로 덮고, 4°C에서 철야 인큐베이팅한다.
4. 100 μ l의 3% BSA/TBST로 차단하고, rtp에서 1 hr 인큐베이팅한다.
5. TBST로 3회 세척한다 (적어도 200 μ l 세척액/웰/세척).
6. 차단 용액 중의 1 μ g/ml의 인간 IL-13Ra2-Fc를 50 μ l/웰로 첨가한다. 플레이트 밀봉기로 덮고, rtp에서 1 hr 동안 인큐베이팅한다.
7. TBST로 3회 세척한다
8. 50 μ l의 총부피에서, 0.004 ng/ μ l det-1 태깅된 인간 IL-13을 항체 샘플 (적정됨)과 함께 차단 용액 중에서 30분 동안 예비인큐베이팅한다. 예비인큐베이팅된 샘플을 수용체-코팅된 ELISA 플레이트에 첨가하고, 실온에서 1 hr 동안 인큐베이팅한다.
9. TBST로 3회 세척한다.
10. 1 μ g/ml로 희석된 비오틀화된 항-인간 IL-13을 50 μ l/웰로 사용하여 임의의 결합된 인간 IL-13을 검출한다. 실온에서 1시간 동안 인큐베이팅한다.
11. TBST로 3회 세척한다.
12. 스트렙타비딘-HRP 컨쥬게이트를 1/1000 희석액으로 50 μ l/웰로 첨가한다. 실온에서 1시간 동안 인큐베이팅한다.
13. TBST로 3회 세척한다.
14. 100 μ l/웰의 OPD (시그마, 카탈로그 번호 P-9187, 제조자의 지시에 따라 제조)로 현상하고, 50 μ l/웰의 3M H₂SO₄로 정지시키고, 490 nm에서 흡광도를 판독한다. 현상 시간은 ~2분이다.

7.4. IL-13 중화 생물학적 분석 (TF-1 세포 증식 분석)

이 분석은 항-IL-13 항체의 중화 용량을 결정하기 위해 사용될 수 있는 IL-13 생물학적 분석이다. 아래에서 설명하는 방법은 재조합 인간 또는 사이노몰거스 IL-13을 사용한다. 포유동물-발현된 인간 IL-13 또는 Q130 인간 IL-13 변이체도 본 분석에 사용될 수 있다. (TF-1 세포도 인간 IL5에 반응하여 증식한다. 본 분석은 또한 인간 IL5 생물활성에 대한 6A1의 중화 용량 평가에도 사용되었다).

7.4.1 물질

1. TF-1 세포주 (자체 제조)
2. 96웰 조직 배양 플레이트 (인비트로젠)
3. 인간 IL-13 (캠브리지 바이오사이언스, 카탈로그 번호 CH1-013)
4. CellTiter 96 비-방사성 세포 증식 분석 (프로메가, 카탈로그 번호 G4000)

7.4.2 방법

1. TF-1 세포 생물학적 분석에서 재조합 인간 또는 사이노물거스 IL-13의 생물활성을 중화시키는 항-인간 IL-13 mAb의 능력을 측정하는 방법 (TF-1 세포주는 자체 입수, ATCC 버전이 아님).
2. 본 분석은 멸균 조건 하에서 멸균 96웰 조직 배양 플레이트 (인비트로젠)에서 수행한다. 모든 시험은 3회 수행하였다.
3. 10 ng/ml 인간 IL-13 (캠브리지 바이오사이언스, 카탈로그 번호 CH 1-013. 클래스 2 조직 배양 후드에서 멸균 기술을 사용하여 제조자의 지시에 따라 100 ng/ μ l의 원액 농도에서 제조하여 작은 분취액으로 -20°C에서 보관) 또는 10 ng/ml cyno IL-13 (CA로부터 자체 입수)을 상이한 희석액의 항-인간 IL-13 mAb (6 μ g/ml로부터 시작하여 3배씩 0.025 μ g/ml 까지 희석함)와 50 μ l의 총 부피에서 1시간 동안 37°C에서 예비인큐베이션한다. 또한, IL-13은 존재하지만 항-인간 IL-13 mAb는 존재하지 않는 양성 대조군 웰도 포함될 것이다. 또한, 음성 대조군 웰에는 IL-13 및 항-인간 IL-13 mAb가 존재하지 않을 것이다. 상기 예비인큐베이션을 위해 멸균된, 낮은 단백질 결합도의 둥근 바닥 96 웰 플레이트를 사용한다 (주의: IL-13 및 항-인간 IL-13 mAb의 농도는 세포가 첨가되는 후기에는 1/2이 될 것이다).
4. 멸균 96웰 조직 배양 플레이트에 2×10^5 /ml의 50 μ l의 TF-1 세포를 도말한다. 1시간 예비인큐베이션한 후, IL-13 및 항-인간 IL-13 mAb 샘플을 세포에 첨가한다. 상이한 항-인간 IL-13 mAb 희석액, 재조합 IL-13 및 TF-1 세포를 포함하는 최종 100 μ l 분석 부피를 가습 CO₂ 인큐베이터에서 37°C에서 ~70시간 인큐베이션한다.
5. ~66 hr에서, 웰이 멸균되어 세균 오염이 발생하지 않았는지를 확인하기 위해 웰을 스캐닝한다.
6. 15 μ l의 필터 멸균된 MTT 기질/웰 (카탈로그 번호 G4000, 프로메가. 제조자의 지시에 따라 제조)을 최종 4시간의 인큐베이션을 위해 첨가한다.
7. 대사된 블루 포르마잔 생성물을 가용화시키기 위해서 100 μ l의 정지 용액 (MTT 키트로 제공됨)으로 반응을 정지시킨다. 적어도 2시간 정치시킨 후, 결정 용해를 돕기 위해 피펫을 위아래로 젓는다. 별법으로, 플레이트 밀봉기로 덮고, 4°C에서 O/N으로 정치시킨 후, 다음날 피펫을 위아래로 젓는다 (이것은 피펫핑이 더 용이하다).
8. 각각의 웰 중의 용액의 흡광도를 96웰 플레이트 판독기로 570 nm 파장에서 판독한다.
9. 항-인간 IL-13 mAb가 인간 또는 사이노물거스 IL-13 생물활성을 중화시키는 능력은 규정된 양의 인간 또는 사이노물거스 IL-13 (5 ng/ml)의 생물활성을 50% 중화시키는데 필요한 항-인간 IL-13 mAb의 농도 (= ND₅₀)로서 표현된다. 필요한 농도가 낮을수록 중화 용량은 더 크다.

예: 상기 분석을 위한 96웰 플레이트 셋-업

샘플 1						항체 양성						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	3 ug/ml 항-hIL-13 mAb + IL-13 + TF-1			mAb 샘플 2			mAb 샘플 3			3 ug/ml 항-hIL-13 폴리 + IL-13 + TF-1		
B	1 ug/ml 항-hIL-13 mAb + IL-13 + TF-1									1 ug/ml 항-hIL-13 폴리 + IL-13 + TF-1		
C	0.33 ug/ml 항-hIL-13 mAb + IL-13 + TF-1			↓			↓			0.33 ug/ml 항-hIL-13 폴리 + IL-13 + TF-1		
D	0.11 ug/ml 항-hIL-13 mAb + IL-13 + TF-1									0.11 ug/ml 항-hIL-13 폴리 + IL-13 + TF-1		
E	0.037 ug/ml 항-hIL-13 mAb + IL-13 + TF-1									0.037 ug/ml 항-hIL-13 폴리 + IL-13 + TF-1		
F	0.0123 ug/ml 항-hIL-13 mAb + IL-13 + TF-1									0.0123 ug/ml 항-hIL-13 폴리 + IL-13 + TF-1		
G	TF-1 세포 증식을 위한 양성 대조군 = TF-1 세포 + IL-13 (mAb 미함유, 12웰)											
H	배경용 대조군 = TF-1 세포만 존재 (IL-13 미함유, mAb 미함유 샘플, 12웰)											

7.5. 인간 IL-4 결합: ELISA

본 분석은 인간 IL-4에 대한 항체의 결합을 검출하는 ELISA를 설명한다. 이는 샌드위치 ELISA 포맷이다.

7.5.1 물질

1. Nunc 면역플레이트 1 F96 Maxisorp (라이프 테크놀로지스, 4-39454A)
2. 인간 IL-4 (알앤디 시스템즈, 카탈로그 번호)
3. 염소 항-인간 IL-4 폴리클로날 항체 (알앤디 시스템즈, 카탈로그 번호 AF-204-NA)
4. 비오티닐화된 래트 항-인간 IL-4 모노클로날 항체 (비디 파밍겐 (BD Pharmingen), 카탈로그 번호)
5. 항-마우스 IgG-HRP (다코 (Dako), 카탈로그 번호 P0260)
6. 항-마우스 IgG-HRP (시그마, 카탈로그 번호 A-9309)
7. 카르보네이트/비카르보네이트 버퍼 (시그마; 카탈로그 번호 C-3041)
8. PBST (PBS + 0.05% Tween 20)
9. BSA (시그마 A-7030)
10. OPD (시그마, 카탈로그 번호 P-9187)

11. 황산

7.5.2 방법

1. 차단 용액은 PBST 중의 3% BSA이다.
2. 세척 용액은 PBST이다.
3. 'Nunc Maxisorp' ELISA 플레이트를 카르보네이트/비카르보네이트 버퍼 (시그마; 카탈로그 번호 C-3041, 제조자의 지시에 따라 제조) 중의 50 μ l의 5 μ g/ml 염소 항-인간 IL-4 폴리클로날 항체 (알앤디 시스템즈, 카탈로그 번호 AF-204-NA, 500 μ g/ml의 원액 농도에서 제조자의 지시에 따라 제조하고, 분취액으로 -20℃에서 보관)로 코팅하고, 플레이트 밀봉기로 덮고, O/N로 4℃에서 인큐베이팅한다.
4. 100 μ l의 3% BSA/PBST로 차단하고, 실온에서 1 hr 동안 인큐베이팅한다.
5. PBST로 3회 세척한다 (적어도 200 μ l 세척액/웰/세척).
6. 차단 용액 중의 1 ng/ml (50 μ l 부피에서)의 인간 IL-4를 첨가하고, 실온에서 1 hr 동안 인큐베이팅한다.
7. PBST로 3회 세척한다.
8. 차단 용액 중의 50 μ l 항체 샘플 (필요한 경우 종말점 역가 데이터를 얻기 위해 적정)을 첨가하고, rtp에서 1 hr 인큐베이팅한다. 인간 IL-4에 대한 결합을 위한 양성 대조군으로서, 비오틴화된 항-인간 IL-4 모노클로날 항체 (적정됨)를 사용한다.
9. PBST로 3회 세척한다.
10. 6A1 마우스 모노클로날 항체에 대해, 차단 용액 중에서 1/2000 희석액에서 1 hr 동안 rtp에서 50 μ l/웰의 항-마우스 IgG-HRP (시그마, 카탈로그 번호 A-9309)을 사용하여 결합을 검출한다. 6A1 키메릭 항체 또는 인간화 항체에 대해, 차단 용액 중에서 1/2000 희석액에서 1 hr 동안 rtp에서 50 μ l/웰의 항-인간 IgG-HRP (시그마, 카탈로그 번호 A-6029)을 사용하여 결합을 검출한다. 양성 대조군 비오틴화된 래트 항-인간 IL-4 모노클로날 항체에 대해, 스트렙타비딘-HRP 컨쥬게이팅된 항체를 사용하여 검출한다. (별법으로, 항-마우스 HRP 항체, P0260은 6A1과 비오틴화된 래트 항-인간 IL-4 모노클로날 항체를 모두 검출할 것이다).
11. PBST로 3회 세척한다.
12. 100 μ l OPD (시그마, 카탈로그 번호 P-9187, 제조자의 지시에 따라 제조)로 현상하고, 50 μ l 3M H₂SO₄로 정지시키고, 490 nm에서 흡광도를 판독한다.

7.6. 에피토프 맵핑 ELISA

본 분석은 인간 또는 사이노몰거스 IL-13 펩티드에 대한 마우스 mAb 6A1의 결합을 검출하는 ELISA를 설명한다.

7.6.1 물질

1. Nunc 면역플레이트 1 F96 Maxisorp (라이프 테크놀로지스, 4-39454A)
2. ImmunoPure© 스트렙타비딘 (피어스, 카탈로그 번호 21125)
3. PBST (포스페이트 완충 염수 + 0.05% Tween 20)
4. BSA (시그마 A-7030)

5. 인간 및 사이노몰거스 IL-13 16 mer 펩티드, 오프셋 = 4 (미모토펜스 고객 주문)
6. 양성 및 음성 대조군 20 mer 펩티드 (미모토펜스 고객 주문으로 제공)
7. 6A1 MAb
8. 대조군 Ab (미모토펜스 고객 주문으로 공급)
9. 토끼 항-마우스 Ig HRP 컨쥬게이팅된 항체 (다코, 코드 번호 P0260)
10. OPD (시그마, 카탈로그 번호 P-9187)
11. 3M 황산

7.6.2 방법

1. 차단 용액은 3% BSA+PBST이다.
2. 세척 용액은 PBST이다.
3. 희석제로서 PBST를 사용하여 'Nunc Maxisorp' ELISA 플레이트를 100 μ l의 5 μ g/ml ImmunoPure[®] 스트렙타비딘 (피어스, 카탈로그 번호 21125, 1 mg/ml의 원액 농도에서 제조자의 지시에 따라 제조하여 분취액으로 +4℃에서 보관)으로 코팅한다. 용액을 건조시키기 위해 O/N으로 37℃에서 인큐베이팅한다.
4. 200 μ l의 3% BSA/PBST로 차단한다. 플레이트 밀봉기를 첨가하고, rtp에서 1 hr 동안 인큐베이팅한다.
5. PBST로 3회 세척한다 (적어도 200 μ l 세척액/웰/세척).
6. 희석제로서 PBST를 사용하여, 각각의 펩티드의 1,000배 희석액 (제조자의 지시에 따라 200 μ l의 40% 아세트니트릴 및 60% 물에 용해시킨 후, 동일한 용매로 10배 희석액으로 분취하여 -20℃에서 보관)을 100 μ l/웰 (대조군 웰 제외)로 2회 첨가한다.
7. 대조군 웰에서, 희석제로서 PBST를 사용하여, 대조군 펩티드의 10배 희석액 (제조자의 지시에 따라 1 ml의 40% 아세트니트릴 및 60% 물에 용해시킨 후, -20℃에서 보관)을 100 μ l/웰로 2회 첨가한다. 플레이트 밀봉기를 첨가하고, rtp에서 1 hr 동안 진탕 테이블 상에서 인큐베이팅한다.
8. PBST로 3회 세척한다 (적어도 200 μ l 세척액/웰/세척).
9. PBST 중의 1.506 μ g/ml 마우스 mAb를 100 μ l/웰 (대조군 웰 제외)로 첨가한다.
10. 희석제로서 PBST를 사용하여 대조 항체의 4, 16 및 32배 희석액 (제조자에 의해 공급되고 -20℃에서 보관된 것을 사용)만을 대조군 웰에 100 μ l/웰로 첨가한다. 플레이트 밀봉기를 첨가하고 rtp에서 1 hr 동안 진탕 테이블 상에서 인큐베이팅한다.
11. PBST로 3회 세척한다 (적어도 200 μ l 세척액/웰/세척).
12. 희석제로서 PBST를 사용하여 토끼 항-마우스 Ig HRP-컨쥬게이팅된 항체 (다코, 코드 번호 P0260, 공급되고 +4℃에서 보관된 것을 사용)의 2,000배 희석액을 100 μ l/웰로 첨가한다. 플레이트 밀봉기를 첨가하고 rtp에서 1 hr 동안 진탕 테이블 상에서 인큐베이팅한다.
13. PBST로 3회 세척한다 (적어도 200 μ l 세척액/웰/세척).

14. 100 μ l OPD (시그마, 카탈로그 번호 P-9187. 제조자의 지시에 따라 제조)로 현상하고, 50 μ l 3M H₂SO₄로 정지시키고, 490 nm에서 흡광도를 관측한다. 현상 시간은 ~10분이다.

7.7. 에피토프 미세 맵핑 ELISA

본 분석은 인간 또는 사이노몰거스 IL-13 펩티드에 대한 mAb 6A1의 결합을 검출하는 ELISA를 설명한다.

7.7.1 물질

1. Nunc 면역플레이트 1 F96 Maxisorp (라이프 테크놀로지스, 4-39454A)
2. ImmunoPure© 스트렙타비딘 (피어스, 카탈로그 번호 21125)
3. PBST (포스페이트 완충 염수 + 0.05% Tween 20)
4. BSA (시그마 A-7030)
5. 인간 및 사이노몰거스 IL-13 부분 윈도우 넷 (window net) 펩티드 (N- 및 C-말단부 모두로부터 동시에 한 아미노산이 절단된 14-mer; 미모토펜스 고객 주문)
6. 양성 대조군 16 mer 펩티드 (사전에 미모토펜스 고객 주문으로 제공)
7. 6A1 mAb (자체 제조)
8. 염소 항-마우스 IgG (Fc 특이적) HRP 컨쥬게이팅된 항체 (시그마 A-9309)
9. OPD (시그마, 카탈로그 번호 P-9187)
10. 3M 황산

7.7.2 방법

1. 차단 용액은 3% BSA+PBST이다.
2. 세척 용액은 PBST이다.
3. 'Nunc Maxisorp' ELISA 플레이트를 초순수 중의 100 μ l의 5 μ g/ml ImmunoPure© 스트렙타비딘 (피어스, 카탈로그 번호 21125, 1 mg/ml의 원액 농도에서 제조자의 지시에 따라 제조하여 +4℃에서 보관). +37℃에서 철야 인큐베이팅한다.
4. PBST 중의 200 μ l의 3% BSA로 차단한다. 플레이트 밀봉기를 첨가하고, +4℃에서 철야 인큐베이팅한다.
5. PBST로 3회 세척한다 (적어도 200 μ l 세척액/웰/세척).
6. 희석제로서 PBST를 사용하여, 각각의 펩티드의 1,000배 희석액 (제조자의 지시에 따라 200 μ l의 40% 아세트니트릴 및 60% 물에 용해시키고, -20℃에서 보관)을 100 μ l/웰로 2회 첨가한다. 플레이트 밀봉기를 첨가하고 실온에서 1 hr 동안 진탕 테이블 상에서 인큐베이팅한다.
7. PBST로 3회 세척한다 (적어도 200 μ l 세척액/웰/세척).
8. PBST 중의 3% BSA로 희석된 3 μ g/ml 6A1을 100 μ l/웰로 첨가한다. 플레이트 밀봉기를 첨가하고 실온에서 1 hr 동안 진탕 테이블 상에서 인큐베이팅한다.

9. PBST로 3회 세척한다 (적어도 200 μ l 세척액/웰/세척).

10. 회색제로서 PBST 중의 3% BSA를 사용하여 염소 항-마우스 Ig HRP-컨쥬게이팅된 항체 (시그마 A-9309, 공급되고 +4°C에서 보관된 것을 사용)의 1,000배 회색액을 100 μ l/웰로 첨가한다. 플레이트 밀봉기를 첨가하고 실온에서 1 hr 동안 진탕 테이블 상에서 인큐베이팅한다.

11. PBST로 3회 세척한다 (적어도 200 μ l 세척액/웰/세척).

12. 100 μ l OPD (시그마, 카탈로그 번호 P-9187. 제조자의 지시에 따라 제조)로 현상하고, 50 μ l 3M H₂SO₄로 정지시키고, 490 nm에서 흡광도를 관독한다. 현상 시간은 ~10분이다.

7.8 Biacore™ 방법: IL13 항체의 인간화 구성체 대 전장 IL13

항체 포획 방법을 사용하여 Biacore 3000 기기로 동역학 분석을 수행하였다. 간단히 설명하면, 키메릭 6A1 및 인간화 항체 구성체에 대해 단백질 A 포획을 사용한 반면, 모 쥐 6A1 항체에 대해, 바이어코어 (Biacore)에서 공급하는 항-마우스 Fc 항체에 의한 포획을 사용하였다.

간단히 설명하면, 방법은 다음과 같다. 포획 리간드를 바이어코어 표준 프로토콜에 따라 바이어코어의 1차 아민 커플링 키트를 사용하여 1차 아민 커플링에 의해 CM5 바이오센서 칩에 고정시켰다. 방법은 50 mM N-히드록시-숙신이미드 (NHS) 및 200 mM N-에틸-N'-디메틸아미노프로필 카르보나이드 (EDC) 용액을 표면 상에 통과시켜 CM5 센서 표면을 활성화시키는 것을 포함한다. 이어서, 포획 리간드 (아세트이트 버퍼 pH5 또는 pH4.5에 용해됨)를 활성화된 센서 표면에 커플링시킨 후, 임의의 남아있는 활성화된 에스테르를 1M 에탄올아민 히드로클로라이드 (pH8.5)의 주사에 의해 차단하였다. 이어서, 후보 항체를 그 기원이 인간 또는 마우스이고 포획되었는지에 따라 단백질 A 또는 항-마우스 Fc 항체 표면 상에 통과시켰다. 안정한 결합 시그날이 관찰되면, IL13을 상이한 규정 농도로 포획된 항체 표면 상에 통과시켰다. 동역학을 결정하기 위해서 후속 결합 곡선을 바이어코어 분석 소프트웨어 BIAeval v4.1로 분석하였다. 바이어코어 HBS-EP 버퍼를 사용하여 실험을 수행하였다.

7.8.1 IL-13 항체 대 펩티드에 대한 Biacore™ 방법

IL-13 펩티드에 고정된 항체의 직접 결합을 사용하여 동역학 분석을 바이어코어 3000 기기로 수행하였다. 간단히 설명하면, 바이어코어 SA (스트렙타비딘) 바이오센서 칩을 사용하여 IL-13 비오티닐화된 펩티드를 포획하였다. 이어서, 항체를 상이한 농도로 센서 표면 상에 통과시켰다. 동역학을 결정하기 위해서 후속 결합 곡선을 바이어코어 분석 소프트웨어 BIAeval v4.1로 분석하였다. 바이어코어 HBS-EP 버퍼를 사용하여 실험을 수행하였다.

8. 사이노몰거스 천식 모델에서 L1+A1 인간화 항-IL-13 mAb의 효능

본 섹션은 예측 실시예이다.

사이노몰거스 원숭이 (*Macaca fascicularis*)에서 폐지회충-유도 (A.suum) 폐 기관지 수축 모델은 인간의 천식 또는 그에 관련된 비임상적 모델로서 인식된다 (Patterson R, et al Trans. Assoc. Am. Physicians 1980 93:317-325; Patterson R, et al J. Lab. Clin. Med. 1983 101:864-872).

상기 모델에서, A.suum에 대한 선천적인 폐 감수성을 갖는 동물을 분무된 A.suum에 노출시켜 천식 반응을 유도한다. 이 천식 반응은 기도 과다반응 (AHR), 기관지 폐포 세척 (BAL) 유체에서 측정된 세포 침윤 및 혈청 IgE 수준을 측정함으로써 특성화될 수 있다. 실험 방법은 이전에 문헌 [Mauser P, et al., Am. J. Resp. Crit. Care Med. 1995 204:467-472 및 Evanoff H, et al., Immunologic Investigation 1992 21:39]에 기재된 것과 유사하다.

상기 연구는 A.suum 항원의 특이적 투여량에 대한 양성 기관지 수축 반응을 보인 동물 중에서 미리 선택된 30마리의 동물을 사용한다. A.suum은 각각의 동물에 대해 최적 반응 투여량 (ORD)으로 투여된다. 이 투여량은 에어로졸 흡입 (분무기를 사용하여 15회의 호흡에 걸쳐 제공된 단일 투여를 위한)에 의해 R_L (폐 저항성)의 적어도 40% 증가 및 C_{DYN} (동적 폐탄성)의 적어도 35% 감소를 야기하는 A.suum의 소정 투여량이다.

연구는 2개의 상으로 수행한다. 1상 동안, AHR은 A.suum 항원 투여 (9일 및 10일, A.suum은 각각의 동물에 대해 에어로졸 흡입에 의해 소정의 최적 투여량으로 투여됨) 전 (1일에 기준선 폐 기능 평가) 및 후 (11일)에 정맥내 (i/v) 히스타민 접종 (R_L 을 기준선보다 적어도 30% 증가시키기에 충분한 히스타민 투여량 (PC_{30}))에 반응하여 평가된다.

2상은 동물을 항체 (하기 참조)를 사용하여 처리하는 것을 제외하고는 1상과 동일하고, 각각의 항체는 1, 5 및 9일에 i/v 주입에 의해 투여되는 약 30 mg/kg의 3회 투여량으로서 제공된다.

군 1 (n=12): L1+A1 (인간화 항-IL-13 mAb, 서열 18 및 서열 22)

군 2 (n=12): L1+A1 (인간화 항-IL-13 mAb, 30 mg/kg) 및 파스콜리주맙 (인간화 항-IL4 mAb, 30 mg/kg)

군 3 (n=6): 비히클 단독, 음성 대조군 처리

1상 및 2상으로부터의 AHR 관독치는 Buxco 폐 기기 시스템을 사용하여 압력 및 공기 유동 관독치 - 히스타민에 반응한 폐 저항 (R_L) 및 동적 폐탄성 (C_{DYN})으로 계산된다. A.suum 항원 접종 후에 비교한 기준선으로부터의 최대 변화를 [폐 저항 (R_L) 및 동적 폐탄성 (C_{DYN})에 대해]을 1상 및 2상, 즉 항체 처리 또는 비처리와 비교하고, 이들 데이터를 사용하여 AHR 표현형을 평가한다.

또한, BAL 샘플을 1상 및 2상에서 1일 및 11일에 취하여 세포 침윤 및 특히 호산구증을 평가한다. 혈청 샘플은 또한 IgE 수준을 모니터링하기 위해 채취한다.

[표 A]

단백질 또는 폴리뉴클레오티드 (PN)	서열 (서열 번호)
6A1, CDRH1	1
6A1, CDRH2	2
6A1, CDRH3	3
6A1, CDRL1	4
6A1, CDRL2	5
6A1, CDRL3	6
6A1, VH (쥐)	7
6A1, VL (쥐)	8
hIL-13	9
hIL-13 (PN)	10
6A1, VH, 인간화 구성체 A1	11
6A1, VH, 인간화 구성체 A2	12
6A1, VH, 인간화 구성체 A3	13
6A1, VH, 인간화 구성체 A4	14
6A1, VL, 인간화 구성체 L1	15
6A1, VL, 인간화 구성체 L2	16
6A1, 중쇄, 인간화 구성체 A1	18
6A1, 중쇄, 인간화 구성체 A2	19
6A1, 중쇄, 인간화 구성체 A3	20
6A1, 중쇄, 인간화 구성체 A4	21
6A1, 경쇄, 인간화 구성체 L1	22
6A1, 경쇄, 인간화 구성체 L2	23
6A1, PN 코딩 서열 7	24
6A1, PN 코딩 서열 8	25
6A1, PN 코딩 서열 11	26
6A1, PN 코딩 서열 12	27
6A1, PN 코딩 서열 13	28

6A1, PN 코딩 서열 14	29
6A1, PN 코딩 서열 15	30
6A1, PN 코딩 서열 16	31
6A1, PN 코딩 서열 18	32
6A1, PN 코딩 서열 19	33
6A1, PN 코딩 서열 20	34
6A1, PN 코딩 서열 21	35
6A1, PN 코딩 서열 22	36
6A1, PN 코딩 서열 23	37

도면의 간단한 설명

도 1

증가하는 농도에서 재조합 이. 콜라이 (E. coli)-발현된 인간 IL-13에 대한 모노클로날 항체 6A1의 결합을 보여주는 샌드위치 ELISA.

도 2A

인간 IL-13 수용체 $\alpha 1$ 사슬에 대한 재조합 이. 콜라이-발현된 인간 IL-13의 결합을 억제하는, 증가하는 농도에서 모노클로날 항체 6A1의 능력을 보여주는 ELISA.

도 2B

인간 IL-13 수용체 $\alpha 2$ 사슬에 대한 재조합 이. 콜라이-발현된 인간 IL-13의 결합을 억제하는, 증가하는 농도에서 모노클로날 항체 6A1의 능력을 보여주는 ELISA.

도 3

TF-1 세포 증식 분석에서 재조합 이. 콜라이-발현된 인간 및 사이노물거스의 생물활성을 억제하는, 증가하는 농도에서 6A1의 능력을 보여주는 중화 분석.

도 4

TF-1 세포 증식 분석에서 포유동물-발현된 (CHO 세포) 인간 IL-13의 생물활성을 억제하는, 증가하는 농도에서 6A1의 능력을 보여주는 중화 분석.

도 5

TF-1 세포 증식 분석에서 재조합 이. 콜라이-발현된 Q130 인간 IL-13의 생물활성을 억제하는, 증가하는 농도에서 6A1의 능력을 보여주는 중화 분석.

도 6

6A1이 재조합 이. 콜라이-발현된 인간 IL-4에 결합하지 않음을 보여주는 샌드위치 ELISA.

도 7

6A1이 TF-1 세포 증식 분석에서 재조합 이. 콜라이-발현된 인간 IL-5의 생물활성을 억제하지 않음을 보여주는 IL5 중화 분석.

도 8

증가하는 농도에서 재조합 이. 콜라이-발현된 인간 IL-13 및 사이노물거스 IL-13에 대한 키메릭 6A1 mAb의 결합을 보여주는 샌드위치 ELISA.

도 9

증가하는 농도에서 재조합 이. 콜라이-발현된 인간 IL-13에 대한 8개의 인간화 항-인간 IL-13 mAb의 결합을 보여주는 샌드위치 ELISA.

도 10a

증가하는 농도에서 재조합 이. 콜라이-발현된 인간 IL-13에 대한 키메릭 6A1, L1+ A1 및 L2+ A1의 결합을 보여주는 샌드위치 ELISA.

도 10b

증가하는 농도에서 재조합 이. 콜라이-발현된 사이노물거스 IL-13에 대한 키메릭 6A1, L1+ A1 및 L2+ A1의 결합을 보여주는 샌드위치 ELISA.

도 11

증가하는 농도에서 천연 인간 IL-13에 대한 키메릭 6A1, L1+ A1 및 L2+ A1의 결합을 보여주는 샌드위치 ELISA.

도 12a

인간 IL-13 수용체 α1 사슬에 대한 재조합 이. 콜라이-발현된 인간 IL-13의 결합을 억제하는, 증가하는 농도에서 모노클로날 항체 6A1, 키메릭 6A1, L1+ A1 및 L2+ A1의 능력을 보여주는 ELISA.

도 12b

인간 IL-13 수용체 α2 사슬에 대한 재조합 이. 콜라이-발현된 인간 IL-13의 결합을 억제하는, 증가하는 농도에서 모노클로날 항체 6A1, 키메릭 6A1, L1+ A1 및 L2+ A1의 능력을 보여주는 ELISA.

도 13a

TF-1 세포 증식 분석에서 재조합 이. 콜라이-발현된 인간 IL-13의 생물활성을 억제하는, 증가하는 농도에서 6A1, 키메릭 6A1, L1+ A1 및 L2+ A1의 능력을 보여주는 중화 분석.

도 13b

TF-1 세포 증식 분석에서 재조합 이. 콜라이-발현된 사이노물거스 IL-13의 생물활성을 억제하는, 증가하는 농도에서 6A1, 키메릭 6A1, L1+ A1 및 L2+ A1의 능력을 보여주는 중화 분석.

도 13c

TF-1 세포 증식 분석에서 재조합 이. 콜라이-발현된 Q130 인간 IL-13의 생물활성을 억제하는, 증가하는 농도에서 6A1, 키메릭 6A1, L1+ A1 및 L2+ A1의 능력을 보여주는 중화 분석

도 13d

TF-1 세포 증식 분석에서 포유동물-발현된 (CHO 세포) 인간 IL-13의 생물활성을 억제하는, 증가하는 농도에서 6A1, 키메릭 6A1, L1+ A1 및 L2+ A1의 능력을 보여주는 중화 분석.

도 14a

6A1, 키메릭 6A1, L1+ A1 및 L2+ A1이 재조합 이. 콜라이-발현된 인간 IL-4에 결합하지 않음을 보여주는 샌드위치 ELISA.

도 14b

6A1, 키메릭 6A1, L1+ A1 및 L2+ A1이 재조합 이. 콜라이-발현된 인간 GM-CSF에 결합하지 않음을 보여주는 샌드위치 ELISA.

도 14c

TF-1 세포 증식 분석에서 6A1, 키메릭 6A1, L1+ A1 및 L2+ A1이 재조합 이. 콜라이-발현된 인간 IL-5의 생물활성을 억제하지 않음을 보여주는 IL5 중화 분석.

도 15

인간 및 사이노몰거스 IL-13에 대한 6A1의 결합 에피토프를 결정하기 위한 에피토프 맵핑 (mapping) ELISA.

도 16a

인간 IL-13에 대한 6A1의 양호한 결합 특이성을 확인하기 위한 에피토프 맵핑 ELISA

도 16b

사이노몰거스 IL-13에 대한 6A1의 양호한 결합 특이성을 확인하기 위한 에피토프 맵핑 ELISA

도 17a

6A1의 인간 IL-13에 대한 결합에 필요한 중요한 아미노산 잔기를 결정하기 위한 에피토프 맵핑 ELISA.

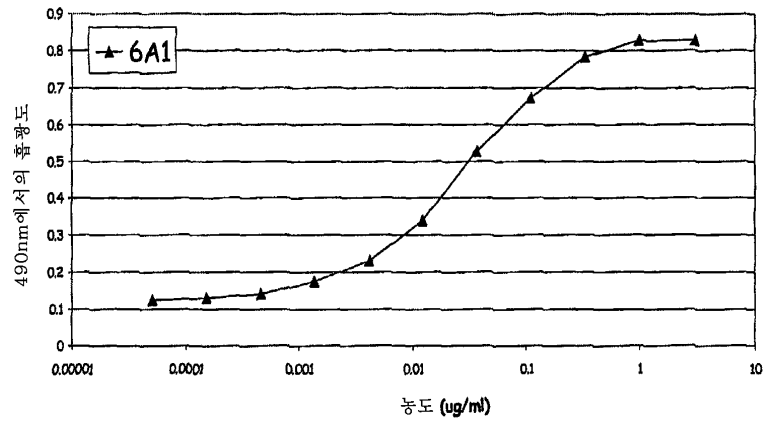
도 17b

L1+ A1의 인간 IL-13에 대한 결합에 필요한 중요한 아미노산 잔기를 결정하기 위한 에피토프 맵핑 ELISA.

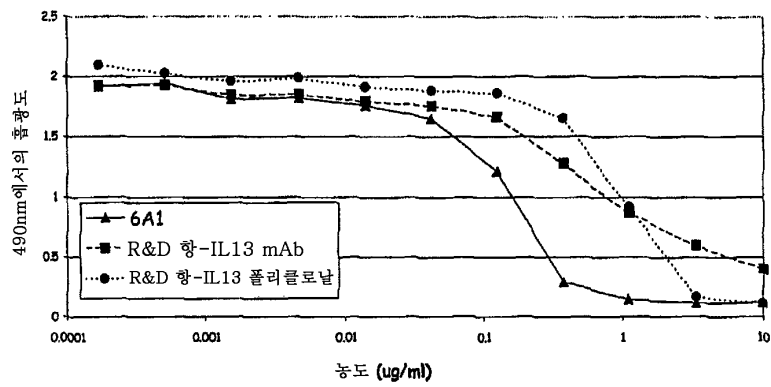
도 17c 및 17d는 모 (쥐) 6A1 (도 17c) 및 인간화 L1-A1 항체에 대한 알라닌 스캐닝 분석을 보여주는 그래프이다.

도면

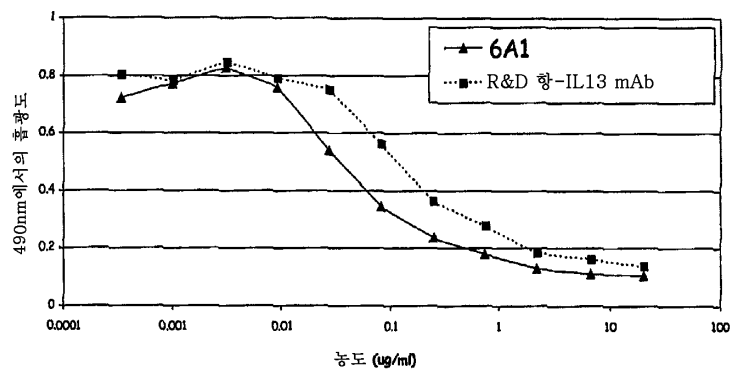
도면1



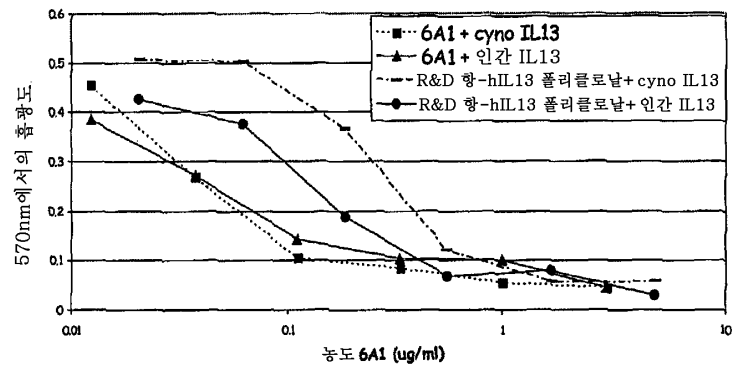
도면2a



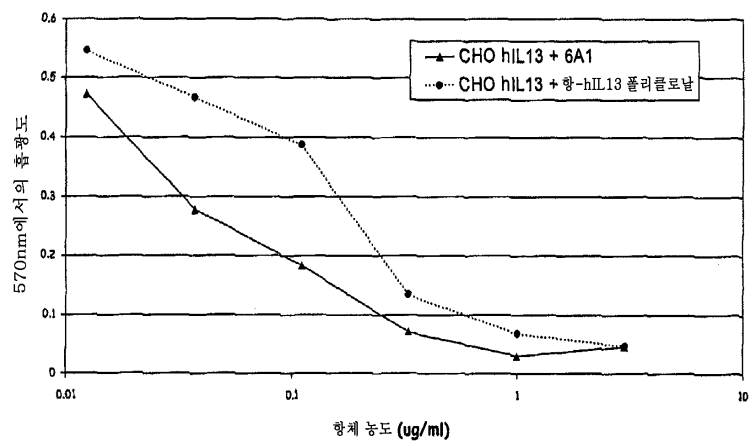
도면2b



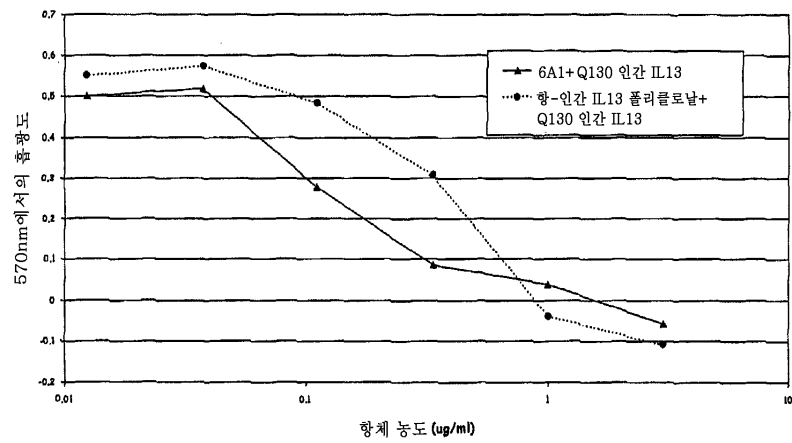
도면3



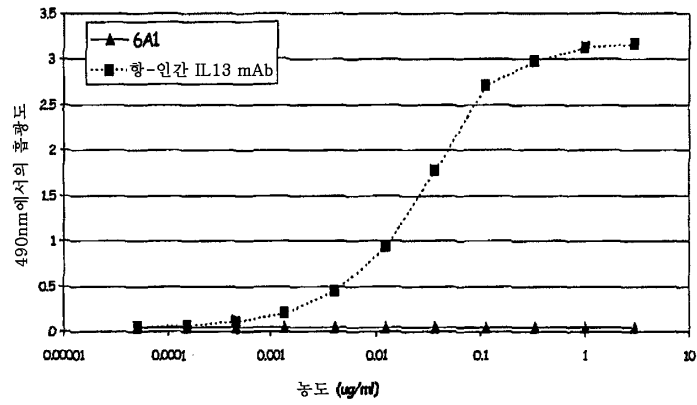
도면4



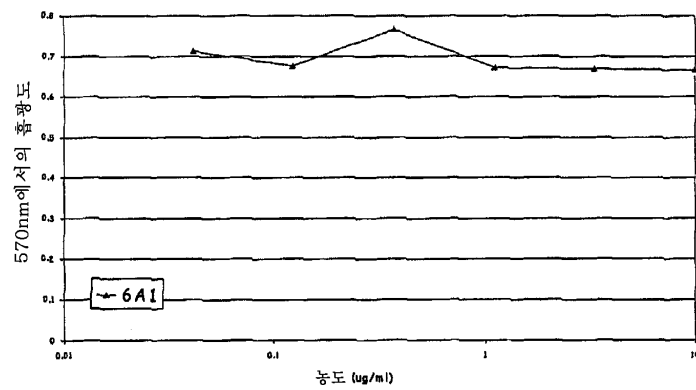
도면5



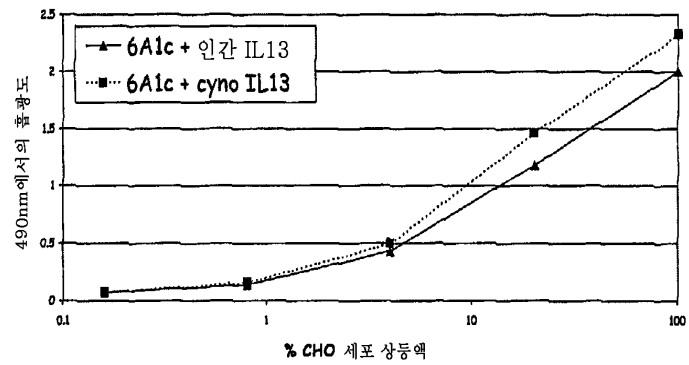
도면6



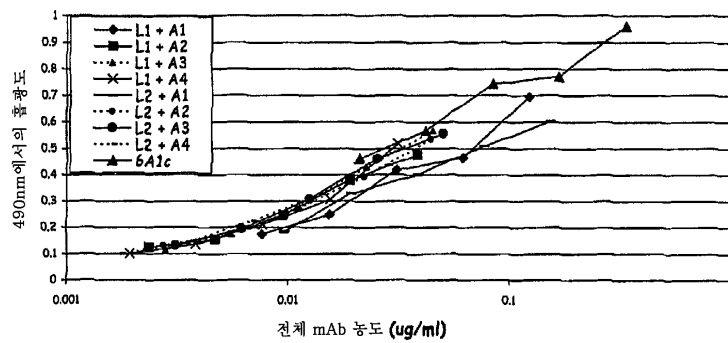
도면7



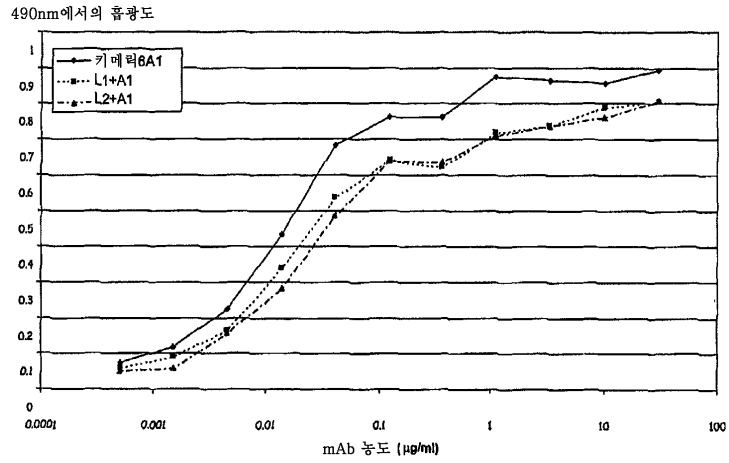
도면8



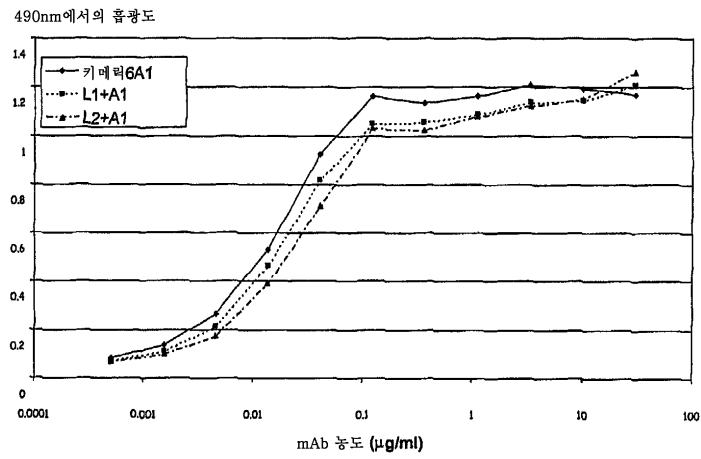
도면9



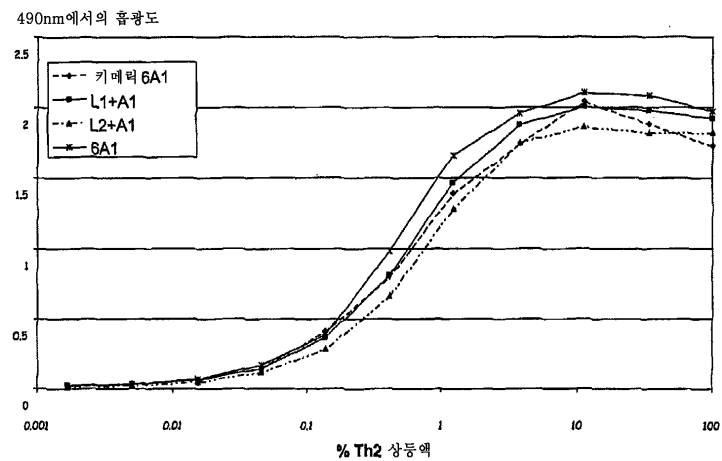
도면10a



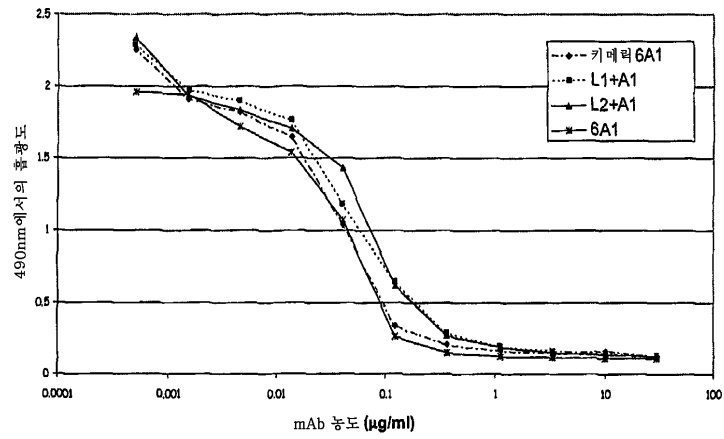
도면10b



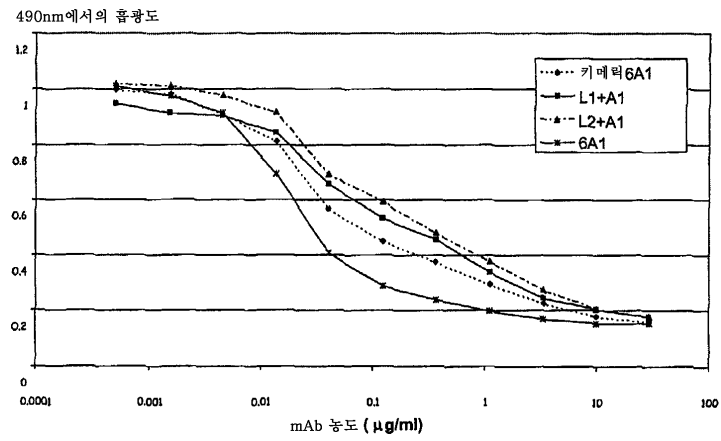
도면11



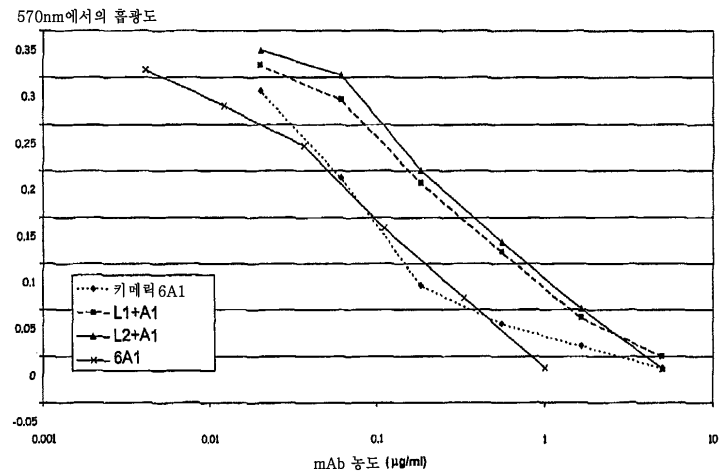
도면12a



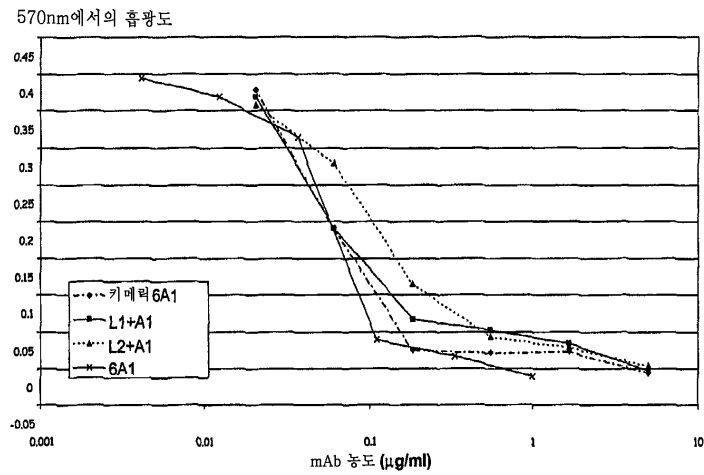
도면12b



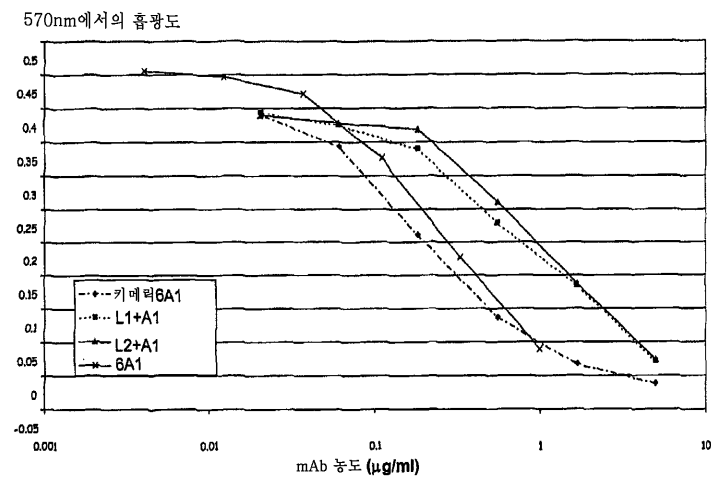
도면13a



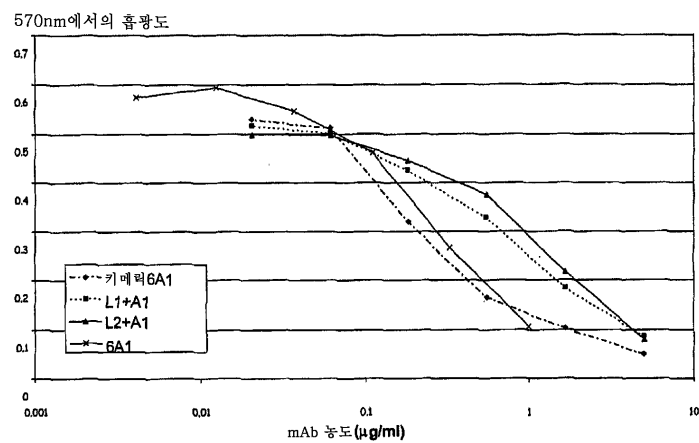
도면13b



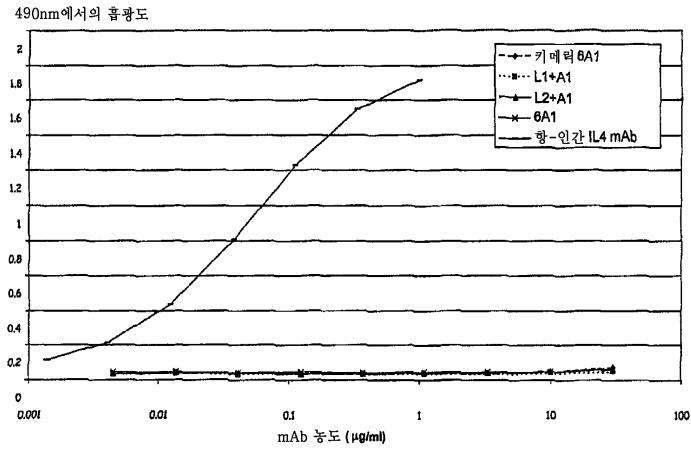
도면13c



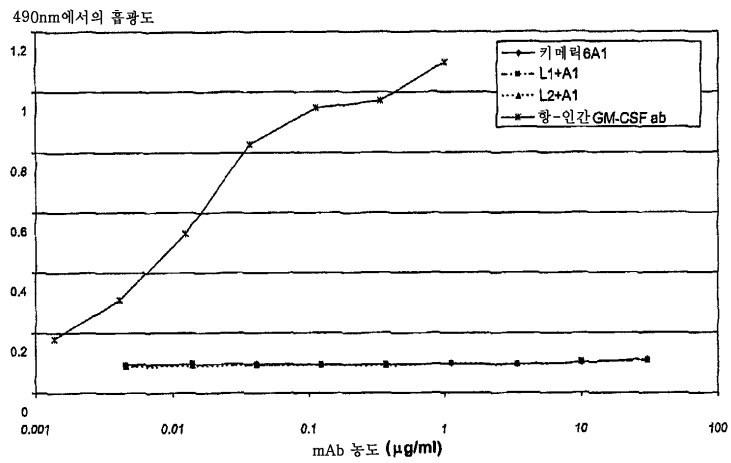
도면13d



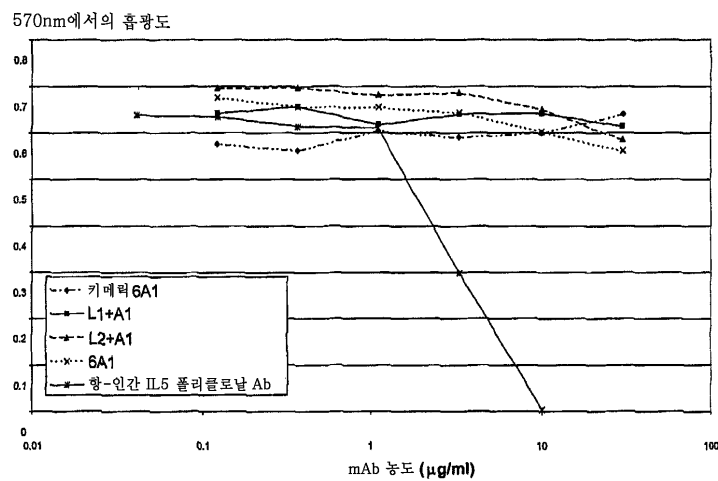
도면14a



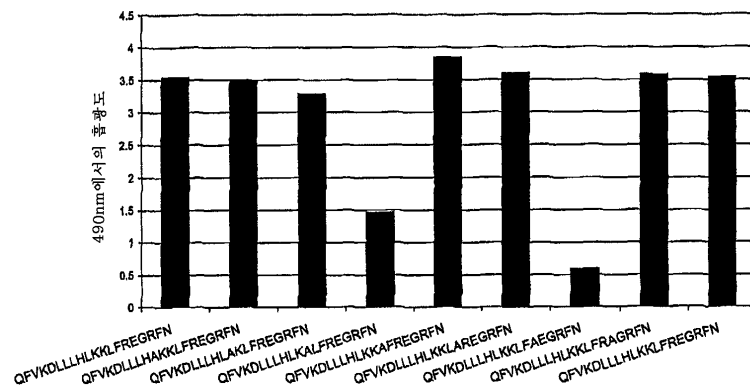
도면14b



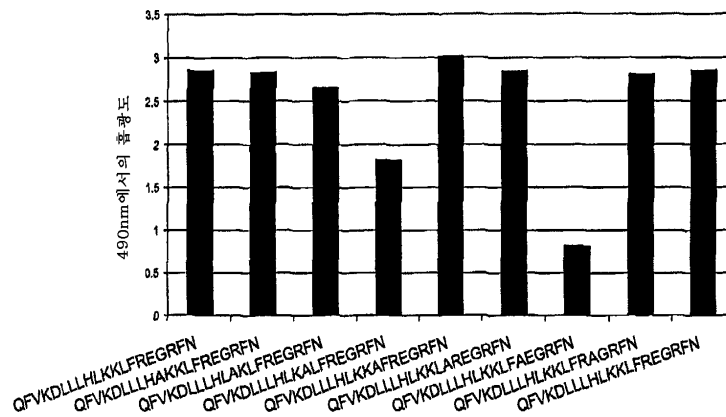
도면14c



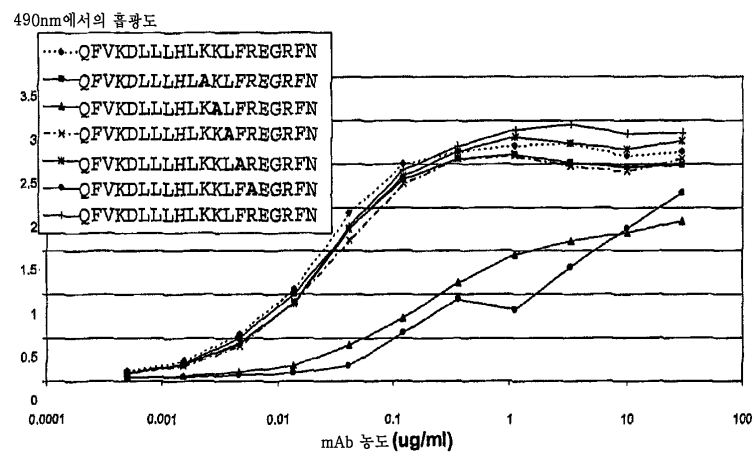
도면17a



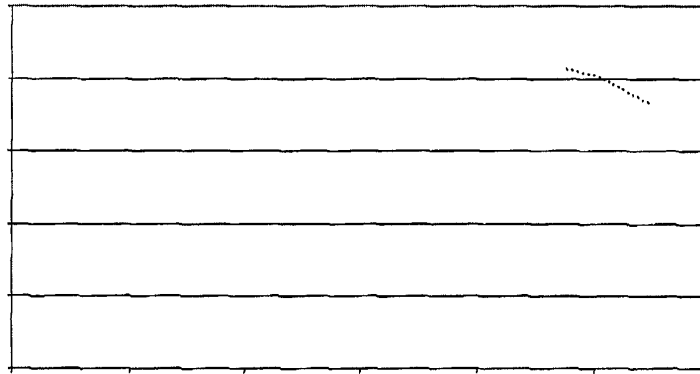
도면17b



도면17c



도면17d



서열목록

<110> Glaxo Group Limited

Ashman, Claire

Cassidy, Martin J

Ellis, Jonathan H

Wattam, Trevor AK

<120> Immunoglobulins

<130> GCN/PB60929

<140> PCT/GB2005/002581

<141> 2005-06-30

<150> GB 0414799.7

<151> 2004-07-01

<150> GB 0423675.8

<151> 2004-10-25

<160> 136

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 1

Phe Tyr Ile Lys Asp Thr Tyr Met His
1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 2

Thr Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Val Pro Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 3

Ser Ile Tyr Asp Asp Tyr His Tyr Asp Asp Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 4

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 4

Arg Ser Ser Gln Asn Ile Val His Ile Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
1 5 10 15

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 5

Lys Ile Ser Asp Arg Phe Ser
1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 6

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Trp Thr
1 5

<210> 7

<211> 125

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 7

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

Ser Val Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Tyr Ile Lys Asp Thr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Ile Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Thr Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Val Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Arg Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Ile Tyr Asp Asp Tyr His Tyr Asp Asp Tyr Tyr Ala Met
100 105 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 8

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 8

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Ile Val His Ile
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Ile Ser Asp Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 9

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

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> 10

<211> 339

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 10

ggccctgtgc ctccctctac agccctcagg gagctcattg aggagctggg caacatcacc 60
cagaaccaga aggctccgct ctgcaatggc agcatgggtat ggagcatcaa cctgacagct 120
ggcatgtact gtgcagccct ggaatccctg atcaacgtgt caggctgcag tgccatcgag 180
aagaccacaga ggatgctgag cggattctgc ccgcacaagg tctcagctgg gcagttttcc 240
agcttgcatg tccgagacac caaaatcgag gtggcccagt ttgtaaagga cctgctctta 300
catttaaaga aacttttttcg cgagggacgg ttcaactga 339

<210> 11

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> 6A1, VH, humanised construct A1

<400> 11

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Tyr Ile Lys Asp Thr
20 25 30

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

Gly Thr Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Val Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Ile Tyr Asp Asp Tyr His Tyr Asp Asp Tyr Tyr Ala Met
100 105 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 12

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> 6A1, VH, humanised construct A2

<400> 12

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Tyr Ile Lys Asp Thr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Ile Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Thr Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Val Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Ile Tyr Asp Asp Tyr His Tyr Asp Asp Tyr Tyr Ala Met
100 105 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 13

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> 6A1, VH, humanised construct A3

<400> 13

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Tyr Ile Lys Asp Thr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Ile Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Thr Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Val Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Ile Tyr Asp Asp Tyr His Tyr Asp Asp Tyr Tyr Ala Met
100 105 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 14

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> 6A1, VH, humanised construct A4

<400> 14

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

Ser Val Arg Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Tyr Ile Lys Asp Thr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Ile Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Thr Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Val Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Ile Tyr Asp Asp Tyr His Tyr Asp Asp Tyr Tyr Ala Met
100 105 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 15

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> 6A1, VL, humanised construct L1

<400> 15

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Ile Val His Ile
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Ile Ser Asp Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Asp Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 16

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> 6A1, VL, humanised construct L2

<400> 16

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Ile Val His Ile
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Ile Ser Asp Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Asp Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 17

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

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

Val His Ser

<210> 18

<211> 455

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> 6A1, heavy chain, humanised construct A1

<400> 18

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Tyr Ile Lys Asp Thr
20 25 30

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

Gly Thr Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Val Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Ile Tyr Asp Asp Tyr His Tyr Asp Asp Tyr Tyr Ala Met
100 105 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
115 120 125

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

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

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

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

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
195 200 205

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
210 215 220

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
225 230 235 240

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
245 250 255

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
260 265 270

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
275 280 285

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
290 295 300

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
305 310 315 320

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
325 330 335

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
340 345 350

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
355 360 365

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
370 375 380

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
385 390 395 400

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
405 410 415

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
420 425 430

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
435 440 445

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455

<210> 19

<211> 455

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> 6A1, heavy chain, humanised construct A2

<400> 19

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Tyr Ile Lys Asp Thr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Ile Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Thr Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Val Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Ile Tyr Asp Asp Tyr His Tyr Asp Asp Tyr Tyr Ala Met
100 105 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
115 120 125

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

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

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

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

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
195 200 205

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
210 215 220

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
225 230 235 240

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
245 250 255

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
260 265 270

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
275 280 285

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
290 295 300

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
305 310 315 320

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
325 330 335

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
340 345 350

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
355 360 365

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
370 375 380

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
385 390 395 400

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
405 410 415

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
420 425 430

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
435 440 445

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455

<210> 20

<211> 455

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> 6A1, heavy chain, humanised construct A3

<400> 20

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Tyr Ile Lys Asp Thr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Ile Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Thr Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Val Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Ile Tyr Asp Asp Tyr His Tyr Asp Asp Tyr Tyr Ala Met
100 105 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
115 120 125

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

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

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

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

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
195 200 205

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
210 215 220

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
225 230 235 240

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
245 250 255

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
260 265 270

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
275 280 285

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
290 295 300

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
305 310 315 320

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
325 330 335

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
340 345 350

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
355 360 365

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
370 375 380

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
385 390 395 400

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
405 410 415

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
420 425 430

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
435 440 445

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455

<210> 21

<211> 455

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> 6A1, heavy chain, humanised construct A4

<400> 21

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

Ser Val Arg Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Tyr Ile Lys Asp Thr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Ile Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Thr Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Val Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Ile Tyr Asp Asp Tyr His Tyr Asp Asp Tyr Tyr Ala Met
100 105 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
115 120 125

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

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

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

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

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
195 200 205

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
210 215 220

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
225 230 235 240

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
245 250 255

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
260 265 270

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
275 280 285

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
290 295 300

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
305 310 315 320

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
325 330 335

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
340 345 350

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
355 360 365

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
370 375 380

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
385 390 395 400

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
405 410 415

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
420 425 430

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
435 440 445

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455

<210> 22

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> 6A1, light chain, humanised construct L1

<400> 22

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Ile Val His Ile
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Ile Ser Asp Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Asp Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 23

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> 6A1, light chain, humanised construct L2

<400> 23

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Ile Val His Ile
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Ile Ser Asp Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Asp Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 24

<211> 375

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> 6A1, PN encoding SEQ ID NO: 7

<400> 24

gaaattcagc tgcagcagtc tgtggcagaa cttgtgaggc caggggcctc agtcagggtg	60
tcctgcacag cttctggcctt ctacattaaa gacacctata tgcactgggt gattcagagg	120
cctgaacagg gcctggagtg gattggaacg attgatcctg cgaatggtaa tactaaatat	180
gtcccgaagt tccagggcaa ggccactata actgcagaca catcctcaa cacagcctac	240
ctgcggctca gcagcctgac atctgaggac actgccatct attactgtgc tagaagcatc	300
tatgatgatt accactacga cgattactat gctatggact actgggggtca aggaacctca	360
gtcaccgtct cctca	375

<210> 25

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> 6A1, PN encoding SEQ ID NO: 8

<400> 25

gatgttttga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc	60
atctcttgca gatctagtca gaacattgta catattaatg gaaacaccta tttagaatgg	120
taccttcaga aaccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaaatttc cgaccgattt	180
tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac gctcaagatc	240
agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaagggtc acatgttccg	300
tggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa	336

<210> 26

<211> 375

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> 6A1, PN encoding SEQ ID NO: 11

<400> 26

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc	60
tcctgcaagg cttctggatt ctacattaaa gacacctata tgcactgggt gcgacaggcc	120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggaacg attgatcctg cgaatggtaa tactaaatat	180
gtcccgaagt tccagggcag agtcacgatt accgcggacg aatccacgag cacagcctac	240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagaagcatc 300
tatgatgatt accactacga cgattactat gctatggact actggggcca agggacacta 360
gtcacagtct cctca 375

<210> 27

<211> 375

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> 6A1, PN encoding SEQ ID NO: 12

<400> 27

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggatt ctacattaaa gacacctata tgcactgggt gatacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggaacg attgatcctg cgaatggtaa tactaaatat 180
gtcccgaagt tccagggcag agtcacgatt accgcggacg aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagaagcatc 300
tatgatgatt accactacga cgattactat gctatggact actggggcca agggacacta 360
gtcacagtct cctca 375

<210> 28

<211> 375

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> 6A1, PN encoding SEQ ID NO: 13

<400> 28

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cttctggatt ctacattaaa gacacctata tgcactgggt gatacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggaacg attgatcctg cgaatggtaa tactaaatat 180
 gtcccgaagt tccagggcag agtcacgatt accgcggaca catccacgag cacagcctac 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagaagcatc 300
 tatgatgatt accactacga cgattactat gctatggact actggggcca agggacacta 360
 gtcacagtct cctca 375

<210> 29

<211> 375

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> 6A1, PN encoding SEQ ID NO: 14

<400> 29

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgagggtc 60
 tcctgcaagg cttctggatt ctacattaaa gacacctata tgcactgggt gatacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggaacg attgatcctg cgaatggtaa tactaaatat 180
 gtcccgaagt tccagggcag agtcacgatt accgcggaca catccacgag cacagcctac 240
 atgaggctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagaagcatc 300
 tatgatgatt accactacga cgattactat gctatggact actggggcca agggacacta 360
 gtcacagtct cctca 375

<210> 30

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> 6A1, PN encoding SEQ ID NO: 15

<400> 30

gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttgaga gccggcctcc	60
atctcctgca gatctagtca gaacattgta catattaatg gaaacaccta tttagaatgg	120
tacctgcaga agccagggca gtctccacgg ctcttgatct ataaaatttc cgaccgattt	180
tctgggggtcc ctgacagggt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac attgaaaatc	240
agcagagtgg aggctgacga tggttgaatt tattactgct ttcaagggtc acatgttccg	300
tggacgtttg gccaggggac caagctggag atcaag	336

<210> 31

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> 6A1, PN encoding SEQ ID NO: 16

<400> 31

gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttgaga gccggcctcc	60
atctcctgca gatctagtca gaacattgta catattaatg gaaacaccta tttagaatgg	120
tacctgcaga agccagggca gtctccacgg ctcttgatct ataaaatttc cgaccgattt	180
tctgggggtcc ctgacagggt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac attgaaaatc	240
agcagagtgg aggctgacga tggttggagt tattactgct ttcaagggtc acatgttccg	300
tggacgtttg gccaggggac caagctggag atcaag	336

<210> 32

<211> 1368

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> 6A1, PN encoding SEQ ID NO: 18

<400> 32

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc	60
tcctgcaagg cttctggatt ctacattaaa gacacctata tgcactgggt gcgacaggcc	120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggaacg attgatcctg cgaatggtaa tactaaatat	180
gtcccgaagt tccagggcag agtcacgatt accgcggacg aatccacgag cacagcctac	240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagaagcatc	300
tatgatgatt accactacga cgattactat gctatggact actggggcca agggacacta	360
gtcacagtct cctcagcctc caccaagggc ccatcgggtct tccccctggc accctcctcc	420
aagagcacct ctggggggcac agcggccctg ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa	480
ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggct	540
gtcctacagt cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc	600
ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac	660
aagaaagttg agcccaaadc ttgtgacaaa actcacacat gccaccgtg cccagcacct	720
gaactcctgg ggggaccgtc agtcttctc tccccccaa aaccaagga caccctcatg	780
atctcccga cccctgaggt cacatgcgtg gtggtggacg tgagccacga agaccctgag	840
gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg	900
gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac	960
tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag gtctccaaca aagccctccc agccccatc	1020
gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc	1080
ccatccccgg atgagctgac caagaaccag gtcagcctga cctgcctggc caaaggcttc	1140
tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag	1200
accagcctc ccgtgctgga ctccgacggc tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg	1260

gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg 1320

cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc ctgtctccgg gtaaatga 1368

<210> 33

<211> 1368

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> 6A1, PN encoding SEQ ID NO: 19

<400> 33

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60

tcctgcaagg cttctggatt ctacattaaa gacacctata tgcactgggt gatacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggaacg attgatcctg cgaatggtaa tactaaatat 180

gtcccgaagt tccagggcag agtcacgatt accgcggacg aatccacgag cacagcctac 240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagaagcatc 300

tatgatgatt accactacga cgattactat gctatggact actggggcca agggacacta 360

gtcacagtct cctcagcctc caccaagggc ccatcggtct tccccctggc accctcctcc 420

aagagcacct ctgggggcac agcggccctg ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa 480

ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggct 540

gtcctacagt cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc 600

ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac 660

aagaaagttg agcccaaadc ttgtgacaaa actcacacat gccaccgtg cccagcacct 720

gaactcctgg ggggaccgtc agtcttccctc ttccccccaa aaccaagga caccctcatg 780

atctcccga cccctgaggt cacatgcgtg gtggtggacg tgagccacga agaccctgag 840

gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg 900

gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac 960

tggctgaatg gcaaggagta caagtgaag gtctccaaca aagccctccc agcccccatc 1020
gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc 1080
ccatcccggg atgagctgac caagaaccag gtcagcctga cctgcctggg caaaggcttc 1140
tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag 1200
accacgcctc ccggtgctgga ctccgacggc tccttcttcc tctacagcaa gctcacctg 1260
gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg 1320
cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc ctgtctccgg gtaaatga 1368

<210> 34

<211> 1368

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> 6A1, PN encoding SEQ ID NO: 20

<400> 34

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggatt ctacattaaa gacacctata tgcactgggt gatacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggaacg attgatcctg cgaatggtaa tactaaatat 180
gtcccgaagt tccagggcag agtcacgatt accgcggaaca catccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagaagcatc 300
tatgatgatt accactacga cgattactat gctatggact actggggcca agggacacta 360
gtcacagtct cctcagcctc caccaagggc ccatcggtct tccccctggc accctcctcc 420
aagagcacct ctggggggcac agcgggccctg ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa 480
ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggct 540
gtcctacagt cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc 600
ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac 660

aagaaagtgtg agcccaaatac ttgtgacaaa actcacacat gccaccgtg cccagcacct 720
gaactcctgg ggggaccgtc agtcttcttc tccccccaa aaccaagga caccctcatg 780
atctcccga cccctgaggt cacatgctg gtggtggacg tgagccacga agaccctgag 840
gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg 900
gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac 960
tggctgaatg gcaaggagta caagtgaag gtctccaaca aagccctccc agccccatc 1020
gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc 1080
ccatcccggg atgagctgac caagaaccag gtcagcctga cctgcctggg caaaggcttc 1140
tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag 1200
accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc tccttcttcc tctacagcaa gctcacctg 1260
gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg 1320
cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc ctgtctccgg gtaaatga 1368

<210> 35

<211> 1368

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> 6A1, PN encoding SEQ ID NO: 21

<400> 35

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgagggtc 60
tcctgcaagg cttctggatt ctacattaaa gacacctata tgcactgggt gatacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggaacg attgatcctg cgaatggtaa tactaaatat 180
gtcccgaagt tccagggcag agtcacgatt accgcggaca catccacgag cacagcctac 240
atgaggctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagaagcatc 300
tatgatgatt accactacga cgattactat gctatggact actggggcca agggacacta 360

gtcacagtct cctcagcctc caccaagggc ccatcggtct tccccctggc accctcctcc 420
aagagcacct ctggggggcac agcggccctg ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa 480
ccggtgacgg tgctgtggaa ctcaggcgcc ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggct 540
gtcctacagt cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc 600
ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac 660
aagaaagttg agcccaaadc ttgtgacaaa actcacacat gccaccgtg cccagcacct 720
gaactcctgg ggggaccgtc agtcttctc ttcccccaa aaccaagga caccctcatg 780
atctcccga cccctgaggt cacatgcgtg gtggtggacg tgagccacga agaccctgag 840
gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg 900
gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac 960
tggctgaatg gcaaggagta caagtgaag gtctccaaca aagccctccc agccccatc 1020
gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc 1080
ccatcccggg atgagctgac caagaaccag gtcagcctga cctgcctggg caaaggcttc 1140
tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag 1200
accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg 1260
gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg 1320
cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc ctgtctccgg gtaaatga 1368

<210> 36

<211> 660

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> 6A1, PN encoding SEQ ID NO: 22

<400> 36

gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggcctcc 60

atctcctgca gatctagtca gaacattgta catattaatg gaaacaccta tttagaatgg	120
tacctgcaga agccagggca gtctccacgg ctcttgatct ataaaatttc cgaccgattt	180
tctgggggtcc ctgacagggt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac attgaaaatc	240
agcagagtgg aggctgacga tgttggaatt tattactgct ttcaagggtc acatgttccg	300
tggacgtttg gccaggggac caagctggag atcaagcgta cggtaggctgc accatctgtc	360
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg	420
ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggacaa cgccctccaa	480
tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc	540
agcagcacc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgctgcgaa	600
gtcacccatc agggcctgag ctgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgttag	660

<210> 37

<211> 660

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> 6A1, PN encoding SEQ ID NO: 23

<400> 37

gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca ccctggaga gccggcctcc	60
atctcctgca gatctagtca gaacattgta catattaatg gaaacaccta tttagaatgg	120
tacctgcaga agccagggca gtctccacgg ctcttgatct ataaaatttc cgaccgattt	180
tctgggggtcc ctgacagggt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac attgaaaatc	240
agcagagtgg aggctgacga tgttggagtt tattactgct ttcaagggtc acatgttccg	300
tggacgtttg gccaggggac caagctggag atcaagcgta cggtaggctgc accatctgtc	360
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg	420
ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggacaa cgccctccaa	480

tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540
 agcagcaccc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgctgcgaa 600
 gtcacccatc agggcctgag ctgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgttag 660

<210> 38

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated 16 mer peptide synthesised to map the location of the B cell epitope of IL-13 recognised by mAb 6A1

<400> 38

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

Val Asn Ile Thr
 20

<210> 39

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated 16 mer peptide synthesised to map the location of the B cell epitope of IL-13 recognised by mAb 6A1

<400> 39

Ser Gly Ser Gly Leu Arg Glu Leu Ile Glu Glu Leu Val Asn Ile Thr
 1 5 10 15

Gln Asn Gln Lys
20

<210> 40

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated 16 mer peptide synthesised to map the location of the B cell epitope of IL-13 recognised by mAb 6A1

<400> 40

Ser Gly Ser Gly Ile Glu Glu Leu Val Asn Ile Thr Gln Asn Gln Lys
1 5 10 15

Ala Pro Leu Cys
20

<210> 41

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated 16 mer peptide synthesised to map the location of the B cell epitope of IL-13 recognised by mAb 6A1

<400> 41

Ser Gly Ser Gly Val Asn Ile Thr Gln Asn Gln Lys Ala Pro Leu Cys
1 5 10 15

Asn Gly Ser Met
20

<210> 42

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated 16 mer peptide synthesised to map the location of the B cell epitope of IL-13 recognised by mAb 6A1

<400> 42

Ser	Gly	Ser	Gly	Gln	Asn	Gln	Lys	Ala	Pro	Leu	Cys	Asn	Gly	Ser	Met
1				5					10					15	

Val	Trp	Ser	Ile
			20

<210> 43

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated 16 mer peptide synthesised to map the location of the B cell epitope of IL-13 recognised by mAb 6A1

<400> 43

Ser	Gly	Ser	Gly	Ala	Pro	Leu	Cys	Asn	Gly	Ser	Met	Val	Trp	Ser	Ile
1				5					10					15	

Asn	Leu	Thr	Ala
			20

<210> 44

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated 16 mer peptide synthesised to map the location of the B cell epitope of IL-13 recognised by mAb 6A1

<400> 44

Ser Gly Ser Gly Asn Gly Ser Met Val Trp Ser Ile Asn Leu Thr Ala
1 5 10 15

Gly Met Tyr Cys
20

<210> 45

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated 16 mer peptide synthesised to map the location of the B cell epitope of IL-13 recognised by mAb 6A1

<400> 45

Ser Gly Ser Gly Val Trp Ser Ile Asn Leu Thr Ala Gly Met Tyr Cys
1 5 10 15

Ala Ala Leu Glu
20

<210> 46

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated 16 mer peptide synthesised to map the location of the B cell epitope of IL-13 recognised by mAb 6A1

<400> 46

Ser Gly Ser Gly Asn Leu Thr Ala Gly Met Tyr Cys Ala Ala Leu Glu
1 5 10 15

Ser Leu Ile Asn
20

<210> 47

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated 16 mer peptide synthesised to map the location of the B cell epitope of IL-13 recognised by mAb 6A1

<400> 47

Ser Gly Ser Gly Gly Met Tyr Cys Ala Ala Leu Glu Ser Leu Ile Asn
1 5 10 15

Val Ser Gly Cys
20

<210> 48

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated 16 mer peptide synthesised to map the location of the B cell epitope of IL-13 recognised by mAb 6A1

<400> 48

Ser Gly Ser Gly Ala Ala Leu Glu Ser Leu Ile Asn Val Ser Gly Cys
1 5 10 15

Ser Ala Ile Glu
20

<210> 49

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated 16 mer peptide synthesised to map the location of the B cell epitope of IL-13 recognised by mAb 6A1

<400> 49

Ser Gly Ser Gly Ser Leu Ile Asn Val Ser Gly Cys Ser Ala Ile Glu
1 5 10 15

Lys Thr Gln Arg
20

<210> 50

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated 16 mer peptide synthesised to map the location of the B cell epitope of IL-13 recognised by mAb 6A1

<400> 50

Ser Gly Ser Gly Val Ser Gly Cys Ser Ala Ile Glu Lys Thr Gln Arg
1 5 10 15

Met Leu Ser Gly
20

<210> 51

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated 16 mer peptide synthesised to map the location of the B cell epitope of IL-13 recognised by mAb 6A1

<400> 51

Ser Gly Ser Gly Ser Ala Ile Glu Lys Thr Gln Arg Met Leu Ser Gly
1 5 10 15

Phe Cys Pro His
20

<210> 52

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated 16 mer peptide synthesised to map the location of the B cell epitope of IL-13 recognised by mAb 6A1

<400> 52

Ser Gly Ser Gly Lys Thr Gln Arg Met Leu Ser Gly Phe Cys Pro His
1 5 10 15

Lys Val Ser Ala
20

<210> 53

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated 16 mer peptide synthesised to map the location of the B cell epitope of IL-13 recognised by mAb 6A1

<400> 53

Ser Gly Ser Gly Met Leu Ser Gly Phe Cys Pro His Lys Val Ser Ala
1 5 10 15

Gly Gln Phe Ser
20

<210> 54

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated 16 mer peptide synthesised to map the location of the

e B cell epitope of IL-13 recognised by mAb 6A1

<400> 54

Ser Gly Ser Gly Phe Cys Pro His Lys Val Ser Ala Gly Gln Phe Ser
1 5 10 15

Ser Leu His Val
20

<210> 55

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated 16 mer peptide synthesised to map the location of the B cell epitope of IL-13 recognised by mAb 6A1

<400> 55

Ser Gly Ser Gly Lys Val Ser Ala Gly Gln Phe Ser Ser Leu His Val
1 5 10 15

Arg Asp Thr Lys
20

<210> 56

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated 16 mer peptide synthesised to map the location of the B cell epitope of IL-13 recognised by mAb 6A1

<400> 56

Ser Gly Ser Gly Gly Gln Phe Ser Ser Leu His Val Arg Asp Thr Lys
1 5 10 15

Ile Glu Val Ala
20

<210> 57

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated 16 mer peptide synthesised to map the location of the B cell epitope of IL-13 recognised by mAb 6A1

<400> 57

Ser Gly Ser Gly Ser Leu His Val Arg Asp Thr Lys Ile Glu Val Ala
1 5 10 15

Gln Phe Val Lys
20

<210> 58

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated 16 mer peptide synthesised to map the location of the B cell epitope of IL-13 recognised by mAb 6A1

<400> 58

Ser Gly Ser Gly Arg Asp Thr Lys Ile Glu Val Ala Gln Phe Val Lys
1 5 10 15

Asp Leu Leu Leu
20

<210> 59

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated 16 mer peptide synthesised to map the location of the B cell epitope of IL-13 recognised by mAb 6A1

<400> 59

Ser Gly Ser Gly Ile Glu Val Ala Gln Phe Val Lys Asp Leu Leu Leu
1 5 10 15

His Leu Lys Lys
20

<210> 60

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated 16 mer peptide synthesised to map the location of the B cell epitope of IL-13 recognised by mAb 6A1

<400> 60

Ser Gly Ser Gly Gln Phe Val Lys Asp Leu Leu Leu His Leu Lys Lys
1 5 10 15

Leu Phe Arg Glu
20

<210> 61

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated 16 mer peptide synthesised to map the location of the B cell epitope of IL-13 recognised by mAb 6A1

<400> 61

Ser Gly Ser Gly Asp Leu Leu Leu His Leu Lys Lys Leu Phe Arg Glu
1 5 10 15

Gly Arg Phe Asn
20

<210> 62

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated 16 mer peptide synthesised to map the location of the B cell epitope of IL-13 recognised by mAb 6A1

<400> 62

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

Val Asn Ile Thr
20

<210> 63

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated 16 mer peptide synthesised to map the location of the B cell epitope of IL-13 recognised by mAb 6A1

<400> 63

Ser Gly Ser Gly Leu Lys Glu Leu Ile Glu Glu Leu Val Asn Ile Thr
1 5 10 15

Gln Asn Gln Lys
20

<210> 64

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated 16 mer peptide synthesised to map the location of the B cell epitope of IL-13 recognised by mAb 6A1

<400> 64

Ser Gly Ser Gly Asn Gly Ser Met Val Trp Ser Ile Asn Leu Thr Ala
1 5 10 15

Gly Val Tyr Cys
20

<210> 65

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated 16 mer peptide synthesised to map the location of the B cell epitope of IL-13 recognised by mAb 6A1

<400> 65

Ser	Gly	Ser	Gly	Val	Trp	Ser	Ile	Asn	Leu	Thr	Ala	Gly	Val	Tyr	Cys
1				5					10					15	

Ala	Ala	Leu	Glu
			20

<210> 66

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated 16 mer peptide synthesised to map the location of the B cell epitope of IL-13 recognised by mAb 6A1

<400> 66

Ser	Gly	Ser	Gly	Asn	Leu	Thr	Ala	Gly	Val	Tyr	Cys	Ala	Ala	Leu	Glu
1				5					10					15	

Ser	Leu	Ile	Asn
			20

<210> 67

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated 16 mer peptide synthesised to map the location of the B cell epitope of IL-13 recognised by mAb 6A1

<400> 67

Ser Gly Ser Gly Gly Val Tyr Cys Ala Ala Leu Glu Ser Leu Ile Asn
1 5 10 15

Val Ser Gly Cys
20

<210> 68

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated 16 mer peptide synthesised to map the location of the B cell epitope of IL-13 recognised by mAb 6A1

<400> 68

Ser Gly Ser Gly Val Ser Gly Cys Ser Ala Ile Glu Lys Thr Gln Arg
1 5 10 15

Met Leu Asn Gly
20

<210> 69

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated 16 mer peptide synthesised to map the location of the B cell epitope of IL-13 recognised by mAb 6A1

<400> 69

Ser Gly Ser Gly Ser Ala Ile Glu Lys Thr Gln Arg Met Leu Asn Gly
1 5 10 15

Phe Cys Pro His
20

<210> 70

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated 16 mer peptide synthesised to map the location of the B cell epitope of IL-13 recognised by mAb 6A1

<400> 70

Ser Gly Ser Gly Lys Thr Gln Arg Met Leu Asn Gly Phe Cys Pro His
1 5 10 15

Lys Val Ser Ala
20

<210> 71

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated 16 mer peptide synthesised to map the location of the B cell epitope of IL-13 recognised by mAb 6A1

<400> 71

Ser Gly Ser Gly Met Leu Asn Gly Phe Cys Pro His Lys Val Ser Ala
1 5 10 15

Gly Gln Phe Ser
20

<210> 72

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated 16 mer peptide synthesised to map the location of the B cell epitope of IL-13 recognised by mAb 6A1

<400> 72

Ser Gly Ser Gly Phe Cys Pro His Lys Val Ser Ala Gly Gln Phe Ser
1 5 10 15

Ser Leu Arg Val
20

<210> 73

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated 16 mer peptide synthesised to map the location of the

e B cell epitope of IL-13 recognised by mAb 6A1

<400> 73

Ser Gly Ser Gly Lys Val Ser Ala Gly Gln Phe Ser Ser Leu Arg Val
1 5 10 15

Arg Asp Thr Lys
20

<210> 74

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated 16 mer peptide synthesised to map the location of the B cell epitope of IL-13 recognised by mAb 6A1

<400> 74

Ser Gly Ser Gly Gly Gln Phe Ser Ser Leu Arg Val Arg Asp Thr Lys
1 5 10 15

Ile Glu Val Ala
20

<210> 75

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated 16 mer peptide synthesised to map the location of the B cell epitope of IL-13 recognised by mAb 6A1

<400> 75

Ser Gly Ser Gly Ser Leu Arg Val Arg Asp Thr Lys Ile Glu Val Ala
1 5 10 15

Gln Phe Val Lys
20

<210> 76

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated 16 mer peptide synthesised to map the location of the B cell epitope of IL-13 recognised by mAb 6A1

<400> 76

Ser Gly Ser Gly Arg Asp Thr Lys Ile Glu Val Ala Gln Phe Val Lys
1 5 10 15

Asp Leu Leu Val
20

<210> 77

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated 16 mer peptide synthesised to map the location of the B cell epitope of IL-13 recognised by mAb 6A1

<400> 77

Ser Gly Ser Gly Ile Glu Val Ala Gln Phe Val Lys Asp Leu Leu Val
1 5 10 15

His Leu Lys Lys
20

<210> 78

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated 16 mer peptide synthesised to map the location of the B cell epitope of IL-13 recognised by mAb 6A1

<400> 78

Ser Gly Ser Gly Gln Phe Val Lys Asp Leu Leu Val His Leu Lys Lys
1 5 10 15

Leu Phe Arg Glu
20

<210> 79

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated 16 mer peptide synthesised to map the location of the B cell epitope of IL-13 recognised by mAb 6A1

<400> 79

Ser Gly Ser Gly Asp Leu Leu Val His Leu Lys Lys Leu Phe Arg Glu
1 5 10 15

Gly Gln Phe Asn
20

<210> 80

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 80

Gln	Phe	Val	Lys	Asp	Leu	Leu	Leu	His	Leu	Lys	Lys	Leu	Phe	Arg	Glu
1				5					10					15	

<210> 81

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 81

Asp	Leu	Leu	Leu	His	Leu	Lys	Lys	Leu	Phe	Arg	Glu	Gly	Arg	Phe	Asn
1				5					10					15	

<210> 82

<211> 16

<212> PRT

<213> Macaca fascicularis

<400> 82

Gln	Phe	Val	Lys	Asp	Leu	Leu	Val	His	Leu	Lys	Lys	Leu	Phe	Arg	Glu
1				5					10					15	

<210> 83

<211> 16

<212> PRT

<213> *Macaca fascicularis*

<400> 83

Asp	Leu	Leu	Val	His	Leu	Lys	Lys	Leu	Phe	Arg	Glu	Gly	Gln	Phe	Asn
1				5					10					15	

<210> 84

<211> 12

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 84

Asp	Leu	Leu	Leu	His	Leu	Lys	Lys	Leu	Phe	Arg	Glu
1				5					10		

<210> 85

<211> 12

<212> PRT

<213> *Macaca fascicularis*

<400> 85

Asp	Leu	Leu	Val	His	Leu	Lys	Lys	Leu	Phe	Arg	Glu
1				5					10		

<210> 86

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> VH forward primer

<400> 86

gatgaagctt gccaccatga aatgcagctg ggtcattc

37

<210> 87

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> VH reverse primer

<400> 87

gatggactag tgttccttga cccagta

28

<210> 88

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> VL forward primer

<400> 88

gatgaagctt gccaccatga agttgcctgt taggctg

37

<210> 89

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> VL reverse primer

<400> 89

gatgcgtacg tttgatttcc agcttggtgc c

31

<210> 90

<211> 112

<212> PRT

<213> *Macaca fascicularis*

<400> 90

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 Val His Leu Lys Lys Leu Phe Arg Glu Gly Gln Phe Asn
100 105 110

<210> 91

<211> 339

<212> DNA

<213> *Macaca fascicularis*

<400> 91

```
agccctgtgc ctccctctac agccctcaag gagctcattg aggagctggt caacatcacc      60
cagaaccaga agggcccgcct ctgcaatggc agcatggtgt ggagcatcaa cctgacagct      120
ggcgtgtact gtgcagccct ggaatccctg atcaacgtgt caggctgcag tgccatcgag      180
aagaccacaga ggatgctgaa cggattctgc ccgcacaagg tctcagctgg gcagttttcc      240
agcttgctgtg tccgagacac caaaatcgag gtggcccagt ttgtaaagga cctgctcgta      300
catttaaaga aactttttcg cgagggacag ttcaactga                               339
```

<210> 92

<211> 126

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 92

```
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1              5              10              15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Tyr Ile Lys Asp Thr
              20              25              30

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

Gly Thr Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Val Pro Lys Phe
              50              55              60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65              70              75              80
```

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

Ala Arg Ser Ile Tyr Asp Asp Tyr His Tyr Asp Asp Tyr Tyr Ala Met
100 105 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly
115 120 125

<210> 93

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 93

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Ile Val His Ile
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Ile Ser Asp Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Asp Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 94

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated peptide used for epitope fine-mapping of 6A1

<400> 94

Ser	Gly	Ser	Gly	Lys	Asp	Leu	Leu	Leu	His	Leu	Lys	Lys	Leu	Phe	Arg
1				5					10					15	

Glu Gly

<210> 95

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated peptide used for epitope fine-mapping of 6A1

<400> 95

Ser	Gly	Ser	Gly	Asp	Leu	Leu	Leu	His	Leu	Lys	Lys	Leu	Phe	Arg	Glu
1				5					10					15	

Gly

<210> 96

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated peptide used for epitope fine-mapping of 6A1

<400> 96

Ser	Gly	Ser	Gly	Leu	Leu	Leu	His	Leu	Lys	Lys	Leu	Phe	Arg	Glu	Gly
1				5					10					15	

<210> 97

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated peptide used for epitope fine-mapping of 6A1

<400> 97

Ser	Gly	Ser	Gly	Leu	Leu	His	Leu	Lys	Lys	Leu	Phe	Arg	Glu	Gly
1				5				10					15	

<210> 98

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated peptide used for epitope fine-mapping of 6A1

<400> 98

Ser Gly Ser Gly Leu His Leu Lys Lys Leu Phe Arg Glu Gly
1 5 10

<210> 99

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated peptide used for epitope fine-mapping of 6A1

<400> 99

Ser Gly Ser Gly His Leu Lys Lys Leu Phe Arg Glu Gly
1 5 10

<210> 100

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated peptide used for epitope fine-mapping of 6A1

<400> 100

Ser Gly Ser Gly Leu Lys Lys Leu Phe Arg Glu Gly
1 5 10

<210> 101

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated peptide used for epitope fine-mapping of 6A1

<400> 101

Ser Gly Ser Gly Lys Lys Leu Phe Arg Glu Gly
1 5 10

<210> 102

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated peptide used for epitope fine-mapping of 6A1

<400> 102

Ser Gly Ser Gly Lys Leu Phe Arg Glu Gly
1 5 10

<210> 103

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated peptide used for epitope fine-mapping of 6A1

<400> 103

Ser Gly Ser Gly Leu Phe Arg Glu Gly
1 5

<210> 104

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated peptide used for epitope fine-mapping of 6A1

<400> 104

Ser Gly Ser Gly Phe Arg Glu Gly
1 5

<210> 105

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated peptide used for epitope fine-mapping of 6A1

<400> 105

Ser Gly Ser Gly Lys Asp Leu Leu Leu His Leu Lys Lys Leu Phe Arg
1 5 10 15

Glu

<210> 106

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated peptide used for epitope fine-mapping of 6A1

<400> 106

Ser Gly Ser Gly Lys Asp Leu Leu Leu His Leu Lys Lys Leu Phe Arg
1 5 10 15

<210> 107

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated peptide used for epitope fine-mapping of 6A1

<400> 107

Ser Gly Ser Gly Lys Asp Leu Leu Leu His Leu Lys Lys Leu Phe
1 5 10 15

<210> 108

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated peptide used for epitope fine-mapping of 6A1

<400> 108

Ser Gly Ser Gly Lys Asp Leu Leu Leu His Leu Lys Lys Leu
1 5 10

<210> 109

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated peptide used for epitope fine-mapping of 6A1

<400> 109

Ser	Gly	Ser	Gly	Lys	Asp	Leu	Leu	Leu	His	Leu	Lys	Lys
1				5					10			

<210> 110

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated peptide used for epitope fine-mapping of 6A1

<400> 110

Ser	Gly	Ser	Gly	Lys	Asp	Leu	Leu	Leu	His	Leu	Lys
1				5					10		

<210> 111

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated peptide used for epitope fine-mapping of 6A1

<400> 111

Ser	Gly	Ser	Gly	Lys	Asp	Leu	Leu	Leu	His	Leu
1				5					10	

<210> 112

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated peptide used for epitope fine-mapping of 6A1

<400> 112

Ser	Gly	Ser	Gly	Lys	Asp	Leu	Leu	Leu	His
1				5					10

<210> 113

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated peptide used for epitope fine-mapping of 6A1

<400> 113

Ser	Gly	Ser	Gly	Lys	Asp	Leu	Leu	Leu
1				5				

<210> 114

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated peptide used for epitope fine-mapping of 6A1

<400> 114

Ser Gly Ser Gly Lys Asp Leu Leu
1 5

<210> 115

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated peptide used for epitope fine-mapping of 6A1

<400> 115

Ser Gly Ser Gly Lys Asp Leu Leu Val His Leu Lys Lys Leu Phe Arg
1 5 10 15

Glu Gly

<210> 116

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated peptide used for epitope fine-mapping of 6A1

<400> 116

Ser	Gly	Ser	Gly	Asp	Leu	Leu	Val	His	Leu	Lys	Lys	Leu	Phe	Arg	Glu
1				5					10					15	

Gly

<210> 117

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated peptide used for epitope fine-mapping of 6A1

<400> 117

Ser	Gly	Ser	Gly	Leu	Leu	Val	His	Leu	Lys	Lys	Leu	Phe	Arg	Glu	Gly
1				5					10					15	

<210> 118

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated peptide used for epitope fine-mapping of 6A1

<400> 118

Ser	Gly	Ser	Gly	Leu	Val	His	Leu	Lys	Lys	Leu	Phe	Arg	Glu	Gly
1				5					10					15

<210> 119

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated peptide used for epitope fine-mapping of 6A1

<400> 119

Ser	Gly	Ser	Gly	Val	His	Leu	Lys	Lys	Leu	Phe	Arg	Glu	Gly
1				5					10				

<210> 120

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated peptide used for epitope fine-mapping of 6A1

<400> 120

Ser	Gly	Ser	Gly	Lys	Asp	Leu	Leu	Val	His	Leu	Lys	Lys	Leu	Phe	Arg
1				5					10					15	

Glu

<210> 121

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated peptide used for epitope fine-mapping of 6A1

<400> 121

Ser	Gly	Ser	Gly	Lys	Asp	Leu	Leu	Val	His	Leu	Lys	Lys	Leu	Phe	Arg
1				5					10					15	

<210> 122

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated peptide used for epitope fine-mapping of 6A1

<400> 122

Ser	Gly	Ser	Gly	Lys	Asp	Leu	Leu	Val	His	Leu	Lys	Lys	Leu	Phe
1				5					10					15

<210> 123

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated peptide used for epitope fine-mapping of 6A1

<400> 123

Ser	Gly	Ser	Gly	Lys	Asp	Leu	Leu	Val	His	Leu	Lys	Lys	Leu
1				5					10				

<210> 124

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated peptide used for epitope fine-mapping of 6A1

<400> 124

Ser	Gly	Ser	Gly	Lys	Asp	Leu	Leu	Val	His	Leu	Lys	Lys
1				5					10			

<210> 125

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated peptide used for epitope fine-mapping of 6A1

<400> 125

Ser	Gly	Ser	Gly	Lys	Asp	Leu	Leu	Val	His	Leu	Lys
1				5					10		

<210> 126

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated peptide used for epitope fine-mapping of 6A1

<400> 126

Ser	Gly	Ser	Gly	Lys	Asp	Leu	Leu	Val	His	Leu
1				5						10

<210> 127

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated peptide used for epitope fine-mapping of 6A1

<400> 127

Ser	Gly	Ser	Gly	Lys	Asp	Leu	Leu	Val	His
1				5					10

<210> 128

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated peptide used for epitope fine-mapping of 6A1

<400> 128

Ser	Gly	Ser	Gly	Lys	Asp	Leu	Leu	Val
1				5				

<210> 129

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated peptide used for alanine scanning of the 6A1 binding epitope

<400> 129

Gln	Phe	Val	Lys	Asp	Leu	Leu	Leu	His	Leu	Lys	Lys	Leu	Phe	Arg	Glu
1				5					10					15	

Gly	Arg	Phe	Asn
			20

<210> 130

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated peptide used for alanine scanning of the 6A1 binding epitope

<400> 130

Gln	Phe	Val	Lys	Asp	Leu	Leu	Leu	His	Ala	Lys	Lys	Leu	Phe	Arg	Glu
1				5					10					15	

Gly	Arg	Phe	Asn
			20

<210> 131

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated peptide used for alanine scanning of the 6A1 binding epitope

<400> 131

Gln Phe Val Lys Asp Leu Leu Leu His Leu Ala Lys Leu Phe Arg Glu
1 5 10 15

Gly Arg Phe Asn
20

<210> 132

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated peptide used for alanine scanning of the 6A1 binding epitope

<400> 132

Gln Phe Val Lys Asp Leu Leu Leu His Leu Lys Ala Leu Phe Arg Glu
1 5 10 15

Gly Arg Phe Asn
20

<210> 133

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated peptide used for alanine scanning of the 6A1 binding epitope

<400> 133

Gln	Phe	Val	Lys	Asp	Leu	Leu	Leu	His	Leu	Lys	Lys	Ala	Phe	Arg	Glu
1				5					10					15	

Gly	Arg	Phe	Asn
			20

<210> 134

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated peptide used for alanine scanning of the 6A1 binding epitope

<400> 134

Gln	Phe	Val	Lys	Asp	Leu	Leu	Leu	His	Leu	Lys	Lys	Leu	Ala	Arg	Glu
1				5					10					15	

Gly	Arg	Phe	Asn
			20

<210> 135

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated peptide used for alanine scanning of the 6A1 binding

epitope

<400> 135

Gln	Phe	Val	Lys	Asp	Leu	Leu	Leu	His	Leu	Lys	Lys	Leu	Phe	Ala	Glu
1				5					10					15	

Gly	Arg	Phe	Asn
			20

<210> 136

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Biotinylated peptide used for alanine scanning of the 6A1 binding epitope

<400> 136

Gln	Phe	Val	Lys	Asp	Leu	Leu	Leu	His	Leu	Lys	Lys	Leu	Phe	Arg	Ala
1				5					10					15	

Gly	Arg	Phe	Asn
			20