



(10) FI20060188 A7

SUOMI – FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

(11) (21) Patentihakemus - Patentansökan 20060188

(51) Kv.lk. - Int.kl.

C07K 14/54 (2006.01)
C07K 14/715 (2006.01)
C07K 14/435 (2006.01)

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag 24.02.2006

(24) Aikupäivä - Löpdag 20.07.2004

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig 28.04.2006

(86) Kv. hakemus - Int. ansökan PCT/US04/23310

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet

29.08.2003	US	498906 P	09.12.2003	US	528228 P
17.12.2003	US	530182 P	08.04.2004	US	820559 P

(71) Hakija - Sökande

1 •Bayer Pharmaceuticals Corporation, 400 Morgan Lane, West Haven, CT 06516, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1 •Pan,Clark, 22362 Princeton Place, Castro Valley, CA 94552, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
2 •Roczniak,Steve, 11 Hidden Valley Road, Lafayette, CA 94552, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
3 •Greve,Jeffrey Michael, 1066 Park Hills Road, Berkeley, CA 94708, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
4 •Yung,Stephanie L., 616 8th avenue, San Francisco, CA 94118, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
5 •Longphere,Malinda, 3432 Guido Street, Oakland, CA 94602, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
6 •Wong,Teresa Mo-fun, 510 Silverado Drive, Lafayette, CA 94549, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
7 •Tomkinson,Adrian, 775 Bates Avenue, El Cerrito, CA 94530, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud: Heinänen Oy Patenttitoimisto
Annankatu 31-33 C, 00100 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Modifioitui IL-4-muteiinin reseptorin antagonistit
Modifierade IL-4-mutein-receptor-antagonister

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Tämä keksintö koskee muunnettuja IL-4-muteiinireseptorin antagonistteja, jotka käsittävät IL-4-muteiinireseptorin antagonistin, joka on kytketty polyetyleeniglykoliiin. Saadaan alkaen myös niihin liittyviä formulaatioita ja niiden annoksia ja antomenetelmiä terapeuttisiin tarkoituksiin. Nämä muunnellut IL-4-muteiinireseptoriantagonistit, koostumukset ja menetelmät saavat aikaan mahdollisuuden hoitaa sellaisia henkilöitä, joita vaivaavat hengitysteiden sairaus, kuten esimerkiksi astma, inhiboimalla IL-4- ja IL-13-välitteinen hengitysteiden yliherkkyys ja eosinofilia. Näillä antagonistteilla on muuntamattomaan IL-4RA:han verrattuna pitempi puoliintumisaika plasmassa ja siksi aivan erityisesti pidentynyt vaikutuksen kesto

Denna uppfinning avser modifierade IL-4-muteinreceptorantagonister som omfattar en IL-4-muteinreceptorantagonist kopplad till polyetylenglykol. Det erhålls även relaterade formulationer och doser och administreringsförfaranden för terapeutiska syften. Dessa modifierade IL-4-muteinreceptorantagonister, sammansättningar och förfaranden möjliggör behandling av personer som lider av andningsstörningar, såsom astma, genom att inhibera luftvägarnas IL-4- och IL-13-förmedlade hyperresponsivitet och eosinofili. Jämfört med omodifierad IL-4RA har dessa antagonister en längre halveringstid i plasma och därför i synnerhet en långvarigare påverkan.

Muunnettuja IL-4-muteiinin reseptorin antagonisteja

Ristiviittaus

5

Tämä hakemus vaatii etuoikeushyötyä väliaikaisista US-patenttihakemuksista numeroista 60/498 906, joka on jätetty virastoon elokuun 29. päivänä 2003, 60/528 228, joka on jätetty virastoon joulukuun 9. päivänä 2003, sekä 60/530 182, joka on jätetty virastoon 17. päivänä joulukuuta 2003, joiden hakemusten julkaisut
10 sisällytetään tähän täsmällisesti viitteinä.

Keksinnön ala

Tämä keksintö koskee IL-4-muteiini reseptorin antagonistia, joka on kytketty
15 polymeeriin joka ei ole proteiini, kuten esimerkiksi polyetyleeniglykoliin. Lisäksi saadaan aikaan sen läheisesti yhteenkuuluvia formulaatioita, annoksia ja antomenetelmiä terapeuttisia tarkoituksia varten. Nämä muunnetut IL-4-muteiini reseptorin antagonistit ja niihin liittyvät koostumukset ja menetelmät ovat
20 käyttökelpoisia saataessa aikaan hoitomahdollisuus henkilöille, joita vaivaavat vakava astma, krooninen ahtauttava keuhkosairaus ja näille läheiset keuhkosairaudet.

Keksinnön tausta

25 Astmalle on ominaista epävakaa, palautuva ilmavirtauksen rajoittuminen ja hengitysteiden yliherkkyys (AHR), niihin liittyvä aktivoituneiden T-lymfosyyttien (T-solujen) ja eosinofiilien infiltroituminen keuhkolimakalvoon. Nämä solut hengitystiehyessä olevien syöttösolujen kanssa erittävät sytokiineja ja välittäjäaineita, jotka esittävät perustavaa laatua olevaa roolia sairauden
30 patogeneesissä. CD4+ Th2 -solujen on ajateltu organisoivan sairastumistapahtuman spesifisten sytokiinien (IL-4:n, IL-5:n, IL-9:n sekä IL-13:n) vapautumisen kautta (1,2). Erityisesti Th2-sytokiinien IL-4:n ja IL-13:n on ajateltu

oleva avainasemassa hengitysteiden tulehduksen ja hengitysteiden yliherkkyyden kehittymiselle ja ylläpidolle.

Myös joukko *in vivo* -tutkimuksia tukee IL-4:n ja IL-13:n ratkaiseva roolia astman patogeneesissä. Käyttämällä eläimiä, joilta puuttuu jompikumpi sytokiini, tai reagensseja, jotka neutraloivat joko IL-4:n tai IL-13:n toimintaa, havaitaan näiden sytokiinien tärkeä rooli hengitysteiden tulehdukseen tai yliherkkyyteen johtavan primaarisen sekä sekundaarisen immuunivasteen säätelyssä (3,4). Nämä tiedot viittaavat lisäksi siihen, että IL-4 ja IL-13 voivat esittää sekä osittain samanaikaisia että itsenäisiä rooleja hengitysteiden allergisissa vasteissa ja että hyökkäämisellä molempien sytokiinien kimppuun voisi olla merkittävää lisähyötyä verrattuna siihen, että hyökätään yksinään jompaakumpaa sytokiiniä kohtaan.

IL-4:n antagonisteja on raportoitu kirjallisuudessa. Antagonisteina toimiviin IL-4:n mutantteihin sisältyy IL-4-antagonistimuteiini IL-4/Y124D (Kruse, N., Tony, H. P., Sebald, W., Conversion of human interleukin-4 into high affinity antagonist by a single amino acid replacement, *Embo J.* 11:3237–3244, 1992) sekä kaksinkertainen muteiini IL-4[R121D/Y124D] (Tony, H., et al., Design of Human Interleukin-4 Antagonists in Inhibiting Interleukin-4-dependent and Interleukin-13-dependent responses in T-cells and B-cells with high efficiency, *Eur. J. Biochem.* 225:659–664 (1994)). Yksinkertainen muteiini on tyrosiinin substituutio asparagiinihapolla D-kierteen asemassa 124. Kaksinkertainen muteiini on arginiinin substituutio asparagiinihapolla D-kierteen asemassa 121 ja tyrosiinin asparagiinihapolla D-kierteen asemassa 124. Variaatiot D-kierteen tässä osassa korreloivat positiivisesti toisessa sitoutumisalueessa tapahtuvien vuorovaikutusten muutosten kanssa.

Villin tyyppin IL-4:n agonismia tai antagonismia osoittavat IL-4:n mutanttivarientit voivat olla käyttökelpoisia hoidettaessa tiloja, joihin liittyy jokin IL-4:n pleiotrooppisista vaikutuksista. IL-4:n antagonistit esimerkiksi olisivat käyttökelpoisia hoidettaessa tiloja, joita IL-4:n tuotto on pahentanut, kuten esimerkiksi astmaa, allergiaa tai muita tulehdusvasteeseen liittyviä tiloja. IL-4:n agonistit voivat olla käyttökelpoisia sellaisten tilojen hoidossa, joissa IL-4:n

lääsnäolo on liittynyt sairauden parantumiseen tai vaimentumiseen, esimerkiksi autoimmuunisairauteen, kuten esimerkiksi nivelreumaan, pesäkekovettumatautiin, insuliiniriippuvaiseen sokeritautiin jne. Näitä autoimmuunisairauksia luonnehtii T-
 5 auttajasolupopulaatioiden tyyppien 1 ja 2 (Th1, Th2) tuotannossa tapahtuva polarisaatio. Luonnolliset CD4+ T-solut erilaistuvat Th1- ja Th2-alarajoiksi, stimulaation aikana läsnäolevan sytokiinin mukaan. IL-4-agonisti siirtäisi ideaalisesti tuotantoa halutuille T-auttajasoluille, esimerkiksi Th2:ta kohti, millä on siten terapeuttinen vaikutus.

10 PCT/US93/03 613 esittää IL-4-variantin, jossa on Phe-Leu- tai Tyr-Leu-sekvenssi alfakierteisessä domeenissa ja negatiivisesti varattu aminohappo kahden aminohapon sisäpuolella, välittömästi ylävirtaan tai alavirtaan Phe-Leu- tai Tyr-Leu-sekvenssistä, jolla variantilla on lisääntynyttä aktiivisuutta IL-4-reseptorin
 15 suhteen sen vuoksi, että neutraali aminohappo on korvattu negatiivisesti varatulla aminohapolla. Julkaisu esittää, myös, että Trp-Leu:n tai Phe-Leu:n spesifinen substituointi IL-4:n alfakierteen sisällä, negatiivisesti varatun tähteen kahden tähteen piirissä, johtaa parantuneeseen affiniteettiin. Variantti on IL-4-fuusioproteiini (differiatoksiinin kanssa).

20 Aiemmin US-patenteissa 6 028 176 ja 6 313 272 raportoitiin yhdistelmämuteliini-proteiinista (IL-4RA), joka oli peräisin humaani IL-4:stä, joka oli mutatoitu aminohapposekvenssinsä kahdessa asemassa. IL-4RA sitoutuu suurella affiniteetilla humaani IL-4-reseptorin alfa- ja IL-13-reseptorikompleksien tärkeä toiminnallinen signaalikomponentti. Tällä muteliinilla ei
 25 ole mitään agonistiaktiivisuutta, ja se toimii tehokkaana kompetitiivisenä IL-4- ja IL-13-reseptorin antagonistina *in vitro*. (katso US-patentteja 6 028 176 sekä 6 313 272). IL-4RA:n käytön merkittävä haitta on sen suhteellisen lyhyt puoliintumisaika *in vivo* (suunnilleen 3–6 tuntia). IL-4RA:n farmakokineettinen/farmakodynaaminen mallintaminen kädellisten astmamallissa
 30 ilmaisee, että tehokas, keskimääräinen steady state -pitoisuus terapeuttiselle optimatehokkuudelle on suunnilleen 60 ng/ml.

Eräs lähestymistapa lyhyen puoliintumisajan voittamiseen on antaa potilaalle IL-4RA-muteiiniproteiinia usein toistuvasti, tämä anto (tavallisesti injektiona tai hengityspotken avulla) luo kuitenkin hyvin huomattavia esteitä sille, että potilas hyväksyy hoidon tai hoitoannon sairaalassa.

5

Keksinnön yhteenveto

Keksintö saa aikaan IL-4RA-muteiineja, joiden puoliintumisaika on pitempi kuin raportoiduilla muteiineilla. Keksintö saa aikaan myös reagensseja ja menetelmiä
 10 IL-4- ja IL-13-välitteisten immuunivasteiden inhibointiin. Tämä ja muut keksinnön näkökohdat saadaan aikaan yhdellä tai useammalla, tuonnempana luetellulla sovellusmuodolla.

Eräässä sovellusmuodossa keksintö saa aikaan muunnetun IL-4-
 15 muteiinireseptoriantagonistin puhdistetun valmisteen, joka käsittää IL-4-muteiinireseptorin antagonistin kytkettynä polymeeriin, joka ei ole proteiini ja joka on valittu ryhmästä, joka koostuu polyetyleeniglykolista, polypropyleeniglykolista ja polyalkyleeneista. Tämän sovellusmuodon eräässä näkökohdassa puhdistettu valmiste käsittää muunnetun IL-4-muteiinireseptorin antagonistipolypeptidin, jota
 20 koodaa nukleiinihapposekvenssi, jollainen esitetään SEQ ID NO:2:na, SEQ ID NO:3:na, SEQ ID NO:4:nä, SEQ ID NO:5:nä, SEQ ID NO:6:na, SEQ ID NO:7:nä tai SEQ ID NO:8:na. toisessa näkökohdassa polypeptidi käsittää aminohapposekvenssin, jollainen esitetään SEQ ID NO:10:nä, SEQ ID NO:11:nä, SEQ ID NO:12:na, SEQ ID NO:13:na, SEQ ID NO:14:nä, SEQ ID NO:15:nä tai
 25 SEQ ID NO:16:na.

Muunnettu IL-4-muteiinireseptorin antagonisti-polypeptidi voi olla eräässä sovellusmuodossa kytketty polymeeriin, joka ei ole proteiini, IL-4:n aminohappotähteessä, asemassa 28, 36, 37, 38, 104, 105 tai 106. Tällaiset
 30 asemat on numeroitu villin tyyppin IL-4:n (se on humaanin interleukiini-4:n) aminohapposekvenssin mukaan. Tämän sovellusmuodon eräässä näkökohdassa aminohappotähte asemassa 28, 36, 37, 38, 104, 105 tai 106 on kysteiini.

Eräässä näkökohdassa keksinnön muunnettu muteiinireseptorin antagonisti sitoutuu IL-4-reseptorin alfaketjuun K_d :llä, joka on noin 0,1 nM:sta noin 10 μ M:iin, noin 0,5 nM:sta noin 1 μ M:iin tai noin 1,0–100 nM.

- 5 Toisessa sovellusmuodossa inhiboi muunnettu IL-4-muteiinireseptorin antagonisti TF-1-solujen proliferatiivisen vasteen IL-4:lle, siten että IC_{50} on noin 0,1 nM:sta noin 10 μ M:iin, noin 0,5 nM – noin 1 μ M tai noin 1,0–100 nM.

- 10 Vielä eräässä sovellusmuodossa inhiboi muunnettu IL-4-muteiinireseptorin antagonisti TF-1-solujen vasteen IL-13:lle, siten että IC_{50} on valittu alueelta, joka on noin 0,1 nM:sta noin 10 μ M:iin, noin 0,5 nM:sta noin 1 μ M:iin tai noin 1,0 nM:sta noin 100 nM:iin.

- 15 Lisäsovellusmuodossa inhiboi muunnettu IL-4-muteiinireseptorin antagonisti humaanin B-solujen proliferatiivisen vasteen IL-4:lle, siten että IC_{50} on valittu alueelta, joka on noin 0,1 nM:sta noin 10 μ M:iin, noin 0,5 nM:sta noin 1 μ M:iin tai noin 1,0 nM:sta noin 100 nM:iin.

- 20 Toisessa sovellusmuodossa inhiboi IL-4-muteiinireseptorin antagonisti humaanin T-solujen proliferatiivisen vasteen IL-4:lle, siten että IC_{50} on valittu ryhmästä, joka koostuu noin 0,1 nM:sta noin 10 μ M:iin, noin 0,5 nM:sta noin 1 μ M:iin, noin 1,0 –100 nM:sta.

- 25 Vielä eräässä sovellusmuodossa keksinnön muunnetulla IL-4-muteiinireseptorin antagonistilla puoliintumisaika plasmassa on ainakin noin 2–10 kertaa pitempi kuin muuntamattomalla IL-4-reseptorin antagonistilla.

- 30 Keksintö saa aikaan myös farmaseuttisia koostumuksia, jotka käsittävät (a) muunnettua IL-4-muteiinireseptorin antagonistia, joka sitoutuu humaanin IL-4-reseptoriin sekä (b) farmaseuttisesti hyväksyttävää kantaja-ainetta.

Keksintö saa aikaan myös puhdistetun polynukleotidin, joka käsittää (a) nukleotidisekvenssin, joka esitetään SEQ ID NO:2:na, SEQ ID NO:3:na, SEQ ID

NO:4:nä, SEQ ID NO:5:nä, SEQ ID NO:6:na, SEQ ID NO:7:nä tai SEQ ID NO:8:na; tai (b) nukleotidisekvenssin, joka koodittaa polypeptidiä, jolla on aminohapposekvenssi, jollainen esitetään SEQ ID NO:10:nä, SEQ ID NO:11:nä, SEQ ID NO:12:na, SEQ ID NO:13:na, SEQ ID NO:14:nä, SEQ ID NO:15:nä tai
 5 SEQ ID NO:16:na.

Keksintö saa aikaan ekspressio- eli ilmentymisvektoreita, jotka käsittävät keksinnön polynukleotidiä, sekä isäntäsoluja, jotka käsittävät keksinnön ekspressiovektorin.

10

Keksintö saa aikaan lisäksi modifioidun IL-4-muteiinireseptorin antagonistin valmistukseen menetelmiä, jotka käsittävät vaiheita, joissa (a) edellä kuvattua isäntäsolua viljellään olosuhteissa, joissa antagonistista ilmentyy ja (b) antagonistista puhdistetaan isäntäsoluviljelmästä. Erityisessä näkökohdassa keksinnön mukaisella menetelmällä tuotettu antagonistista voi inhiboida IL-4- ja IL-13-välitteisen
 15 aktiivisuuden, ja se on kytketty polymeeriin, joka ei ole proteiini ja joka on valittu ryhmästä, joka käsittää polyetyleeniglykolia, polypropyleeniglykolia ja polyoksaalkyleenejä.

20 Keksintö saa menetelmiä humaani sairauden hoitoon, johon sairauteen liittyy IL-4:n ja IL-13:n lisääntynyttä aktiivisuutta, myös menetelmiä, jotka käsittävät vaiheita, joissa (a) ihmisellä saadaan aikaan tila, jossa IL-4:n ja IL-13:n aktiivisuus on lisääntynyt, ja (b) mainitulle henkilölle annetaan tehokas määrä keksinnön muunnettua IL-4-muteiinireseptorin antagonistia tai keksinnön farmaseuttista koostumusta. Eräässä näkökohdassa sairaus on astma, krooninen ahtauttava
 25 keuhkosairaus (kuten esimerkiksi keuhkolaajentuma tai krooninen bronkiitti) tai läheisiä keuhkosairauksia.

Keksintö saa aikaan myös menetelmän IL-4-muteiinireseptorin antagonistin valmistukseen aktiivisessa muodossa, menetelmällä valmistettuja antagonisteja, tällaisia antagonisteja käsittäviä koostumuksia sekä humaani sairauksien hoitoon menetelmän, joka käsittää tällaisten antagonistien annon, ja tällaisia antagonisteja sisältäviä farmaseuttisia koostumuksia. Menetelmä käsittää vaiheet, joissa (a)
 30

edellä kuvattua isäntäsolua viljellään olosuhteissa, joissa antagonisti ilmentyy, (b) antagonistin annetaan laskostua uudelleen ditiotreitolin läsnäollessa ja (c) antagonisti puhdistetaan isäntäsoluviljelmästä. Eräässä sovellusmuodossa menetelmä käsittää lisäksi vaiheet, joissa (d) antagonisti kytketään ei-proteiinipolymeeriin ja (e) ei-proteiinipolymeeriin kytketty antagonisti puhdistetaan.

Esillä olevan keksinnön spesifisiä edullisia sovellusmuotoja käy selvästi ilmi tiettyjen edullisten sovellusmuotojen seuraavasta yksityiskohtaisemmasta selityksestä ja patenttivaatimuksista.

Kuvioiden lyhyt selitys

Kuvio 1 on PEGylaatioreaktion kemian kaaviomainen esitys.

Keksinnön yksityiskohtainen selitys

Tämä keksintö koskee muunnettuja IL-4-muteiinireseptorin antagonisteja, jotka käsittävät IL-4-muteiinireseptorin, joka on kytketty ei-proteiinipolymeeriin, edullisesti polyetyleeniglykolimolekyyliin.

Jollei lauseyhteys toisin edellytä, yksikkötermien tulee sisältää monikot ja monikkotermien tulee sisältää yksikkö.

Tässä käytetyt kappaleotsikot ovat vain organisatorisia tarkoituksia varten, eikä niitä ole laadittu rajoittamaan kuvattua asia-aineistoa. Kaikki siteeratut viitteet tässä hakemuksessa on sisällytetty tähän nimenomaan viitteinä.

Määritelmiä

Termi "polynukleotidi" tai "nukleiinihapposekvenssi" tai "nukleiinihappomolekyyli" viittaa DNA- tai RNA-sekvenssiin. Termi sisältää molekyyliä, jotka on muodostettu mistä tahansa tunnetuista DNA- tai RNA-sekvenssin emäsanalogeista, kuten esimerkiksi, näihin rajoittumatta, 4-asetyyliytosiinin, 8-

hydroksi-N6-metyyliadenosidin, atsiridinyylisytosiinin, pseudoisosytosiinin, 5-
 (karboksihydroksyyli-metyyli)urasiilin, 5-fluoriurasiilin, 5-bromiurasiilin, 5-
 karboksimeetyliaminometyyli-2-tiourasiilin, 5-karboksimeetyliaminometyyliurasiilin,
 dihydrourasiilin, inosiinin, N6-isopentyyliadeniinin, 1-metyyliadeniinin, 1-
 5 metyyli-pseudourasiilin, 1-metyyliguaaniinin, 1-metyyli-inosiinin, 2,2-
 dimetyyliguaaniinin, 2-metyyliadeniinin, 2-metyyliguaaniinin, 3-metyylisytosiinin, 5-
 metyyliisytosiinin, N6-metyyliadeniinin, 7-metyyliguaaniinin, 5-
 metyyliaminometyyliurasiilin, 5-metoksiaminometyyli-2-tiourasiilin, beeta-D-
 mannosyyliquanosiinin, 5'-metoksikarbonyylimetyyliurasiilin, 5-metoksiurasiilin, 2-
 10 metyyli-tio-N6-isopentenyliadeniinin, urasiili-5-oksetikkahapon metyyliesterin,
 urasiili-5-oksetikkahapon, oksibutoksiinin, pseudourasiilin, quanosiinin, 2-
 tiosytosiinin, 5-metyyli-2-tiourasiilin, 2-tiourasiilin, 4-tiourasiilin, N-urasiili-5-
 oksetikkahapon metyyliesterin, urasiili-5-oksetikkahapon, pseudourasiilin,
 quanosiinin, 2-tiosytosiinin ja 2,6-diaminopuriinin.

15

Termi "puhdistettu" tai "eristetty" tarkoittaa keksinnön nukleiinihappomolekyyliä,
 joka (1) on erotettu ainakin 50 prosentista proteiineja, lipidejä, hiilihydraatteja tai
 muita materiaaleja, joiden kanssa se esiintyy luonnostaan, kun
 kokonaisnukleiinihappo eristetään lähdesoluista, joka nukleiinihappomolekyyli (2)
 20 ei ole kytketty koko polynukleotidiin tai osaan polynukleotidiä, johon "eristetty
 nukleiinihappomolekyyli" on luonnossa kytketty, joka nukleiinihappomolekyyli (3)
 on toiminnallisesti yhdistetty polynukleotidiin, johon se ei ole kytketty luonnossa,
 tai (4) joka nukleiinihappomolekyyli ei esiinny luonnossa suuremman
 polynukleotidisekvenssin osana. Edullisesti esillä olevan keksinnön eristettyä
 25 nukleiinihappomolekyyliä eivät kontaminoi luonnonmukaisessa ympäristössä
 esiintyvät nukleiinihappomolekyyli tai muut kontaminantit (ei kontaminoi
 luonnonmukaisessa ympäristössä esiintyvä nukleiinihappomolekyyli), jotka
 häiritsisivät (joka häiritsisi) sen käyttöä polypeptidin tuotannossa tai sen
 terapeuttisessa, diagnoosi-, profylaktisessa tai tutkimuskäytössä.

30

"Numeroinnilla villin tyypin IL-4:n mukaan" tarkoitetaan valitun aminohapon
 identifiointia viittaamalla asemaan, jossa aminohappo esiintyy normaalisti villin
 tyypin IL-4:ssä.

Termiä "vektori" käytetään tarkoittamaan mitä tahansa molekyyliä (esimerkiksi nukleiinihappoa, plasmidia tai virusta), jota käytetään siirrettäessä koodaavaa informaatiota isäntäsoluun.

5

Termi "ekspressiovektori" tarkoittaa vektoria, joka soveltuu isäntäsolun transformaatioon ja joka sisältää nukleiinihapposekvenssejä, jotka ohjaavat ja/tai säätelevät insertoitujen heterologisten nukleiinihapposekvenssien ilmentymistä. Ilmentymiseen sisältyy, näihin rajoittumatta, tapahtumia, kuten esimerkiksi transkriptio, translaatio ja RNA:n pujonta, jos introneita on läsnä.

10

Termi "isäntäsolu" tässä yhteydessä käytettynä tarkoittaa solua, joka on transformoitu tai joka voidaan transformoida nukleiinihapposekvenssillä ja joka sitten voi ilmentää valittua, kiinnostavaa geeniä. Sikäli kuin valittu geeni on läsnä, termi sisältää kantasolun jälkeläiset, on jälkeläinen sitten alkuperäisen kantasolun kanssa morfologialtaan tai geenikokoonpanoltaan identtinen tai ei

15

Termiä "transduktio" käytetään tarkoittamaan geenien siirtoa yhdestä bakteerista toiseen, tavallisesti faagilla. "Transduktio" tarkoittaa myös eukaryoottisolun sekvenssien hankintaa tai siirtoa retroviruksilla.

20

Termiä "transfektio" käytetään tarkoittamaan vieraan tai eksogeenisen DNA:n ottoa soluun, ja solu on "transfektoitu", kun eksogeeninen DNA on viety solumembraanin sisäpuolelle. Tekniikan tason mukaan tunnetaan ennestään joukko transfektio tekniikoita ja niitä esitetään tässä. Katso esimerkiksi julkaisuja Graham et al., 1973, Virology 52:456; Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratories, 1989); Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology (Elsevier, 1986) sekä julkaisua Chu et al., 1981, Gene 13:197. Tällaisia tekniikoita voidaan käyttää viettäessä yksi eksogeeninen DNA-osa tai useampia DNA-osia sopivaan isäntäsoluun.

25

30

Termi "transformaatio" tässä yhteydessä käytettynä tarkoittaa solun geneettisten ominaisuuksien muutosta, ja solu on transformoitu, kun se on muunnettu

sisältämään uutta DNA:ta. Solu on transformoitu esimerkiksi, kun se on muunnettu geneettisesti luonnollisesta tilastaan. Transfektion tai transduktion jälkeen transformoiva DNA voi yhdistyä solun DNA:han fysikaalisesti integroitumalla soluun, se voi säilyä tilapäisesti episomielementtinä replikoitumatta tai se voi replikoitua itsenäisesti plasmidina. Solun katsotaan olevan stabiilisti transformoitu, kun DNA replikoituu solunjakaantumisessa.

Termi "identtisyys tarkoittaa " tekniikan tason mukaan kahden tai useamman polypeptidimolekyylin tai kahden tai useamman nukleiinihappomolekyylin välistä suhdetta, joka on määritetty sekvenssejä vertaamalla. Tekniikan tason mukaan "identtisyys" tarkoittaa myös sekvenssisukulaisuuden astetta nukleiinihappomolekyylien tai polypeptidien välillä, asianhaarojen mukaan, kahden tai useamman nukleotidi- tai kahden tai useamman aminohapposekvenssin juosteen yhteensopivuudella määritettynä. "Identtisyys" mittaa identtisten yhteensopivuuksien prosenttia suoraan linjaan asetettuja aukkoja (jos mitään) käsittävistä kahdesta tai useammasta sekvenssistä pienempien välillä, mihin käytetään tiettyä matemaattista mallia tai tietokoneohjelmaa (toisin sanoen "algoritmeja").

Termi "samanlaisuus" on läheinen käsite, mutta se on vastakohta "identtisyydelle", "samanlaisuus" tarkoittaa sukulaisuuden mittaa, johon sisältyvät sekä identtiset yhteensopivuudet että konservatiivisen substituution yhteensopivuudet. Jos kahdella polypeptidisekvenssillä on esimerkiksi identtisiä aminohappoja 10/20 ja jäljelle jäävät ovat kaikki ei konservatiivisia substituutioita, silloin identtisyys- ja samanlaisuusprosentti olisivat molemmat 50 prosenttia. Jos samassa esimerkissä on viisi useampaa asemaa, joissa on konservatiivisia substituutioita, silloin identtisyysprosentti pysyy 50 prosenttina mutta samanlaisuusprosentti olisi 75 prosenttia (15/20). Sen tähden tapauksissa, joissa on konservatiivisia substituutioita, samanlaisuusprosentti kahden polypeptidin välillä on suurempi kuin identtisyysprosentti näiden kahden polypeptidin välillä.

Läheisten nukleiinihappojen ja polypeptidien identtisyys ja samanlaisuus voidaan laskea helposti tunnetuilla menetelmillä. Tällaisiin menetelmiin kuuluu, näihin

- rajoittumatta, menetelmiä, joita on kuvattu julkaisuissa COMPUTATIONAL MOLECULAR BIOLOGY (Lesk, A. M., julkaisija) 1988, Oxford University Press, New York; BIOCOMBUTING: INFORMATICS AND GENOME PROJECTS, (Smith, D. W., julkaisuja); 1993, Academic Press, New York; COMPUTER
- 5 ANALYSIS OF SEQUENCE DATA, osa 1 (Griffin, A. M. ja Griffin, H. G., julkaisijat), 1994, Humana Press, New Jersey; von Heinje, G. SEQUENCE ANALYSIS IN MOLECULAR BIOLOGY, 1987, Academic Press; SEQUENCE ANALYSIS PRIMER, (Gribskov, M. ja Devereux, J., julkaisijat), 1991, M. Stockton Press, New York; Carillo et al., 1988, SIAM J. Applied Math., 48:1073; sekä Durbin
- 10 et al., 1998, BIOLOGICAL SEQUENCE ANALYSIS, Cambridge University Press.

- On suunniteltu edullisia menetelmiä antamaan testattujen sekvenssien välinen suurin yhteensopivuus. Identtisyyden määritysmenetelmiä kuvataan julkisesti saatavissa tietokoneohjelmissa. Edullisiin tietokoneohjelmiin kahden sekvenssin
- 15 välisen indentisyyden määrittämistä varten sisältyy, näihin rajoittumatta, GCG-ohjelmapakkaus, joka sisältää GAP:n (Devereux et al., 1984, Nucl. Acid. Res., 12:387; Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI), BLASTP:n, BLASTN:n ja FASTA:n (Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol, 215:403–410). BLASTX-ohjelma on julkisesti saatavilla the National Center for
- 20 Biotechnology Informationilta (NCBI) sekä muista lähteistä (BLAST Manual, Altschul et al. NCB/NLM/NIH Bethesda, MD 20894; Altschul et al., 1990, supra). Indenttisyyden määrittämiseen voidaan käyttää myös ennestään tunnettua Smith Waterman -algoritmia.

- 25 Tietyt suoraan linjaan asettamiskaaviot kahden aminohapposekvenssin suoraan linjaan asettamista varten voivat johtaa vain kahden sekvenssin lyhyen alueen yhteensopivuuteen, ja tällä pienellä, suoraan linjaan asetetulla alueella voi olla hyvin suuri sekvenssi-identtisyyys siitä huolimatta, ettei kahden täysimittaisen sekvenssin välillä ole mitään merkittävää suhdetta. Niinpä tietyissä
- 30 sovellusmuodoissa valittu suoraan linjaan asettamismenetelmä (GAP-ohjelma) voi johtaa suoraan linjaan, joka ylittää kohdepolyptidin ainakin 50 peräkkäisen aminohapon yli.

Käyttämällä esimerkiksi tietokonealgoritmia GAP (Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI), kaksi polypeptidiä, joiden sekvenssi-identtisyysprosentti on määritettävä, asetetaan suoraan linjaan niiden vastaavien aminohappojen parasta mahdollista yhteensovittamista varten ("yhteensopiva alue" algoritmilla määritettynä). Tietyissä sovellusmuodoissa käytetään yhdessä algoritmin kanssa aukonmuodostussakkoa (joka lasketaan keskimääräisen diagonaalin kolmikertana; kun taas "keskimääräinen diagonaali" on käytettävän vertailumatriisin diagonaalin keskiarvo; "diagonaali" on kullekin täydelliselle aminohapon yhteensopivuudelle tietyn vertailumatriisin antama pistemäärä tai lukuarvo) ja aukon laajentamissakkoa (joka on tavallisesti yksi kymmenesosa aukonmuodotussakosta), ja vertailumatriisia, kuten esimerkiksi PAM250:aa tai BLOSUM 62:ta. Tietyissä sovellusmuodoissa algoritmi käyttää myös standardivertailumatriisia (katso julkaisua Dayhoff et al., 1978, Atlas of Protein Sequence and Structure, 5:345–352, PAM 250 -vertailumatriisin suhteen; katso julkaisua Henikoff et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:10915–10919 BLOSUM 62 -vertailumatriisin suhteen).

Tietyissä sovellusmuodoissa polypeptidisekvenssin vertailuparametreihin sisältyy seuraavaa:

- 20 Algoritmi: Needleman et al., 1970, J. Mol. Biol., 48:443–453;
- Vertailumatriisi: BLOSUM 62 julkaisusta Henikoff et al., 1992, edellä;
- Aukkosakko: 12
- Aukon pituussakko: 4
- Samanlaisuuden kynnyks: 0
- 25 GAP-ohjelma voi olla käyttökelpoinen edellä esitettyjen parametrien kanssa. Edellä mainitut parametrit ovat tietyissä sovellusmuodoissa GAP-algoritmiä käytettäessä polypeptidivertailulle puuteparametrejä (ilman pääteaukkojen sakkoa).
- 30 Tässä yhteydessä käytettyinä kaksikymmentä tavanomaista aminohappoa ja näiden lyhenteet noudattavat tavanomaista käytäntöä. Katso julkaisua IMMUNOLOGY – A SYNTHESIS, toinen laitos (E. S. Golub ja D. R. Gren, julkaisijat), Sinauer Associates: Sunderland, MA, 1991, sisällytetty tähän viitteenä

mihin tahansa tarkoitukseen. Keksinnön polypeptidien sopivia komponentteja voivat olla myös kahdenkymmenen tavanomaisen aminohapon stereoisomeerit (esimerkiksi D-aminohapot); ei luonnonmukaiset aminohapot, kuten esimerkiksi α - α -disubstituoidut aminohapot, N-alkyyliaminohapot, maitohappo ja muut tavanomaiset aminohapot. Epätavallisten aminohappojen esimerkkeihin sisältyvät 4-hydroksiprolini, γ -karboksylutamaatti, ϵ -N,N,N-trimetyyllilysiini, ϵ -N-asetyylilysiini, O-fosfoseriini, N-asettyliseriini, N-formyyliimetioniini, 3-metyyllihistidiini, 5-hydroksilysiini, σ -N-metyyliarginiini ja muita samantlaisia aminohappoja ja iminohappoja (esimerkiksi 4-hydroksiprolini). Tässä polypeptidissä käytetyssä merkintätavassa vasemmanpuoleinen suunta on aminopäänteen suunta ja oikeanpuoleinen suunta on karboksyyli-päänteen suunta, standardikäytännön ja yleisen tavan mukaan.

Luonnossa esiintyvät tähteet voidaan jakaa luokkiin tavallisten sivuketjuominaisuuksien perusteella:

- 1) hydrofobisia: norleusiini (Nor), Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- 2) neutraaleita hydrofiilisiä: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- 3) happamia: Asp, Glu;
- 4) emäksisiä: His, Lys, Arg;
- 5) ketjun suuntautumiseen vaikuttavat tähteet: Gly, Pro ja
- 6) aromaattiset tähteet: Trp, Tyr, Phe.

Tavanomaisiin aminohapposubstituutioihin voi sisältyä näiden luokkien yhden tai useamman jäsenen vaihtaminen saman luokan toiseen jäseneen. Tavanomaiset aminohapposubstituutiot voivat käsittää ei luonnonmukaisesti esiintyviä aminohappotähteitä, joita tyypillisesti liitetään pikemmin kemiallisella peptidisynteesillä kuin synteesillä biologisissa järjestelmissä. Näihin sisältyy peptidomimeettejä ja muita aminohappo-osien käänteisiä tai invertoituja muotoja.

Ei konservatiivisiin substituutioihin voi sisältyä näiden luokkien yhden tai useamman jäsenen vaihto toisen luokan jäseneen. Tällaisia substituutioita voidaan tuottaa humaani proteiinin alueisiin, jotka ovat homologisia ei humaani proteiinien kanssa tai molekyylin ei homologisiin alueisiin.

Tällaisia muutoksia tehtäessä voidaan tiettyjen sovellusmuotojen mukaan tarkastella aminohappojen hydropaattista indeksia. Kullekin aminohapolle on annettu hydropaattinen indeksi sen hydrofobisuuden ja varausominaisuuksien perusteella. Ne ovat: isoleusiini (+4,5); valiini (+4,2); leusiini (+3,8); fenyylialaniini (+2,8); kysteiini/kystiini (+2,5); metioniini (+1,9); alaniini (+1,8); glysiini (-0,4); treoniini (-0,7); seriini (-0,8); tryptofaani (-0,9); tyrosiini (-1,3); proliini (-1,6); histidiini (-3,2); glutamaatti (-3,5); glutamiini (-3,5); aspartaatti (-3,5); asparagiini (-3,5); lysini (-3,9) ja arginiini (-4,5).

Hydropaattisen aminohappoindeksin tärkeys annettaessa proteiinille keskinäisesti vaikuttava biologinen toiminta on ennestään selvää (katso esimerkiksi julkaisua Kyte et al., 1982, J. Mol. Biol. 157:105–131). On tunnettua, että tietyt aminohapot voivat korvata muita aminohappoja, joilla on samanlainen hydropaattinen indeksi tai pistemäärä, ja vielä säilyttää samanlaisen biologisen aktiivisuuden.

Hydropaattiseen indeksiin perustuvia muutoksia tehtäessä tietyissä sovellusmuodoissa on sisällytetty sellaisten aminohappojen substituuutioita, joiden hydropaattiset indeksit ovat ± 2 :n sisällä. Joissakin sovellusmuodoissa otetaan mukaan sellaisten aminohappojen substituuotit, joiden hydropaattiset indeksit ovat ± 1 :n sisällä ja tietyissä sovellusmuodoissa sellaiset, joissa mainitut indeksit ovat $\pm 0,5$:n sisällä.

On ennestään selvää myös, että samankaltaisten aminohappojen substituuutio voi olla tehokkaampaa hydrofiilisyyden perusteella, erityisesti kun tällöin luotu biologisesti toiminnallinen proteiini tai peptidi on tarkoitettu käytettäväksi immunologisissa sovellusmuodoissa, kuten tässä esitetään. Tietyissä sovellusmuodoissa proteiinin suurin paikallinen keskimääräinen hydrofiilisyyden sen viereisten aminohappojen hydrofiilisyyden säätämänä korreloi sen immunogeenisyyden ja antigeenisyyden kanssa, toisin sanoen proteiinin biologisen ominaisuuden kanssa.

Näille aminohappotähteille on annettu seuraavat hydrofiilisyydsarvot: arginiini (+3,0); lysini (+3,0); aspartaatti ($+3,0 \pm 1$); glutamaatti ($+3,0 \pm 1$); seriini ($+0,3$); asparagiini ($+0,2$); glutamiini ($+0,2$); glysiini (0); treoniini ($-0,4$); proliini ($-0,5 \pm 1$);

- alaniini (-0,5); histidiini (-0,5); kysteiini -1,0); metioniini (-1,3); valiini (-1,5); leusiini (-1,8); isoleusiini (-1,8); tyrosiini (-2,3); fenyyialaniini (-2,5) ja tryptofaani (-3,4). Samanlaisiin hydrofiilisyyssarvoihin perustuvia muutoksia tehtäessä on tietyissä sovellusmuodoissa otettu mukaan sellaisten aminohappojen substituuotit, joiden hydrofiilisyyssarvot ovat ± 2 :n sisällä, tietyissä sovellusmuodoissa sellaisten aminohappojen substituuotit, joiden hydrofiilisyyss on ± 1 :n sisällä ja tietyissä sovellusmuodoissa sellaisten aminohappojen substituuotit, joiden hydrofiilisyyss on $\pm 0,5$:n sisällä. Primaarisista aminohapposekvensseistä peräisin olevia epitooppeja voidaan identifioida myös hydrofiilisyyden perusteella. Näitä alueita pidetään myös "epitooppisina ydinalueina".

Aminohapposubstituutioiden esimerkkejä esitetään taulukossa 1

Taulukko 1

15 Aminohapposubstituutioita

Alkuperäiset tähteet	Esimerkkisubstituutiot	Edullisia substituutioita
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleusiini	Leu
Leu	Norleusiini, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, 1,4-diaminovoihappo, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, Norleusiini	Leu

Taitava ammattimies pystyy määrittämään tässä esitettyjen polypeptidien sopivia variantteja ennestään tunnettuja tekniikoita käyttämällä. Tietyissä sovellusmuodoissa taitava ammattimies voi tunnistaa molekyylin sopivia alueita, joita voidaan muuttaa tuhoamatta aktiivisuutta, kohdistumalla alueisiin, joiden ei
 5 uskota olevan tärkeitä aktiivisuudelle. Muissa sovellusmuodoissa taitava ammattimies voi identifioida molekyylien tähteitä ja osia, jotka ovat säilyneet samanlaisten polypeptidien piirissä. Lisäsovellusmuodoissa jopa alueet, jotka voivat olla tärkeitä biologiselle aktiivisuudelle tai rakenteelle voivat olla konservatiivisten aminohapposubstituutioiden kohteena biologisen aktiivisuuden
 10 tuhoutumatta tai substituutioiden vaikuttamatta haitallisesti polypeptidirakenteeseen.

Ammattimies voi tarkastella lisäksi rakenne-toimintatutkimuksia, joilla identifioidaan samanlaisten polypeptidien tähteitä, jotka ovat aktiivisuudelle tai
 15 rakenteelle tärkeitä. Tällaisen vertailun avulla taitava ammattimies voi ennustaa proteiinin sellaisten aminohappotähteiden tärkeyden, jotka vastaavat samanlaisten proteiinien aktiivisuudelle tai rakenteelle tärkeitä aminohappotähteitä. Taitava ammattimies voi valita tällaisten ennustettujen, tärkeiden aminohappotähteiden kemiallisesti samanlaiset aminohapposubstituutiot.

20 Ammattimies voi analysoida myös kolmiulotteista rakennetta ja aminohapposekvenssiä suhteessa samanlaisten polypeptidien tähän rakenteeseen. Ottamalla huomioon tällaisen informaation ammattimies voi ennustaa polypeptidin aminohappotähteiden suoraan linjaan asettumisen sen kolmiulotteisen rakenteen suhteen. Tietyissä sovellusmuodoissa ammattimies voi
 25 valita sen, ettei tee radikaaleja muutoksia aminohappotähteisiin, joiden on ennustettu sijaitsevan proteiinin pinnalla, koska tällaiset tähteet kytkeytyvät tärkeisiin vuorovaikutuksiin muiden molekyylien kanssa. Ammattimies voi luoda ennen kaikkea koevariantteja, jotka sisältävät kussakin halutussa
 30 aminohappotähteessä yhden ainoan aminohapposubstituution. Variantit voidaan seuloa sitten ammattimiehen tuntemia aktiivisuusmäärittämiä käyttämällä. Tällaisia variantteja voitaisiin käyttää kerätessä informaatiota sopivista varianteista. Jos esimerkiksi havaitaan, että muutos tietyksi aminohappotähteeksi tuottaa tuhotun,

ei toivotusti vähentyneen tai epäsooivan aktiivisuuden, voidaan välttää variantteja, joissa on tällainen muutos. Toisin sanoen tällaisista rutiinikokeista kerätyn informaation perusteella ammattimies voi helposti määrittää aminohapot, joissa lisäsubstituutioita tulisi välttää joko yksinään tai muihin mutaatioihin yhdistettyinä.

5

Joukko tieteellisiä julkaisuja on omistautunut sekundaarisen rakenteen ennustamiselle. Katso julkaisuja Moulton, 1996, *Curr. Opin. Biotech.* 7:422–427; Chou et al., 1974, *Biochemistry* 13:222–245; Chou et al., 1974, *Biochemistry* 113:211–222, Chou et al., 1978, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 47:45–148; 10 Chou et al., 1979, *Ann. Rev. Biochem.* 47:251–276, sekä Chou et al., 1979, *Biophys. J.* 26:367–384. Ennen kaikkea tällä hetkellä on saatavissa tietokoneohjelmia auttamaan sekundaarisen rakenteen ennustamisessa. Eräs sekundaarisen rakenteen ennustusmenetelmä perustuu homologiamallitukseen. Esimerkiksi kahdella polypeptidillä tai proteiinillä, joilla sekvenssin identtisyys on 15 suurempi kuin 30 prosenttia tai samanlaisuus on suurempi kuin 40 prosenttia, rakennetopologiat ovat usein samanlaiset. Proteiinirakenteen tietokannan (PDB) viimeaikainen kasvu on saanut aikaan sekundaarisen rakenteen, mukaan luettuna poimutusten lukumäärä polypeptidin tai proteiinin rakenteessa, lisääntyneen ennustettavuuden. Katso julkaisua Holm et al., 1999, *Nucl. Acid. Res.* 27:244–247. 20 On esitetty (Brenner et al., 1997, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7:369–376), että tietyssä polypeptidissä tai proteiinissa on rajoitettu lukumäärä poimutuksia ja että kun rakenteiden kriittinen lukumäärä on ratkaistu, rakenteen ennustaminen tulee dramaattisesti tarkemmaksi.

25 Sekundaarisen rakenteen ennustamisen lisämenetelmiin kuuluu "polveilu" (Jones, 1997, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7:377–387; Sippl et al., 1996, *Structure* 4:15–19), "profiilin analyysi" (Bowie et al., 1991, *Science* 253:164–170; Gribskov et al., 1990, *Meth. Enzym.* 183:146–159; Gribskov et al., 1987, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 84:4355–4358) sekä "evolutiivinen kytkentä" (katso julkaisuja Holm, 1999, edellä, ja Brenner, 30 1997, edellä).

Tietyissä sovellusmuodoissa proteiinivariantteihin sisältyy glykosylaatiovariantteja, joissa glykosylaatiokohdan lukumäärä ja/tai tyyppi on muuttunut kantapolypeptidin

aminohapposekvensseihin verrattuna. Proteiinivariantit käsittävät tietyissä sovellusmuodoissa N-kytkettyjä glykosylaatiokohtia suuremman tai pienemmän lukumäärän kuin luonnonmukaisessa proteiinissa. N-kytketylle glykosylaatiokohdalle on luonteenomaista sekvenssi Asn-X-Ser tai Asn-X-Thr, jolloin X:llä merkitty aminohappotähte voi olla mikä tahansa aminohappotähte paitsi proliini. Aminohappotähteiden substituutio tämän sekvenssin luomista varten voi saada aikaan mahdollisen uuden paikan N-kytketyn hiilihydraattiketjun lisäämiselle. Tämän sekvenssin eliminoivat substituutiot vaihtoehtoisesti poistavat olemassa olevan N-kytketyn hiilihydraattiketjun. Saadaan aikaan myös N-kytkettyjen hiilihydraattiketjujen uudelleenjärjestyminen, jolloin eliminoidaan yksi tai useampia N-kytkettyjä glykosylaatiokohtia (tyypillisesti niitä, jotka esiintyvät luonnonmukaisesti) ja luodaan yksi tai useampia uusia N-kytkettyjä kohtia. Edullisiin variantteihin sisältyy lisäksi kysteiinivariantteja, joista kanta-aminohapposekvenssiin verrattuna on deletoitu yksi tai useampia kysteiinitähteitä tai toinen aminohappo (esimerkiksi seriini) on substituoitu. Kysteiinivariantit voivat olla käyttökelpoisia, kun proteiinien täytyy laskostua uudelleen biologisesti aktiiviseen konformaatioon, kuten esimerkiksi inkluusiokappaleiden eristämisen jälkeen. Kysteiinivarianteilla on vähemmän kysteiinitähteitä kuin luonnonmukaisella proteiinilla, ja tyypillisesti niillä on tasaluku vähentämään vuorovaikutuksia, jotka johtuvat parittomista kysteiineistä.

Lisäsovellusmuodoissa proteiinivariantit voivat sisältää mutaatioita, kuten esimerkiksi substituutioita, additioita, deletioita tai minkä tahansa näiden yhdistelmän, ja tyypillisesti niitä tuotetaan kohdennetulla mutageneesillä käyttämällä mutageenioligonukleotidiä (mutageenioligonukleotidejä) tässä kuvattujen menetelmien sekä ennestään tunnettujen menetelmien mukaan (katso esimerkiksi julkaisua Sambrook et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 3. painos, 2001, Cold Spring Harbor, N. Y. , sekä Berger ja Kimmel, METHODS IN ENZYMOLOGY, osa 152, Guide to Molecular Cloning Techniques, 1987, Academic Press, Inc., San Diego, CA, jotka on sisällytetty tähän viitteinä).

Tiettyjen sovellusmuotojen mukaan aminohapposubstituutiot ovat sellaisia, jotka (1) vähentävät proteolyysiherkkyyttä, (2) vähentävät hapettumisherkkyyttä, (3) muuttavat sitoutumisaffiniteettia muodostuvien proteiinikompleksien suhteen, (4) muuttavat sitoutumisaffiniteetteja ja/tai (5) antavat tällaisille polypeptideille muita

5 fysikokemiallisia tai toiminnallisia ominaisuuksia tai muuntavat näitä. Tiettyjen sovellusmuotojen mukaan voidaan tehdä luonnonmukaisesti esiintyvään sekvenssiin (tietyissä sovellusmuodoissa polypeptidin osaan, ulkopuolelle domeenia (domeeneja), joka muodostaa (jotka muodostavat) molekyyllisiä yhteyksiä) yksinkertaisia tai monia aminohapposubstituutioita (tietyissä

10 sovelluksissa konservatiivisia aminohapposubstituutioita). Edullisissa sovellusmuodoissa konservatiivinen aminohapposubstituutio tyypillisesti ei muuta olennaisesti kantasekvenssin rakenneominaisuuksia (esimerkiksi aminohapon korvaamisella ei tulisi olla taipumus rikkoa kierrettä, joka esiintyy kantasekvenssissä, tai hajottaa kantasekvenssille tyypillisiä sekundaarisen

15 rakenteen muita tyyppejä). Esimerkkejä tekniikan tason yleisesti hyväksytyistä polypeptidin sekundaarisista ja tertiaarisista rakenteista kuvataan julkaisuissa PROTEINS, STRUCTURES AND MOLECULAR PRINCIPLES, (Creighton, julkaisija), 1984, W. H. Freeman and Company, New York; INTRODUCTION TO PROTEIN STRUCTURE (C. Branden ja J. Tooze, julkaisijat), 1991, Garland

20 Publishing, New York, N.Y.; sekä Thornton et al., 1991, Nature 354:105, joista kukin on sisällytetty tähän viiteen.

Peptidianalogeja käytetään yleisesti farmaseuttisessa teollisuudessa ei peptidilääkkeinä, joilla on templaattipeptidille analogisia ominaisuuksia. Näitä ei

25 peptidiyhdisteitä nimitetään "peptidimimeeteiksi" tai peptidomimeeteiksi". Katso julkaisua Fauchere, 1986, Adv. Drug Res. 15:29; Veber & Freidinger, 1985, TINS, sivu 392, sekä Evans et al., 1987, J. Med. Chem., 30:1229, jotka on sisällytetty tähän viiteinä kaikkiin tarkoituksiin. Tällaisia yhdisteitä kehitetään usein molekyylin tietokonemallituksen avulla. Terapeuttisesti käyttökelpoisten peptidien

30 kanssa rakenteellisesti samankaltaisia peptidimimeettejä käytetään tuottamaan samanlainen terapeuttinen tai profylaktinen vaikutus. Peptidomimeetit ovat yleensä rakenteellisesti samanlaisia kuin paradigmapolypeptidi (se on polypeptidi, jolla on biokemiallinen ominaisuus tai farmakologista aktiivisuutta), kuten

esimerkiksi humaani vasta-aine, mutta yksi tai useampia peptidisidoksia korvataan ennestään tunnetuilla menetelmillä valinnaisesti sidoksella, joka valitaan sidoksista, jotka ovat seuraavat: $-\text{CH}_2\text{-NH-}$, $-\text{CH}_2\text{-S-}$, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$, $-\text{CH=CH-}$ (*cis* ja *trans*), $-\text{COCH}_2\text{-}$, $-\text{CH(OH)CH}_2\text{-}$ sekä $-\text{CH}_2\text{SO-}$. Konsensussekvenssin yhden tai useamman aminohapon systemaattista substituutiota saman tyyppin D-aminohapolla (esimerkiksi D-lysiinillä L-lysiinin sijaan) voidaan käyttää tietyissä sovellusmuodoissa stabiilimpien peptidien luomiseen. Konsensussekvenssin käsittäviä tai oleellisesti identtisen konsensussekvenssivariaation käsittäviä pakotettuja peptidejä voidaan lisäksi tuottaa ennestään tunnetuin menetelmin (Rizo & Gierasch, 1992, Ann. Rev. Biochem. 61:387, joka on sisällytetty tähän viitteenä mihin tahansa tarkoitukseen), lisäämällä sisäisiä kysteiniitähteitä, jotka pystyvät muodostamaan molekyyllisiä disulfidiltoja, jotka syklistöivät peptidin.

(a) Muunnettujen IL-4-muteiinireseptoriantagonistien ominaisuuksia

Tässä yhteydessä käytettyihin "muunnettuihin IL-4-muteiinireseptorin antagonisteihin" sisältyy IL-4RA-muteiini, jota kuvataan US-patenteissa 6 028 176 ja 6 313 272 (kokonaisuudessaan sisällytetty tähän viitteenä), lisäksi tulevin aminohapposubstituutioin, jolloin mainitut substituutiot pystyvät ainakin yhden polymeerin, joka ei ole proteiini, kuten esimerkiksi polypropyleeniglykolin, polyoksaalkyleenin tai polyetyleeniglykolimolekyylin (PEG), kohdennettuun kytkemiseen muteiiniin. PEG:n kohdennettu kytkentä mahdollistaa esimerkiksi luoda muunnetun muteiinin, jolla on polyetyleenillä glykosyloidun (PEGyloidun) hyödyt, nimittäin kasvanut puoliintumisaika plasmassa ja vähentynyt immunogeenisuus, samalla kun se säilyttää suuremman voimakkuuden epäspesifisten PEGylaatiostrategioiden, kuten esimerkiksi N-terminaalisen ja lyysiinivuketjun PEGylaation, suhteen. Tässä keksinnössä on luontaista myös valita aminohapposubstituution spesifinen kohta, joka mahdollistaa molekyylin sopivan laskostumisen, jota ilmentyminen seuraa. Muunnetut IL-4-muteiinireseptoriantagonistit sitoutuvat IL-4:ään ja IL-13:een affiniteetilla, jonka häviö ei ole suurempi kuin 10-kertainen suhteessa IL-4RA:n affiniteettiin. Muunnetut IL-4-muteiinireseptorin antagonistit inhiboivat IL-4:n ja IL-13:n välittämän aktiivisuuden, siten että voimakkuuden häviö ei ole suurempi kuin 10-

kertainen suhteessa IL-4RA:n aktiivisuuteen. Muunnetuilla IL-4-muteiinireseptorin antagonisteilla on plasmassa puoliintumisaika, joka on ainakin 1–10 kertaa suurempi kuin muuntamattomalla IL-4RA:lla.

- 5 Tämän keksinnön IL-4-muteiineja voivat luonnehtia myös aminohappoinseriot, -deleetiot, -substituutiot ja -modifikaatiot luonnonmukaisen IL-4-polypeptidiketjun muiden tähteiden yhdessä tai useammassa kohdassa tai luonnonmukaisen IL-4-polypeptidiketjun muissa tähteissä. Tämän keksinnön mukaan minkä tahansa tällaisten insertioiden, deleetioiden, substituutioiden ja muunnosten tulisi päätyä
- 10 IL-4-muteiiniin, joka säilyttää IL-4:ään liittyvän aktiivisuutensa.

Tämän keksinnön lisänäkökohta saadaan aikaan menetelmässä, jolla proteiini ilmentyy ja laskostuu uudelleen, kuten kuvataan esimerkissä 2. IL-4-muteiini täytyy puhdistaa sopivasti, jotta saadaan tehokas PEGylaatio. Puhdistamista kuvataan

15 esimerkiksi esimerkissä 2 tuonnempana. Kun muteiini on laskostunut uudelleen sulfhydryyliä suojaavan agenssin, kuten esimerkiksi beetamerkaptoetanolin, glutationin tai kysteiinin, ollessa läsnä, puhdistettua muteiinia ei voida PEGyloida, koska hapettunut suoja-agenssi inaktivoi aktiivisen sulfhydryylin IL-4:ään viedyssä kysteiinissä. Kovalenttinen disulfidisidos muodostuu IL-4-muteiinin vapaan

20 kysteiinin ja suojaavan agenssin välille. Sitä vastoin sulfhydryyliä suojaavan agenssin ditiotreitolin (DTT), joka hapettuu, jotta muodostuu stabiili disulfidisidos, käyttö ei muodosta kovalenttista sidosta IL-4-muteiinin vapaan kysteiinin kanssa jättäen täten tämän sulfhydryyliryhmän vapaaksi reagoimaan PEG-maleimidireagenssin kanssa. Beetamerkaptoetanolin, glutationin tai kysteiinin

25 läsnäollessa tapahtuneen laskostumisen jälkeen puhdistetut IL-4-muteiinit voivat reagoida PEG-reagenssin kanssa, jos ne on käsitelty DTT:llä, mutta myös mono-PEGyloitujen ja moni-PEGyloitujen tuotteiden seos muodostuu, mikä viittaa siihen, että olemassa olevat IL-4-kysteiinit ovat myös PEGyloituneet. Olemassa olevien kysteiinien PEGylaatio johtaisi väärin laskostuneisiin tuotteisiin, jotka ovat

30 inaktiivisia.

Muunnetun IL-4-muteiinireseptorin antagonistin K_d IL-4-reseptorille voidaan määrittää käyttämällä mitä tahansa ennestään tunnettua menetelmää, kuten

esimerkiksi reaaliaikaista bimolekulaarista vuorovaikutteista analyysiä (Bimolecular Interaction Analysis, BIA), joka on esitetty pääpiirteittäin esimerkissä 4. BIA on tekniikka biospesifisten vuorovaikutusten tutkimiseen reaaliajassa ilman minkään vuorovaikutukseen osallistuvien merkintää (esimerkiksi BIAcore™).

5 Muutoksia pintaplasmaresonanssin optisessa ilmiössä (SPR) voidaan käyttää biologisten molekyylien välisten reaaliaikaisten reaktioiden ilmaisuna.

Muunnettujen IL-4-muteiinireseptoriantagonistien kyky inhiboida immuunisolujen proliferatiivinen vaste voidaan määrittää proliferatiivisia määityksiä käyttämällä, kuten esitetään pääpiirteittäin esimerkissä 5, ja tämä kyky ilmaistaan pitoisuutena, jossa inhibitiopitoisuus on 50-prosenttinen (IC_{50}).

10

BIAcore™-määityksessä esillä olevan keksinnön muunnetut IL-4-muteiinin reseptorin antagonistit sitoutuvat spesifisesti humaani IL-4-reseptoriin, siten että edullinen K_d on noin 1,0–100 nM:n alueella. Esillä olevan keksinnön edullisemmissa sovellusmuodoissa humaani IL-4-reseptoriin sitoutumisen K_d on noin 0,5 nM – 1,0 μ M. Esillä olevan keksinnön vielä edullisemmissa sovellusmuodoissa humaani IL-4-reseptoriin sitoutumisen K_d on noin 0,1 nM – 10 μ M. Esillä oleva keksinnön muunnetut IL-4-muteiinireseptorin antagonistit, kuten

15

20 kuvitellaan, lisäksi sitoutuvat humaani IL-4-reseptoriin ja neutraloivat sen kyvyn edistää immuunisolun proliferaatiota, siten että edullinen IC_{50} on 1,0–100 nM:n alueella. Edullisemmat humaani antagonistit sitovat IL-4-reseptorin ja neutraloivat sen kyvyn immuunisolun proliferaation, siten että IC_{50} on alueella, joka on noin 0,5 nM:sta 1 μ M:iin, siten että tämän keksinnön edullisimmat antagonistit sitoutuvat IL-4-reseptoriin ja inhiboivat tämän, jolloin IC_{50} on noin 0,1 nM:sta noin 10 μ M:iin.

25

Esillä oleva keksinnön muunnettujen IL-4-muteiinireseptoriantagonistien nykyisillä sovellusmuodoilla on myös plasmassa puoliintumisaika, joka on edullisesti ainakin 2–10 kertaa pitempi kuin muuntamattoman IL4RA:n puoliintumisaika, siten että esillä olevan keksinnön edullisimmilla sovellusmuodoilla puoliintumisaika plasmassa on 10–100 kertaa suurempi kuin muuntamattoman IL-4RA:n puoliintumisaika (katso esimerkkiä 7).

30

Edellä esitetyillä määrittämenetelmillä on identifioitu joukko muunnettuja IL-4-muteiinireseptorin antagonisteja, joilla on edellä kuvatut ominaisuudet. Esillä olevan keksinnön sovellusmuodoilla on polypeptidisekvenssit, jotka esitetään taulukossa 2 (SEQ ID -numerot 10–16).

Taulukko 2

Polypeptidisekvenssejä

SEQ ID No.	Nimi	Sekvenssi
9	IL4RA	MHKCDITLQEIHKTLNSLTEQKTLCTELTVTDIFAA SKNTTEKETFCRAATVLRQFYSHHEKDTRCLGAT AQQFHRHKQLIRFLKRLDRNLWGLAGLNSCPVKE ANQSTLENFLERLKTIMDEKDSKCSS
10	IL4-RE-T28C	MHKCDITLQEIHKTLNSLTEQKTLCTELCVTDIFA ASKNTTEKETFCRAATVLRQFYSHHEKDTRCLG ATAQQFHRHKQLIRFLKRLDRNLWGLAGLNSCP VKEANQSTLENFLERLKTIMDEKDSKCSS
11	IL4-RE-S36C	MHKCDITLQEIHKTLNSLTEQKTLCTELTVTDIFA ACKNTTEKETFCRAATVLRQFYSHHEKDTRCLG ATAQQFHRHKQLIRFLKRLDRNLWGLAGLNSCP VKEANQSTLENFLERLKTIMDEKDSKCSS
12	IL4-RE-K37C	MHKCDITLQEIHKTLNSLTEQKTLCTELTVTDIFA ASCNTTEKETFCRAATVLRQFYSHHEKDTRCLG ATAQQFHRHKQLIRFLKRLDRNLWGLAGLNSCP VKEANQSTLENFLERLKTIMDEKDSKCSS
13	IL4-RE-N38C	MHKCDITLQEIHKTLNSLTEQKTLCTELTVTDIFA ASKCTTEKETFCRAATVLRQFYSHHEKDTRCLG ATAQQFHRHKQLIRFLKRLDRNLWGLAGLNSCP VKEANQSTLENFLERLKTIMDEKDSKCSS
14	IL4-RE-A104C	MHKCDITLQEIHKTLNSLTEQKTLCTELTVTDIFA ASKNTTEKETFCRAATVLRQFYSHHEKDTRCLG ATAQQFHRHKQLIRFLKRLDRNLWGLAGLNSCP VKECNQSTLENFLERLKTIMDEKDSKCSS
15	IL4-RE-N105C	MHKCDITLQEIHKTLNSLTEQKTLCTELTVTDIFA ASKNTTEKETFCRAATVLRQFYSHHEKDTRCLG ATAQQFHRHKQLIRFLKRLDRNLWGLAGLNSCP VKEACQSTLENFLERLKTIMDEKDSKCSS
16	IL4-RE-Q106C	MHKCDITLQEIHKTLNSLTEQKTLCTELTVTDIFA ASKNTTEKETFCRAATVLRQFYSHHEKDTRCLG ATAQQFHRHKQLIRFLKRLDRNLWGLAGLNSCP VKEANCSTLENFLERLKTIMDEKDSKCSS

(b) Polynukleotidejä koodaavat, muunnetut IL-4-muteiinireseptorin antagonistit

Keksintö saa aikaan myös polynukleotidejä, jotka koodaavat muunnettuja IL-4-muteiinireseptorin antagonisteja. Näitä polynukleotidejä voidaan käyttää esimerkiksi tuottamaan suuria määriä antagonisteja terapeuttiseen käyttöön.

Keksinnön polynukleotidi voidaan saada helposti erilaisilla tavoilla mukaan luettuina, näihin rajoittumatta, kemiallinen synteesi, cDNA- tai genomikirjaston seulonta, ekpressiokirjaston seulonta ja/tai cDNA:n PCR-amplifikaatio.

Tässä kuvatut yhdistelmä-DNA-menetelmät ovat yleensä menetelmiä, joita esitetään julkaisuissa Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) ja/tai *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et al., julkaisijat, Green Publishers Inc. Sekä Wiley and Sons 1994). Keksintö saa aikaan tässä kuvattuja nukleiinihappomolekyylejä sekä menetelmiä tällaisten molekyylien saantia varten.

Eräs menetelmä sopivan nukleiinihapposekvenssin saantiin on polymeerasiketjureaktio (PCR). Tässä menetelmässä cDNA valmistetaan poly(A)+RNA:sta tai kokonais-RNA:sta käänteistranskriptaasientsyymiä käyttämällä. cDNA:han lisätään yhdessä polymeeraasin, kuten esimerkiksi Taq-polymeeraasin, kanssa kaksi aluketta, jotka ovat tyypillisesti komplementaarisia muunnetun IL-4-muteiinireseptoriantagonistin cDNA:n kahdelle erilliselle alueelle, ja polymeeraasi monistaa cDNA-alueen kahden alukkeen välillä.

Keksinnön nukleiinihappomolekyylin muita valmistuskeinoja on kemiallinen synteesi käyttämällä ammattimiehen ennestään tuntemia menetelmiä, jollaisia kuvataan julkaisussa Engels et al., 1989, *Angew. Chem. Intl. Ed.* 28:716–734. Näihin menetelmiin sisältyy muun muassa fosfotriesteri-, fosforiamidiitti- ja H-fosfonaattimenetelmiä nukleiinihapon synteesiä varten. Tällaisen kemiallisen synteesin edullinen menetelmä on polymeerin tukema synteesi normaalia fosforiamidiittikemiaa käyttämällä. DNA on tyypillisesti useiden satojen

nukleotidien mittainen. Näitä menetelmiä käyttämällä voidaan syntetisoida pitempiä kuin noin 100 nukleotidin mittaisia nukleiinihappoja useina fragmentteina. Fragmentit voidaan sitoa sitten yhteen. Yhtä hyvin voidaan käyttää muita ammattimiehen tuntemia menetelmiä.

5

Muunnetun IL-4-muteiinireseptorin antagonistien koodaamiseen käytettäviä keksinnön polynukleotidejä esitetään taulukossa 3 (SEQ ID numerot 2–8).

Taulukko 3

10

Polynukleotidisekvenssejä

SEQ ID No.	Nimi	Sekvenssi
1	IL4RA	ATGCACAAGTGCGATATCACCTTACAGGAGATC ATCAAACTTTGAACAGCCTCACAGAGCAGAA GACTCTGTGCACCGAGTTGACCGTAACAGACAT CTTTGCTGCCTCCAAGAACACAACCTGAGAAGGA AACCTTCTGCAGGGCTGCGACTGTGCTCCGGCA GTTCTACAGCCACCATGAGAAGGACACTCGCTG CCTGGGTGCGACTGCACAGCAGTTCCACAGGCA CAAGCAGCTGATCCGATTCTGAAACGGCTCGA CAGGAACCTCTGGGGCCTGGCGGGCTTGAATTC CTGTCCTGTGAAGGAAGCCAACCAGAGTACGTT GGAAACTTCTTGAAAGGCTAAAGACGATCAT GGACGAGAAAGACTCAAAGTGTTTCGAGCTAAT AA
2	IL4-RE-T28C	ATGCACAAGTGCGATATCACCTTACAGGAGAT CATCAAACTTTGAACAGCCTCACAGAGCAGA AGACTCTGTGCACCGAGTTGTGCGTAACAGAC ATCTTTGCTGCCTCCAAGAACACAACCTGAGAA GGAAACCTTCTGCAGGGCTGCGACTGTGCTCC GGCAGTTCTACAGCCACCATGAGAAGGACACT CGCTGCCTGGGTGCGACTGCACAGCAGTTCCA CAGGCACAAGCAGCTGATCCGATTCTGAAAC GGCTCGACAGGAACCTCTGGGGCCTGGCGGGC TTGAATTCCTGTCCTGTGAAGGAAGCCAACCA GAGTACGTTGGAAAACCTTCTTGAAAGGCTAA AGACGATCATGGACGAGAAAGACTCAAAGTGT TCGAGCTAATAA

15

20

25

30

5	3	IL4-RE-S36C	ATGCACAAGTGCGATATCACCTTACAGGAGAT CATCAAACTTTGAACAGCCTCACAGAGCAGA AGACTCTGTGCACCGAGTTGACCGTAACAGAC ATCTTTGCTGCCTGCAAGAACAACACTGAGAA GGAAACCTTCTGCAGGGCTGCGACTGTGCTCC GGCAGTTCTACAGCCACCATGAGAAGGACACT CGCTGCCTGGGTGCGACTGCACAGCAGTTCCA CAGGCACAAGCAGCTGATCCGATTCTTGA AAC GGCTCGACAGGAACCTCTGGGGCCTGGCGGGC TTGAATTCCTGTCCTGTGAAGGAAGCCAACCA GAGTACGTTGGAAAACCTTCTTGGAAAGGCTAA AGACGATCATGGACGAGAAAGACTCAAAGTGT TCGAGCTAATAA
10	4	IL4-RE-K37C	ATGCACAAGTGCGATATCACCTTACAGGAGAT CATCAAACTTTGAACAGCCTCACAGAGCAGA AGACTCTGTGCACCGAGTTGACCGTAACAGAC ATCTTTGCTGCCTCCTGCAACAACAACACTGAGAA GGAAACCTTCTGCAGGGCTGCGACTGTGCTCC GGCAGTTCTACAGCCACCATGAGAAGGACACT CGCTGCCTGGGTGCGACTGCACAGCAGTTCCA CAGGCACAAGCAGCTGATCCGATTCTTGA AAC GGCTCGACAGGAACCTCTGGGGCCTGGCGGGC TTGAATTCCTGTCCTGTGAAGGAAGCCAACCA GAGTACGTTGGAAAACCTTCTTGGAAAGGCTAA AGACGATCATGGACGAGAAAGACTCAAAGTGT TCGAGCTAATAA
15	5	IL4-RE-N38C	ATGCACAAGTGCGATATCACCTTACAGGAGAT CATCAAACTTTGAACAGCCTCACAGAGCAGA AGACTCTGTGCACCGAGTTGACCGTAACAGAC ATCTTTGCTGCCTCCAAGTGCACAACACTGAGAA GGAAACCTTCTGCAGGGCTGCGACTGTGCTCC GGCAGTTCTACAGCCACCATGAGAAGGACACT CGCTGCCTGGGTGCGACTGCACAGCAGTTCCA CAGGCACAAGCAGCTGATCCGATTCTTGA AAC GGCTCGACAGGAACCTCTGGGGCCTGGCGGGC TTGAATTCCTGTCCTGTGAAGGAAGCCAACCA GAGTACGTTGGAAAACCTTCTTGGAAAGGCTAA
20			
25			
30			

		AGACGATCATGGACGAGAAAGACTCAAAGTGT TCGAGCTAATAA
6	IL4-RE- A104C	ATGCACAAGTGCGATATCACCTTACAGGAGAT CATCAAACTTTGAACAGCCTCACAGAGCAGA AGACTCTGTGCACCGAGTTGACCGTAACAGAC ATCTTTGCTGCCTCCAAGAACAACACTGAGAA GGAAACCTTCTGCAGGGCTGCGACTGTGCTCC GGCAGTTCTACAGCCACCATGAGAAGGACACT CGCTGCCTGGGTGCGACTGCACAGCAGTTCCA CAGGCACAAGCAGCTGATCCGATTCTTGAAAC GGCTCGACAGGAACCTCTGGGGCCTGGCGGGC TTGAATTCCTGTCCTGTGAAGGAATGCAACCA GAGTACGTTGGAAAACCTTCTTGGAAGGCTAA AGACGATCATGGACGAGAAAGACTCAAAGTGT TCGAGCTAATAA
7	IL4-RE- N105C	ATGCACAAGTGCGATATCACCTTACAGGAGAT CATCAAACTTTGAACAGCCTCACAGAGCAGA AGACTCTGTGCACCGAGTTGACCGTAACAGAC ATCTTTGCTGCCTCCAAGAACAACACTGAGAA GGAAACCTTCTGCAGGGCTGCGACTGTGCTCC GGCAGTTCTACAGCCACCATGAGAAGGACACT CGCTGCCTGGGTGCGACTGCACAGCAGTTCCA CAGGCACAAGCAGCTGATCCGATTCTTGAAAC GGCTCGACAGGAACCTCTGGGGCCTGGCGGGC TTGAATTCCTGTCCTGTGAAGGAAGCCTGCCA GAGTACGTTGGAAAACCTTCTTGGAAGGCTAA AGACGATCATGGACGAGAAAGACTCAAAGTGT TCGAGCTAATAA
8	IL4-RE- Q106C	ATGCACAAGTGCGATATCACCTTACAGGAGAT CATCAAACTTTGAACAGCCTCACAGAGCAGA AGACTCTGTGCACCGAGTTGACCGTAACAGAC ATCTTTGCTGCCTCCAAGAACAACACTGAGAA GGAAACCTTCTGCAGGGCTGCGACTGTGCTCC GGCAGTTCTACAGCCACCATGAGAAGGACACT CGCTGCCTGGGTGCGACTGCACAGCAGTTCCA CAGGCACAAGCAGCTGATCCGATTCTTGAAAC GGCTCGACAGGAACCTCTGGGGCCTGGCGGGC TTGAATTCCTGTCCTGTGAAGGAAGCCAAGTG CAGTACGTTGGAAAACCTTCTTGGAAGGCTAA AGACGATCATGGACGAGAAAGACTCAAAGTGT TCGAGCTAATAA

Keksintö saa aikaan myös ilmentymisvektoreita, jotka käsittävät keksinnön polynukleotidiä, ja isäntäsoluja, jotka käsittävät keksinnön ilmentymisvektorin.

Keksinnön polynukleotidi voidaan insertoida sopivaan ilmentymisvektoriin standardisotomistekniikoita käyttämällä. Vektori valitaan tyypillisesti, siten että se toimii tietyssä käytetyssä isännässä (toisin sanoen vektori sopii yhteen isäntäsolun koneiston kanssa, siten että geenin amplifikaatio ja/tai geenin ilmentyminen voi tapahtua). Keksinnön polynukleotidi voi ilmentyä prokaryootti- hiiva-, hyönteis- (bakulovirusjärjestelmät) ja/tai eukaryootti-isäntäsoluissa. Isäntäsolu valitaan erilaisten tekijöiden, kuten esimerkiksi haluttujen ilmentymistasojen mukaan. Katso ekspressiovektoreita koskevaa katsausta julkaisusta Meth. Enz., osa 185 (D.V. Goeddel, julkaisija Academic Press 1990).

Isäntäsolussa käytetyt ilmentymisvektorit sisältävät tyypillisesti sekvenssejä plasmidin ylläpitoa ja eksogeenisten nukleotidisekvenssien kloonauksia ja ilmentymistä varten. Tällaiset sekvenssit, tietyissä sovellusmuodoissa yhteisesti nimitetty kohdesekvenssin viereisiksi alueiksi, sisältävät tietyissä sovellusmuodoissa yhden tai useampia nukleotidisekvensseistä, jotka ovat seuraavat: promoottori, yksi tai useampia voimistajasekvenssejä, replikaation alku, transkription lopetussekvenssi, täydellinen intronisekvenssi, joka sisältää donorin ja akseptorin pujontakohdan, polypeptidin erittymistä varten johtosekvenssiä koodaava sekvenssi, ribosomin sitoutumispaikka, polyadenylaatiosekvenssi, polylinkkerialue ilmennettävää polypeptidiä koodaavan nukleinihapon insertointiin sekä valittava leimaelementti. Kutakin näistä sekvensseistä tarkastellaan tuonnempana.

Kohdesekvenssin viereiset alueet voivat olla homologisia (toisin sanoen peräisin samasta lajista ja/tai kannasta kuin isäntäsolu), heterologisia (toisin sanoen muusta lajista kuin isäntäsolulaji tai -kanta), hybridejä (toisin sanoen kohdesekvenssin viereisten alueiden yhdistelmä useammasta kuin yhdestä lähteestä) tai synteettisiä, tai kohdesekvenssin viereiset alueet voivat olla luonnonmukaisia sekvenssejä, jotka toimivat normaalisti, niin että ne säätelevät IL-4-muteiinireseptorin antagonistin ilmentymistä. Kohdesekvenssin viereinen alue

voi olla sellaisenaan mikä tahansa prokaryootti- tai eukaryoottiorganismi, mikä tahansa selkärangainen tai selkärangaton organismi tai mikä tahansa kasvi, edellyttäen että kohdesekvenssin viereinen alue toimii isäntäsolukoneistossa tai voi aktivoitua tällä.

5

Keksinnön vektoreissa käyttökelpoiset kohdesekvenssin viereiset alueet voidaan saada millä tahansa ennestään tunnetulla menetelmällä. Tässä käyttökelpoiset kohdesekvenssin viereiset alueet, muut kuin IL-4-muteiinireseptorin antagonistigeenin viereiset alueet, on identifioitu aiemmin kartoittamalla ja/tai
10 restriktioendonukleaasikäsittelyllä ja voivat olla täten eristetyt sopivasta kudoslähteestä sopivia restriktioendonukleaaseja käyttämällä. Joissakin tapauksissa kohdesekvenssin viereisen alueen täydellinen nukleotidisekvenssi voi olla tunnettu. Kohdesekvenssin viereinen alue voidaan syntetisoida tässä nukleiinihapon synteesille tai kloonaukselle kuvattuja menetelmiä käyttämällä.

15

Kun kohdesekvenssin koko viereinen alue tai vain tämän osa tunnetaan, se voidaan saada PCR:ää käyttämällä ja/tai seulomalla genomikirjastoa sopivan oligonukleotidin ja/tai kohdesekvenssin viereisen alueen fragmentilla, joka on
20 peräisin samasta lajista tai muusta lajista. Silloin kun kohdesekvenssin viereistä aluetta ei tunneta, DNA:n fragmentin sisältävä kohdealueen viereinen sekvenssi voidaan eristää DNA:n suuremmasta palasta, joka voi sisältää esimerkiksi koodaavan sekvenssin tai jopa muun geenin tai muita geenejä. Eristäminen voidaan toteuttaa restriktioendonukleaasikäsittelyllä, jotta tuotetaan sopiva DNA-fragmentti, mitä seuraa eristäminen agaroosigeelipuhdistusta, Qiagen-
25 pylväskromatografiaa (Chatsworth, CA) tai muita taitavan ammattimiehen tuntemia menetelmiä käyttämällä. Tähän tarkoitukseen sopivien entsyymien valinta selviää nopeasti ammattimiehelle.

30

Replikaation alku (ori-alue) on tyypillisesti kaupallisesti myytyjen prokaryoottiekspressiovektoreiden osa, ja alku auttaa vektorin amplifikaatiossa isäntäsolussa. Jos valittu vektori ei sisällä replikaatiokohdan alkua, se voidaan syntetisoida kemiallisesti tunnetun sekvenssin perusteella ja sitoa vektoriin. Esimerkiksi replikaation alku plasmidista pBR322 (New England Biolabs, Beverly,

MA) soveltuu useimmille gram-negatiivisille bakteereille ja erilaiset alut (esimerkiksi SV40, polyooma, adenovirus, vesikulaarinen stomatiittivirus (VSV) tai papillomavirukset, kuten esimerkiksi HPV tai BPV) ovat käyttökelpoisia nisäkässolujen kloonausvektoreita varten. Replikaatiokomponentin alkua ei yleensä tarvita nisäkäsekspressiovektoreita varten (käytetään usein esimerkiksi vain SV40-alkua, koska se sisältää aikaisen promoottorin).

Transkription lopetussekvenssi sijaitsee tyypillisesti polypeptidin koodausalueen 3'-päässä, ja se lopettaa transkription. Transkription lopetussekvenssi on prokaryoottisoluissa tavallisesti G-C:tä runsaasti sisältävä fragmentti, jota poly-T-sekvenssi seuraa. Vaikka sekvenssi kloonataan helposti kirjastosta tai sitä jopa myydään kaupallisesti vektorin osana, se voidaan syntetisoida helposti käyttämällä nukleiinihapposynteesimenetelmiä, jollaisia tässä kuvataan.

Valittava markkerigeenielementti koodaa proteiinia, joka on välttämätön selektiivisessä elatusalustassa kasvatetun isäntäsolun säilymiselle elossa ja kasvulle. Tyypilliset selektion markkerigeenit koodaavat proteiineja, jotka (a) antavat prokaryootti-isäntäsoluille resistenssiä antibiootteja tai muita toksineja, esimerkiksi ampisilliiniä, tetrasykliiniä tai kanamysiiniä, kohtaan, (b) täydentävät solun auktotrofisia puutteita tai (c) antavat kriittisiä ravinteita, jotka eivät ole saatavissa yhdistelmäalustasta. Edullisia valintamarkkereita ovat kanamysiiniresistenssigeeni, ampisilliiniresistenssigeeni sekä tetrasykliiniresistenssigeeni. Prokaryootti- ja eukaryootti-isäntäsoluissa voidaan käyttää valintaan myös neomysiiniresistenssigeeniä.

Ilmentyvän geenin amplifikaatioon voidaan käyttää muita selektiogeenejä. Amplifikaatio on tapahtuma, jossa yhdistelmäsolujen peräkkäisten sukupolvien kromosomeissa lisätään kasvulle kriittisen proteiinin valmistukseen suuremmassa määrin tarvittavia geenejä peräkkäin. Sopiviin valintamarkkereihin nisäkässoluja varten sisältyvät dihydrofolaattireduktaasi (DHFR) sekä tymidiinikinaasi. Nisäkässolutransformantit asetetaan valintapaineen alle, jolloin vektorissa läsnäolevan valintageenin läsnäolon vuoksi vain transformantit adaptoituvat ainoastaan henkiinjäämiselle. Valintapaine saadaan aikaan viljelemällä

transformoituja geenejä olosuhteissa, joissa muutetaan selektioagenssin pitoisuutta elatusaineessa peräkkäin, mikä johtaa täten sekä selektiogeenin että muunnettua IL-4-muteiiniresptorin antagonistia koodaavan DNA:n amplifikaatioon. Tämän seurauksena syntetisoidaan amplifikoidusta DNA:sta lisääntyneitä määriä
 5 muunnettua IL-4-muteiinireseptorin antagonistia.

Ribosomin sitoutumispaikka on tavallisesti välttämätön mRNA:n translaation alulle, ja sille on ominaista Shine-Dalgarno-sekvenssi (prokaryootit) tai Kozak-sekvenssi (eukaryootit). Elementti paikannetaan tyypillisesti muunnetun IL-4-
 10 muteiinireseptoriantagonistin promoottorin 3'-päähen ja koodaavan sekvenssin 5'-päähen. Shine-Dalgarno-sekvenssi on vaihteleva, mutta se on tyypillisesti polypuriini (tosin sanoen siinä on suuri A-G-pitoisuus). On identifioitu monia Shine-Dalgarno-sekvenssejä, joista kukin syntetisoidaan helposti käyttämällä tässä esitettyjä menetelmiä ja joista kutakin voidaan käyttää helposti
 15 prokaryoottivektorissa.

Signaalisekvenssiä tai RNA:n johtojaksoa voidaan käyttää ohjaamaan muunnettu IL-4-muteiinireseptorin antagonistin ulos isäntäsolusta. Signaalisekvenssiä koodaava nukleotidisekvenssi sijaitsee tyypillisesti muunnetun IL-4-
 20 muteiinireseptorin antagonistin koodaavassa alueessa. On identifioitu monia signaalisekvenssejä, ja näistä kutakin valitussa isännässä toiminnallista signaalisekvenssiä voidaan käyttää modifioidun IL-4-muteiinireseptoriantagonistin nukleinihappomolekyylin kanssa yhdessä. Signaalisekvenssi voi olla sen tähden homologinen (luonnossa esiintyvä) tai heterologinen muunnetulle IL-4-
 25 muteiinireseptorin antagonistinukleinihappo-molekyylille. Signaalisekvenssi voidaan lisäksi syntetisoida kemiallisesti tässä kuvattuja menetelmiä käyttämällä. Useimmissa tapauksissa muunnetun IL-4-muteiinireseptoriantagonistin erittymisestä isäntäsolusta seuraa signaaliptidin poisto eritetystä muunnetusta muteiinireseptorin antagonistista. Signaalisekvenssi voi olla vektorin komponentti,
 30 tai se voi olla muunnetun IL-4-muteiinireseptoriantagonistin nukleinihappomolekyylin osa, joka on lisätty vektoriin.

Yhden tai useamman intronin läsnäolo vektorissa lisää nukleiinihappomolekyylin transkriptiota monissa tapauksissa, tämä pätee erityisesti silloin, kun polypeptiä tuotetaan eukaryootti-isäntäsoluissa, erityisesti nisäkäisäntäsoluissa. Käytetyt intronit voivat esiintyä luonnollisesti muunnetun IL-4-

5 muteiinireseptoriantagonistigeenin sisäpuolella, erityisesti silloin kun käytetty geeni on sen täysimittainen genomisekvenssi tai tämän fragmentti. Jos introni ei esiinny luonnollisesti geenin sisäpuolella, introni voidaan saada muusta lähteestä. Intronin asema kohdesekvenssin viereisten alueiden ja muunnetun IL-4-

10 muteiinireseptoriantagonistin geenin suhteen on yleensä tärkeää, koska intronin transkription täytyy olla tehokas. Täten kun keksinnön nukleiinihappomolekyyli transkriboidaan, edullinen asema intronille on 3' transkription aloituskohta ja 5' poly-A-transkription lopetussekvenssi. Inroni tai intronit sijoitetaan cDNA:n yhdelle tai toiselle puolelle (toisin sanoen 5'- tai 3'-), siten että ei katkaista koodaavaa sekvenssiä. Tämän keksinnön toteuttamiseen voidaan käyttää mitä tahansa

15 intronia mistä tahansa lähteestä, mukaan luettuina virus-, prokaryootti- ja eukaryoottiorganismit (kasvi tai eläin), edellyttäen että se sopii yhteen isäntäsolun kanssa, johon se sisällytetään. Tähän sisältyvät myös synteettiset intronit. Vektorissa voidaan käyttää valinnaisesti useampia kuin yhtä intronia.

20 Esillä olevan keksinnön ekspressio- ja kloonausvektorit sisältävät tyypillisesti promoottorin, jonka isäntäorganismi tunnistaa ja joka on toiminnallisesti kytketty keksinnön nukleiinihappomolekyyliin. Promoottorit ovat sekvenssejä, joita ei transkriboida ja jotka sijoittuvat edeltävään sekvenssikohtaan eli geenin ylävirtaan (toisin sanoen 5'-suuntaan) rakennegeenin aloituskodonista (yleensä noin 100–

25 1 000 emäsparin sisällä), joka kontrolloi rakennegeenin transkriptiota. Promoottorit ryhmitellään sovitusti yhteen kahdesta luokasta: indusoituviin promoottoreihin ja konstitutiivisiin promoottoreihin. Indusoituvat promoottorit alkavat transkriboida DNA:sta lisääntynein tasoin kontrollinsa alla vasteena jollekin muutokselle viljelyolosuhteissa, kuten esimerkiksi ravinteen läsnäollessa tai puuttuessa tai

30 lämpötilan muutoksena. Konstitutiiviset promoottorit aloittavat toisaalta jatkuvan geenituotteen tuotannon, toisin sanoen geenin ilmentymistä säädellään vähän tai ei ollenkaan. Tunnetaan ennestään suuri joukko promoottoreita, jotka suuri määrä mahdollisia isäntäsoluja tunnistaa. Sopiva promoottori voidaan kytkeä

- toiminnallisesti keksinnön nukleiinihappomolekyyliin poistamalla promoottori lähde-DNA:sta restriktioentsyymien toiminnalla ja sijoittamalla haluttu promoottorisekvenssi vektoriin. Keksinnön nukleiinihappomolekyylin amplifikaation ja/tai ilmentymisen ohjaamiseen voidaan käyttää natiivin IL-4-muteiinireseptorin
- 5 antagonistin promoottorisekvenssiä. Edullinen on kuitenkin heterologinen promoottori, jos se sallii suuremman transkription sekä ilmentyneen proteiinin suurempia saantoja natiiviin promoottoriin verrattuna ja jos se sopii yhteen isäntäsolujärjestelmän kanssa, joka on valittu käyttöön.
- 10 Prokaryootti-isäntien kanssa käyttöön soveltuviin promoottoreihin sisältyy beetalaktamaasi- ja laktoosipromoottorijärjestelmiä, alkalinen fosfataasi, tryptofaanipromoottorijärjestelmä (trp-promoottorijärjestelmä) sekä hybridipromoottoreita, kuten esimerkiksi tac-promoottori. Muut tunnetut bakteeripromoottorit soveltuvat myös. Niiden sekvenssit on julkaistu, mikä auttaa
- 15 täten ammattimiestä kytkemään ne haluttuun DNA-sekvenssiin linkkkeitä eli kytkeyttäviä tai adaptoreita eli liittimiä käyttämällä, joita tarvitaan järjestämään mitä tahansa käyttökelpoisia restriktiokohtia.
- Ennestään tunnetaan myös sopivia promoottoreita käyttöön hiivasoluisäntien
- 20 kanssa. Hiivapromoottoreiden kanssa käytetään edullisesti hiivan voimistajia. Ennestään tunnetaan sopivia promoottoreita nisäkäsolujen kanssa toteutettavaan käyttöön, ja niihin sisältyvät promoottorit, jotka on saatu virusten, kuten esimerkiksi polyomaviruksen, fowlpox-viruksen, adenoviruksen, sytomegaloviruksen, retrovirusten, hepatiitti B -viruksen ja edullisimmin Simian virus40:n (SV40),
- 25 genomeista, mutta näihin rajoittumatta. Muihin sopiviin nisäkäspromoottoreihin sisältyy heterologisia nisäkäspromoottoreita, esimerkiksi lämpösokkipromoottoreita ja aktiinipromoottori.
- Geeniekspression säätelyssä mahdollisiin, kiinnostaviin lisäpromoottoreihin
- 30 sisältyy, näihin rajoittumatta, SV40:n varhainen promoottorialue (Bernoist ja Chambon, 1981, Nature 290:304–310), CMV-promoottori, Rousin sarkooma-viruksen 3'-päätteen pitkään toistoon sisältyvä promoottori (Yamamoto, et al., 1980, Cell 22:787–797), herpes tymidiinikinaasin promoottori (Wagner et al., 1981,

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:1444–1445) metallotioniinigeenin säätelyselänsit (Brinster et al., 1982, Nature 296:39–42) prokaryoottiperäisiä ekspressiovektoreita, kuten esimerkiksi beetalaktamaasipromoottori (Villa-Kamaroff et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 75:3727–3731), tai tac-promoottori (DeBoer et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80:21–25). Mielenkiintoa on myös eläinperäisillä transkription säätelyalueilla, joilla on kudosspesifisyyttä ja joita on käytetty transgeenisissä eläimissä ja jotka ovat seuraavat: elastaasi I: -geenin säätelyalue, joka on aktiivinen haiman rauhasrakkulasoluissa (Swift et al., 1984, Cell 38:639–646; Ornitz et al., 1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399–409 (1986); MacDonald, 1987, Hepatology 7:425–515); insuliinigeenin säätelyalue, joka on aktiivinen haiman beetasoluissa (Hanahan, 1985, Nature 315:115–122); immunoglobuliinigeenin säätelyalue, joka on aktiivinen lymfoidisoluiissa (Grosschedl et al., 1984, Cell 38:647–658; Adames et al., 1985, Nature 318:533–538; Alexander et al., 1987, Mol. Cell. Biol. 7:1436–1444); hiiren nännin tuumoriviruksen säätelyalue, joka on aktiivinen testikulaarisissa, rinta-, lymfoidi- ja syöttösoluissa (Leder et al., 1986, Cell 45:485–495); albumiinigeenin säätelyalue, joka on aktiivinen maksassa (Pinkert et al., 1987, Genes and Devel. 1:268–276); alfafetoproteiinigeenin säätelyalue, joka on aktiivinen maksassa (Krumlauf et al., 1985, Mol. Cell. Bio., 5:1639–1648; Hammer et al., 1987, Science 235:53–58); alfa₁-antitrypsiinigeenin säätelyalue, joka on aktiivinen maksassa (Kelsey et al., 1987, Genes and Devel. 1:161–171); beetaglobiinigeenin säätelyalue, joka on aktiivinen valkosoluissa (Mogram et al., 1985, Nature 315:338–340; Kollias et al., 1986, Cell 46:89–94), myeliinin emäksisen proteiinin geenin säätelyalue, joka on aktiivinen aivojen oligodendrosyyttisoluiissa (Readhead et al., 1987, Cell 48:703–712); myosiinin kevyen ketjun 2 geenin säätelyalue, joka on aktiivinen luurankoliuksessa (Sani, 1985, Nature 314:238–286), sekä gonadotropiineja vapauttavan hormonin geenin kontrollialue, joka on aktiivinen hypotalamuksessa (Mason et al., 1986, Science 234:1372–1278).

30

Voimistajasekvenssi voidaan insertoida korkeammilla eukaryooteilla vektoriin lisäämään keksinnön nukleiinihappomolekyylin transkriptiota. Voimistajat ovat *cis*-asemassa vaikuttavia, tavallisesti noin 10–300 emäsparin mittaisia DNA:n

elementtejä, jotka vaikuttavat promoottoriin, niin että transkriptio lisääntyy. Voimistajat ovat orientaatiosta ja asemasta suhteellisen riippumattomia. Niiden on havaittu olevan 5'- ja 3'-asemassa transkriptioyksikköön nähden. Tunnetaan useita voimistajasekvenssejä, jotka ovat saatavissa tunnetuista nisäkäsgeeneistä (esimerkiksi globiini-, elastaasi-, albumiini- alfafetoproteiini- ja insuliinigeeneistä). Tyypillisesti käytetään kuitenkin voimistajaa, joka on viruksesta peräisin. Eukaryoottipromoottoreiden aktivoitumista voimistavien elementtien esimerkkejä ovat SV40-voimistaja, sytomegaloviruksen varhaisen promoottorin voimistaja, polyoomavoimistaja sekä adenovirusvoimistajat. Vaikka voimistaja voi silmukoitua vektoriin keksinnön nukleinihappomolekyylin nähden 5'- tai 3'-asemassa, se sijaitsee tyypillisesti 5'-puolella promoottorista.

Keksinnön ekspressiovektorit voidaan konstruoida aloitusvektorista, kuten esimerkiksi kaupallisesti saatavasta vektorista. Tällaiset vektorit voivat sisältää tai voivat olla sisältämättä kaikki halutut kohdesekvenssin viereiset alueet. Silloin kun yhtä tai useampaa tässä kuvattua kohdesekvenssin viereistä aluetta ei ole jo vektorissa, ne voidaan saada yksitellen ja kytkeä vektoriin. Alan ammattimies tuntee ennestään menetelmiä, joita käytetään kohdesekvenssin viereisten sekvenssien saantiin.

Tämän keksinnön käytäntöön soveltamiseen edullisia vektoreita ovat vektorit, jotka sopivat yhteen bakteeri-, hyönteis- ja nisäkäsistä solujen kanssa. Tällaisiin vektoreihin kuuluu muun muassa pCRII, pCR3 ja pcDNA3.1 (Invitrogen, San Diego, CA), pBSII (Stratagene, La Jolla, CA), pET15 (Novagen, Madison, WI), pGEX (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ), pEGFPN2 (Clontech, Palo Alto, CA), pETL (BlueBacII, Invitrogen), pDSR-alfa (PCT-julkaisu nro WO 90/14 363) sekä pFastBacDual (Gibco-BRL, Grand Island, NY).

Lisäksi tuleviin, sopiviin vektoreihin sisältyy, näihin rajoittumatta, kosmideja, plasmideja tai muunnettuja viruksia, mutta ammattimies käsittää, että vektori järjestelmän täytyy sopia yhteen valitun isäntä järjestelmän kanssa. Tällaisiin vektoreihin sisältyy, näihin rajoittumatta, plasmideja, kuten esimerkiksi Bluescript®-plasmidijohdannaisia (ColE1-pohjainen fagemidi, jolla on suuri kopioluku,

Stratagene Cloning Systems, La Jolla CA), PCR-kloonausplasmidit, jotka on suunniteltu kloonaamaan Taq-amplifikoituja PCR-tuotteita (esimerkiksi TOPO™ TA Cloning® Kit, PCR2.1®-plasmidijohdannaisia, Invitrogen, Carlsbad, CA) sekä nisäkäs-, hiiva- ja virusvektoreita, kuten esimerkiksi
 5 bakulovirusilmentymisjärjestelmiä (pBacPAK-plasmidijohdannaisia, Clontech, Palo Alto, CA).

Sen jälkeen kun vektori on konstruoitu ja keksinnön nukleiinihappomolekyyli on sijoitettu vektorin sopivaan paikkaan, täydennetty vektori voidaan sijoittaa
 10 sopivaan isäntään amplifikaatiota ja/tai polypeptidin ekspressiota varten. Keksinnön ilmentymisvektori voidaan transformoida valittuun isäntään ennestään tunnetuin menetelmin, mukaan luettuina transfektio-, infektiio-, kalsiumkloridi-, elektroporaatio-, mikroinjektio-, lipofektio-, DEAE-dekstraanimenetelmä tai muut tunnetut tekniikat. Valittu menetelmä tulee osaksi käytettävän isäntäsolutyypin
 15 toimintaa. Ammattimies tuntee nämä menetelmät ja muita sopivia menetelmiä, ja ne esitetään esimerkiksi julkaisussa Sambrook et al. , edellä.

Isäntäsolut voivat olla prokaryootti-isäntäsoluja (kuten esimerkiksi *E. coli*) tai eukaryootti-isäntäsoluja (kuten esimerkiksi hiiva-, hyönteis- tai selkärankaissolu).
 20 Viljeltäessä isäntäsolua sopivissa olosuhteissa se syntetisoi muunnettua IL-4-muteiinireseptorin antagonistia, joka voidaan kerätä myöhemmin viljelyalustasta (jos isäntäsolu erittää sitä elatusaineeseen) tai suoraan sitä tuottavasta isäntäsolusta (jos se ei erity). Sopivan isäntäsolun valinta on erilaisten tekijöiden, kuten esimerkiksi halutun ilmentymistason, haluttujen tai aktiivisuudelle
 25 välttämättömien polypeptidimodifikaatioiden (kuten esimerkiksi glykosylaation tai fosforylaation) sekä biologisesti aktiiviseksi molekyyliseksi laskostumisen mukainen.

Tunnetaan ennestään joukko sopivia isäntäsoluja, ja monia on saatavissa the American Type Culture Collectionista (ATCC), Manassas, VA. Esimerkkeihin
 30 sisältyy, näihin rajoittumatta, nisäkässoluja, kuten esimerkiksi kiinalaisen hamsterin munasarjasolut (CHO), CHO DHFR(-) -solut (Urlaub et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97:4216–4220), humaani embryon munuaisen (HEK) 293 tai 293T -soluja tai 3T3 -solut. Tunnetaan ennestään sopivien

- nisäkäsisäntäsolujen valinta sekä transformaatio-, viljely-, amplifikaatio-, seulonta-, tuotteen valmistus- ja puhdistusmenetelmiä. Muita sopivia nisäkässolulinjoja ovat apinan COS-1- ja COS-7-solulinjat sekä solulinja CV-1. Nisäkäsisäntäsolujen lisäesimerkkiin sisältyy kädellisten solulinjoja sekä jyrsijöiden solulinjoja,
- 5 transformoidut solulinjat mukaan luettuina. Sopivia ovat myös normaalit diploidisolut, solukannat, jotka ovat peräisin primaarikudoksen *in vitro* -viljelmästä sekä primaarieksplantaateista. Ehdokassoluilta voi puuttua genotyybiltään puutteellinen valintageeni, tai ne voivat sisältää vallitsevasti vaikuttavan valintageenin. Muihin sopiviin nisäkässolulinjoihin sisältyy, näihin rajoittumatta,
- 10 hiiren neuroblastooma N2A soluja, HeLa, hiiren L-929 -soluja, 3T3-linjoja, jotka peräisin Swiss-, Balb-c- tai NIH-hiireltä, BHK- tai HaK-hamsterisolulinjoista. Proteiinin ilmentämistekniikan ammattimies tuntee kunkin näistä solulinjoista, ja ne ovat heidän saatavillaan.
- 15 Isäntäsoluina käyttökelpoisia, esillä olevaan keksintöön sopivia, ovat samoin bakteerisolut. Esimerkiksi *E. coli*n erilaiset kannat (esimerkiksi HB101, DH5 α , DH10 ja MC1061) ovat biotekniikan alalla isäntäsoluina ennestään tunnettuja. Tässä menetelmässä voidaan käyttää myös *B. subtiliksen*, *Pseudomonas*-lajien, muiden *Bacillus*-lajien, *Streptomyces*-lajien ynnä muiden tällaisten erilaisia kantoja
- 20 Monia ammattimiehen tuntemia hiivasolujen kantoja myös on saatavissa isäntäsoluiksi esillä olevan keksinnön polypeptidien ilmentymistä varten. Edullisiin hiivasoluihin kuuluvat esimerkiksi *Saccharomyces cerevisiae* ja *Pichia pastoris*.
- 25 Esillä olevan keksinnön menetelmissä voidaan käyttää haluttaessa lisäksi hyönteissolujärjestelmiä. Tällaisia järjestelmiä kuvataan esimerkiksi julkaisuissa Kitts et al., 1993, *Biotechniques*, 14:810–817; Lucklow, 1993, *Curr. Opin. Biotechnol.* 4:564–572, sekä Lucklow et al., 1993, *J. Virol.*, 67:4566–4579. Edullisia hyönteissoluja ovat Sf-9 ja Hi5 (Invitrogen).
- 30 Isäntäsolussa läsnäolevia keksinnön polynukleotideja voidaan eristää siten, ettei niissä ole muita solukomponentteja, kuten esimerkiksi membraanikomponentteja, proteiineja ja lipidejä. Polynukleotideja voidaan eristää soluista käyttämällä

nukleiinihappojen standarditekniikoita tai niitä voidaan syntetisoida käyttämällä monistamistekniikkaa, esimerkiksi polymeraasiketjureaktiota (PCR) tai automaattista syntetisaattoria. Polynukleotidien eristämismenetelmät ovat rutiinimaisia ja ennestään tunnettuja. Mitä tahansa tällaista polynukleotidin saantitekniikkaa voidaan käyttää eristettyjen, keksinnön antagonistien koodaavien polynukleotidien saantiin. Antagonistien koodaavien polynukleotidien eristämiseen voidaan käyttää esimerkiksi restriktioentsyymejä ja koettimia. Eristettyjä polynukleotideja on edullisesti valmisteissa, joista muut molekyylit puuttuvat ainakin 70-, 80- tai 90-prosenttisesti.

10

Ammattimiehet ymmärtävät täysin, että tässä kuvattuja nukleiinihappo- ja polypeptidimolekyylejä voidaan valmistaa yhdistelmä- ja muilla keinoilla. Keksinnön muunnetut IL-4-muteiinireseptoriantagonisti-cDNA-molekyylit voidaan valmistaa normaaleilla molekyylibiologian tekniikoilla käyttämällä templaattina mRNA:ta. Tämän jälkeen cDNA-molekyylit voidaan kopioida ennestään tunnetuin ja esimerkissä 1 kuvatuin molekyylibiologian tekniikoin. Esimerkki 2 kuvaa spesifisiä rekombinantin ilmentymis- ja puhdistustekniikoita, joita käytetään luotaessa keksinnön muunnettuja muteiiniantagonisteja.

20 (c) Humaani antagonistien terapeuttisen käyttökelpoisuuden arviointi

Tietyn antagonistin mahdollisen tehon määrittämistä varten allergisessa astmassa voidaan antagonistia tutkia *in vitro* solun proliferaatiomäärityksillä, kuten kuvataan yksityiskohtaisesti esimerkeissä 5 ja 6. Muunnetun IL-4-muteiinireseptorin antagonistin puoliintumisaika plasmassa voidaan mitata lisäksi *in vivo* rotalla farmakokineettisellä tutkimuksella esimerkin 6 mukaan.

25

(d) Farmaseuttisia koostumuksia

30 Mitä tahansa edellä kuvattuja muunnettuja IL-4-muteiinireseptorin antagonistien voidaan saada aikaan farmaseuttiseen koostumukseen, joka käsittää farmaseuttisesti hyväksyttävää kantaja-ainetta. Farmaseuttisesti hyväksyttävä kantaja-aine on edullisesti pyrogeeniton. Koostumuksia voidaan antaa yksinään tai

- yhdistettyinä ainakin yhteen muuhun agenssiin, kuten esimerkiksi stabiloivaan yhdisteeseen, jota voidaan antaa jossain steriilissä, biokompatiibelissä kantaja-aineessa, mukaan luettuina, näihin rajoittumatta, keittosuolaliuos, puskuroitu keittosuolaliuos, dekstroosi ja vesi. Voidaan käyttää suurta määrä vesipitoisia kantaja-aineita, esimerkiksi 0,4-prosenttista keittosuolaliuosta, 0,3-prosenttista glysiiniä ynnä muita sellaisia. Nämä liuokset ovat steriilejä ja yleensä ilman hiukkasia. Nämä liuokset voidaan steriloida tavanomaisesti, ennestään tunnetuin sterilointitekniikoin (esimerkiksi suodattamalla).
- 10 Koostumukset voivat sisältää tarvittaessa farmaseuttisesti hyväksyttäviä apuaineita. Hyväksyttävät apuaineet ovat käytettyinä annoksina edullisesti vastaanottajalle myrkyttömiä. Farmaseuttinen koostumus voi sisältää apuaineita muuntamaan, pitämään yllä tai säilyttämään esimerkiksi koostumuksen pH:n, osmolariteetin, viskositeetin, kirkkauden, värin, isotonisuuden, tuoksun, steriiliyden
- 15 stabiiliuden, liukenemisen tai vapautumisen nopeuden, adsorption tai läpäisyn. Sopiviin formulaatiomateriaaleihin sisältyy, näihin rajoittumatta, aminohappoja, (kuten esimerkiksi glysiini, glutamiini, asparagiini, arginiini tai lysini) antimikrobiaineita, antioksidanteja (kuten esimerkiksi askorbiinihappoa, natriumsulfiittia tai natriumvetysulfiittia), puskureita (kuten esimerkiksi boraattia, bikarbonaattia, Tris-HCl:a, sitraatteja, fosfaatteja tai muita orgaanisia happoja),
- 20 bulkkiaineita (kuten esimerkiksi mannitolia tai glysiiniä), kelatointiaineita (kuten esimerkiksi etyleenitetraetikkahappoa (EDTA), kompleksinmuodostajia (kuten esimerkiksi kofeiinia, polyvinyylipyrrolidonia, beetasyklodekstriiniä tai hydroksipropyylibeetasyklodekstriiniä), täyteaineita, monosakkaridejä, disakkaridejä tai muita hiilihydraatteja (kuten esimerkiksi glukoosia, mannoosia tai dekstriinejä), proteiineja (kuten esimerkiksi seerumin albumiinia, gelatiinia tai immunoglobuliineja), väriaineita, aromiaineita ja ohentimia, emulgointiaineita, hydrofiilisiä polymeerejä (kuten esimerkiksi polyvinyyliiprrolidonia),
- 25 pienimolekyylipainoisia polypeptidejä, suolan muodostavia vastaioneja (kuten esimerkiksi natriumia), säilöntäaineita (kuten esimerkiksi bentsalkoniumkloridia, bentsoehappoa, salisyylihappoa, tiomersaalia, fenetyylialkoholia, metyyliiparabeeniä, propyyliiparabeeniä, klooriheksidiiniä, sorbiinihappoa tai vetyperoksidia), liuottimia (kuten esimerkiksi glyseriiniä, propyleeniglykolia tai
- 30



polyetyleeniglykolia), sokerialkoholeja (kuten esimerkiksi mannitolia tai sorbitolia), suspendointiaineita, pinta-aktiivisuusaineita tai kostutusaineita (kuten esimerkiksi Pluronicia, PEG:tä, sorbitaaniestereitä, polysorbaatteja, kuten polysorbaatti 20:tä tai polysorbaatti 80:tä, tritonia, trometamiinia, lesitiiniä, kolesterolia tai tyloksapalia) 5 stabiiliutta lisääviä aineita (kuten esimerkiksi sakkaroosia tai sorbitolia), toonisuutta lisääviä aineita (kuten esimerkiksi alkalimetallihalogenidejä, edullisesti natrium- tai kaliumkloridia, tai mannitolisorbitolia), vapauttamisen apuaineita, ohentimia, täyteaineita ja/tai farmaseuttisia apuaineita. Katso julkaisua Remington's Pharmaceutical Sciences (18. painos, toimittaja A. R. Gennaro, julkaisija Mack 10 Publishing Company 1990).

Keksinnön antagonistin pitoisuus tällaisessa farmaseuttisessa formulaatiossa voi vaihdella paljon, toisin sanoen vähemmästä kuin noin 0,5 painoprosentista, tavallisesti 1 painoprosentista tai ainakin noin 1 painoprosentista, jopa 15 tai 20 15 painoprosenttiin, ja pitoisuus valitaan etupäässä nestetilavuuksien, viskositeettien jne. perusteella valitun, tietyn antotavan mukaan. Farmaseuttiseen koostumukseen voidaan sisällyttää haluttaessa useampia kuin yhtä antagonistin tyyppiä esimerkiksi antagonisteja, joiden IL-4-reseptoriin sitoutumisella on erilainen K_d .

20 Koostumuksia voidaan antaa potilaalle yksinään tai muihin agensseihin, lääkkeisiin tai hormoneihin yhdistettynä. Aktiivisten ainesosien lisäksi nämä farmaseuttiset koostumukset voivat sisältää sopivia farmaseuttisesti hyväksyttäviä kantaja-aineita, jotka käsittävät täyteaineita ja apuaineita, jotka helpottavat 25 aktiivisten yhdisteiden prosessointia valmisteisiin, joita voidaan käyttää farmaseuttisesti.

Hyväksyttävät formulointimateriaalit ovat käytettyinä annoksina ja pitoisuuksina edullisesti vastaanottajalle myrkyttömiä.

30 Farmaseuttinen koostumus voi sisältää formulaatiomateriaaleja muuntamaan, pitämään yllä tai säilyttämään esimerkiksi koostumuksen pH:n, osmolariteetin, viskositeetin, kirkkauden, värin isotonisuuden, tuoksun, steriiliyden stabiiliuden,

liukenemisen tai vapautumisen nopeuden, adsorption tai läpäisyn. Sopiviin formulaatiomateriaaleihin sisältyy, näihin rajoittumatta, aminohappoja (kuten esimerkiksi glysiiniä, glutamiinia, asparagiinia arginiiniä tai lysiiniä) antimikrobiaineita, antioksidantteja (kuten esimerkiksi askorbiinihappoa, natriumsulfiittia tai natriumvetysulfiittia), puskureita (kuten esimerkiksi boraattia, bikarbonaattia, Tris-HCl:a, sitraatteja, fosfaatteja tai muita orgaanisia happoja), bulkkiaineita (kuten esimerkiksi mannitolia tai glysiiniä), kelatointiaineita (kuten esimerkiksi etyleenitetraetikkahappoa (EDTA), kompleksinmuodostajia (kuten esimerkiksi kofeiinia, polyvinyylipyrrolidonia, beetasyklodekstriiniä tai hydroksipropyylibeetasyklodekstriiniä), täyteaineita, monosakkaridejä, disakkaridejä tai muita hiilihydraatteja (kuten esimerkiksi glukoosia, mannoosia tai dekstriinejä), proteiineja (kuten esimerkiksi seerumin albumiinia, gelatiinia tai immunoglobuliineja), väriaineita, aromiaineita ja ohentimia, emulgointiaineita, hydrofiilisiä polymeerejä (kuten esimerkiksi polyvinyylipyrrolidonia), pienimolekyyllipainoisia polypeptidejä, suolan muodostavia vastaioneja (kuten esimerkiksi natriumia), säilöntäaineita (kuten esimerkiksi bentsalkoniumkloridia, bentsoehappoa, salisyylihappo, tiomersaalia, fenetyylialkoholia, metyyliparabeeniä, propyyliparabeeniä, klooriheksidiiniä, sorbiinihappoa tai vetyperoksidia), liuottimia (kuten esimerkiksi glyseriiniä, propyleeniglykolia tai polyetyleeniglykolia), sokerialkoholeja (kuten esimerkiksi mannitolia tai sorbitolia), suspendointiaineita, pinta-aktiivisuusaineita tai kostutusaineita (kuten esimerkiksi Pluronicsiä, PEG:tä, sorbitaaniestereitä, polysorbaatteja, kuten polysorbaatti 20:tä tai polysorbaatti 80:tä, tritonia, trometamiinia, lesitiiniä, kolesterolia tai tyloksapalia) stabiiliutta lisääviä aineita (kuten esimerkiksi sakkaroosia tai sorbitolia), toonisuutta lisääviä aineita (kuten esimerkiksi alkalimetallihalogeenidejä, edullisesti natrium- tai kaliumkloridia, tai mannitolisorbitolia), vapauttamisen apuaineita, ohentimia, täyteaineita ja/tai farmaseuttisia apuaineita. Katso julkaisua Remington's Pharmaceutical Sciences (18. painos, toimittaja A. R. Gennaro, julkaisija Mack Publishing Company 1990).

Parhaan mahdollisen farmaseuttisen koostumuksen ammattimies voi määrätä esimerkiksi aiotun antotein, antoformaatin ja halutun annostuksen mukaan. Katso esimerkiksi julkaisua Remington's Pharmaceutical Sciences, edellä. Tällaiset

koostumukset voivat vaikuttaa keksinnön nukleiinihappomolekyylin tai luun tiheyden modulaattorin fysikaaliseen tilaan, stabiiliuteen, vapautumisen nopeuteen *in vivo* sekä puhdistuman nopeuteen *in vivo*.

- 5 Farmaseuttisen koostumuksen primaarinen vehikkeli tai kantaja-aine voi olla luonteeltaan joko vesipitoinen tai vedetön. Injektioon sopiva vehikkeli voi olla vesi, fysiologinen keittosuolaliuos tai keinotekoinen aivo-selkäydinneste, joka on täydennetty mahdollisesti muilla materiaaleilla, jotka ovat yleisiä koostumuksissa parenteraalista antoa varten. Lisäesimerkkivehikkeitä ovat neutraali, puskuroitu
- 10 keittosuolaliuos tai keittosuolaliuos, joka on sekoitettu seerumin albumiinin kanssa. Muut farmaseuttiset esimerkkikoostumukset käsittävät Tris-puskuria, jonka pH on noin 7,0–8,5, tai asetaattipuskuri, jonka pH on noin 4,0–5,5, joka voi sisältää edelleen sorbitolia tai sopivaa korviketta. Keksinnön eräässä sovellusmuodossa voidaan valmistaa keksinnön farmaseuttisia koostumuksia sekoittamalla valittu,
- 15 puhtausasteeltaan haluttu koostumus valinnaisen formulointiaineen kanssa (Remington's Pharmaceutical Sciences, edellä) lyofilisoidun kakun tai vesipitoisen liuoksen muodossa varastointia varten. Lisäksi koostumus voidaan formuloida lyofilisaatiksi käyttämällä sopivia täyteaineita, kuten esimerkiksi sakkaroosia.
- 20 Farmaseuttiset koostumukset voidaan valita parenteraaliseen antoon. Koostumukset voidaan valita vaihtoehtoisesti inhalointiin tai ruoansulatuskanavan kautta, kuten oraalisesti, toteutettavaan antoon. Ammattimies taitaa tällaisten farmaseuttisesti hyväksyttävien koostumustenannon.
- 25 Formulaation komponentit ovat pitoisuuksina, jotka ovat antokohdalle otollisia. Voidaan käyttää esimerkiksi puskureita pitämään koostumus fysiologisessa pH:ssa tai vähän matalamassa pH:ssa, tyypillisesti pH-alueella, joka on noin 5–8.
- 30 Kun tarkastellaan parenteraalista antoa, terapeuttiset koostumukset keksinnön käyttöön voivat olla pyrogeenittömänä, parenteraalisesti otollisena vesiliuoksena, joka käsittää keksinnön haluttua molekyyliä farmaseuttisesti sopivassa vehikkelissä. Parenteraaliseen injektioon erityisen sopiva vehikkeli on steriili

5 tislattu vesi, johon molekyyli on formuloitu steriiliksi, isotoniseksi liuokseksi, sopivasti säilytettynä. Vielä toiseen valmisteeseen voi sisältyä halutun molekyylin formulaatio agenssin, kuten esimerkiksi injektoitavien mikropallojen, biosyöpyvien partikkeleiden, polymeeriyhdisteiden (kuten esimerkiksi polymaitohapon tai polyglykoli-
 5 hapon), helmien tai liposomien kanssa, jotka saavat aikaan säädellyn tai pitkittyneen vapautumisen tuotteelle, joka sitten voidaan antaa depot-injektiona. Voidaan käyttää myös hyaluronihappoa, joka voi edistää pitkittyneen vaikutuksen kestoa verenkierrassa. Halutun molekyylin muihin sopiviin käyttöönottokeinoihin kuuluu implantoitavia lääkkeen antolaitteita.

10

Eräässä sovellusmuodossa farmaseuttinen koostumus voidaan formuloida inhalaatiota varten. Keksinnön nukleiinihappomolekyyli tai luun tiheyden muuntaja voidaan formuloida kuivaksi jauheeksi inhalaatiota varten. Voidaan formuloida myös inhalaatioliuoksia ponneaineen kanssa aerosoliantoon. Vielä eräässä
 15 sovellusmuodossa liuoksia voidaan sumuttaa. Antoa keuhkoihin kuvataan edelleen PCT-julkaisussa numerossa WO 94/20 069, joka kuvaa kemiallisesti muunnettujen proteiinien antoa keuhkoihin.

Muissa sovellusmuodoissa voidaan antaa tiettyjä formulaatioita suun kautta.
 20 Keksinnön eräässä sovellusmuodossa voidaan formuloida tällä tavalla annettavia nukleiinihappomolekyyliä tai luun tiheyden muuntajia yhdessä niiden kantaja-aineiden kanssa tai ilman näitä kantaja-aineita, joita käytetään seostettaessa kiinteitä annosmuotoja, kuten tabletteja ja kapseleita. Kapseli voidaan suunnitella vapauttamaan formulaation aktiivinen osa maha-suolikanavan alueessa, jossa
 25 hyötyosuus on suurimmillaan ja systeemiä edeltävä hajoaminen pienimmillään. Voidaan sisällyttää lisäagensseja helpottamaan keksinnön molekyylin tai muuntajan absorptiota. Voidaan käyttää myös ohentimia, maunparannusaineita, vahoja, joilla on matala sulamispiste, kasvisöljyjä, liukuaineita, suspentointiaineita, tabletin hajotusaineita ja sideaineita.

30

Toinen farmaseuttinen koostumus voi sisältää tehokkaan määrän keksinnön nukleiinihappomolekyyliä tai luun tiheyden muuntajia sellaisten myrkyttömien täyteaineiden kanssa, jotka soveltuvat tablettien valmistukseen. Liuottamalla

tabletteja steriiliin veteen tai muuhun sopivaan vehikkeliin voidaan valmistaa liuoksia yksikköannoksen muotoon. Sopiviin täyteaineisiin kuuluu, näihin rajoittumatta, inerttejä ohentimia, kuten esimerkiksi kalsiumkarbonaatti, natriumkarbonaatti tai bikarbonaatti, laktoosi tai kalsiumkarbonaatti, tai sideaineita, 5 kuten esimerkiksi tärkkelys, gelatiini tai akaasia, tai liukuaineita, kuten magnesiumstearaatti, steariinihappo tai talkki.

Ammattimiehelle ovat selviä lisäksi tulevat farmaseuttiset koostumukset, joihin kuuluu keksinnön nukleinihappomolekyylejä tai luun tiheyden muuntajia sisältäviä, 10 hitaasti tai säädellysti vapauttavia formulaatioita. Monien muiden hitaasti tai säädellysti vapauttavien keinojen, kuten liposomien kantajien, biosyöpyvien mikropartikkeleiden tai huokoisten helmien ja depot-ruiskeiden formulointitekniikat ovat ammattimiehen myös ennestään tuntemia. Katso esimerkiksi julkaisua PCT/US93/00 829, joka kuvaa huokoisten polymeerimikropartikkeleiden säädeltyä 15 vapautumista farmaseuttisten koostumusten antoa varten.

Hitaasti vapauttavien valmisteiden muihin esimerkkeihin sisältyy puoliläpäiseviä polymeerimatriiseja muotoiltujen artikkeleiden, kuten esimerkiksi kalvojen tai mikrokapseleiden muodossa. Hitaasti vapauttaviin matriiseihin voi sisältyä 20 polyestereitä, hydrogeelejä, polylaktideja (US-patentti numero 3 773 919 sekä eurooppalainen patentti numero 058 481) L-glutamiinihapon ja gammaetyyleeni-L-glutamaatin kopolymeerejä (Sidman et al., 1983, Biopolymers 22:547–556), poly(2-hydroksietyyliimetakrylaatti (Langer et al., 1981, J. Biomed. Mater. Res. 15:167–277, ja Langer, 1982, Chem. Tech. 12:98–105), etyleenivinyylisetaatti 25 (Langer et al., edellä) tai poly-D(-)-3-hydroksivoihappo (eurooppalainen patentti numero 133 988). Hitaasti vapauttaviin koostumuksiin voi sisältyä myös liposomeja, jotka voidaan valmistaa millä tahansa useista ennestään tunnetuista menetelmistä, katso esimerkiksi julkaisuja Eppstein, et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688–3692, sekä eurooppalaisia patenteja numeroita 036 676, 30 088 046 ja 143 949.

Antoon *in vivo* käytettävän farmaseuttisen koostumuksen täytyy olla tyypillisesti steriili. Tämä voidaan toteuttaa suodattamalla se steriilien suodatusmembraanien

läpi. Kun koostumus lyofilisoidaan, tätä menetelmää käytettäessä voidaan steriloida ennen lyofilisointia ja liuoksen uudelleen muodostamista tai tämän jälkeen. Parenteraalista antoa varten koostumus säilytetään lyofilisoituna tai liuoksessa. Lisäksi parenteraaliset koostumukset sijoitetaan yleensä säiliöön,
 5 jossa on steriili sisäänpääsyikkuna, esimerkiksi laskimoon antoa varten liuospusi tai -pullo, jossa on injektoruiskun neulalla puhkaistava korkki.

Keksinnön farmaseuttisia koostumuksia voidaan antaa millä tahansa lukuisista teistä, kuten tässä kuvataan, mukaan luettuina, näihin rajoittumatta, anto suun
 10 kautta, laskimoon, lihakseen valtimoon, intramedullaarisesti eli selkäytimen sisään, intratekaalisesti eli aivokalvojen sisään, intraventrikulaarisesti, transdermaalisesti eli ihon läpi, ihonalaisesti, intraperitoneaalisesti eli vatsakalvonsisäisesti, intranasaalisesti, parenteraalisesti, topikaalisesti eli paikallisesti, kielen alle tai rektaalisesti eli peräsuolen kautta.

15

Sen jälkeen kun farmaseuttiset koostumukset on valmistettu, ne voidaan sijoittaa sopivaan säiliöön ja merkitä ilmoitetun tilan hoitoa varten. Tällainen merkintä sisältäisi annon määrän, taajuuden ja antomenetelmän.

20 (d) Hoitomenetelmiä

Esillä oleva keksintö saa aikaan menetelmiä sairauden oireiden helpottamiseen sitomalla IL-4-reseptorin alfaketjun ja inhiboimalla IL-4- ja IL-13-välitteisen aktiivisuuden. Näihin sairauksiin sisältyvät ilman rajoitusta hengitysteiden
 25 yliherkkyys ja hengitysteiden tulehdus, mukaan luettuina syöttösolujen, eosinofiilien ja lymfosyyttien lisääntyminen ja aktivoituminen, mikä liittyy astmaan ja muihin immunologisiin tai allergisiin sairauksiin.

Keksinnön eräässä sovellusmuodossa annetaan terapeuttisesti tehokas annos keksinnön muunnettua IL-4-muteiinireseptorin antagonistia ja/tai keksinnön
 30 farmaseuttista koostumusta potilaalle, jolla on sairaus, jolle lisääntynyt IL-4- ja IL-13-aktiivisuus on luonteenomaista kuten edellä esitetyissä sairauksissa.

(e) **Terapeuttisesti tehokkaan annoksen määrittäminen**

Alan ammattimiehet pystyvät hyvin määrittämään terapeuttisesti tehokkaan annoksen. Terapeuttisesti tehokas annos tarkoittaa antagonistin määrää, jota
 5 käytetään käsittelemään astmaa tehokkaasti verrattuna tehokkuuteen, joka on selvä terapeuttisesti tehokkaan annoksen puuttuessa.

Terapeuttisesti tehokas annos voidaan määrittää aluksi eläinmalleilla, tavallisesti
 10 rotilla, kaneilla, porsailla tai kädellisillä, jotka eivät ole ihmisiä. Eläinmallia voidaan käyttää myös sopivan antotien ja antotavan määrittämiseen. Tällaista informaatiota voidaan käyttää sitten määritettäessä käyttökelpoisia annoksia ja antoteitä ihmisillä.

Terapeuttinen teho ja toksisuus, esimerkiksi humaani antagonistin ED_{50}
 15 (terapeuttisesti tehokas annos 50 prosentilla populaatiota) ja LD_{50} (50 prosentille populaatiosta letaalin annos) voidaan määrittää normaaleilla farmaseuttisilla menettelytavoilla soluviljelmissä tai koe-eläimissä. Annoksen toksisten vaikutusten suhde terapeuttisiin vaikutuksiin on terapeuttinen indeksi, ja se voidaan ilmaista suhteena LD_{50}/ED_{50} .

20 Edullisia ovat farmaseuttiset koostumukset, joilla on suuret terapeuttiset indeksit. Eläintutkimuksilla saatuja tuloksia käytetään formuloitaessa annosaluetta humaani käyttöön. Tällaisiin koostumuksiin sisältyvä annos on edullisesti verenkierron pitoisuuksien alueella, joihin pitoisuuksiin kuuluu ED_{50} vähäisin toksisuuksin tai
 25 ilman toksisuutta. Annos vaihtelee alueella, joka on käytetyn annosmuodon, potilaan herkkyuden ja antotien mukainen.

Lääkäri määrää tarkan annostuksen hoitoa vaativaa potilasta koskevien tekijöiden
 30 valossa. Annostus ja anto säädetään saamaan aikaan antagonistin riittäviä tasoja tai halutun vaikutuksen ylläpitoon. Huomioon otettaviin tekijöihin kuuluvat sairauden asteen vakavuus, kohteen yleinen terveystila, ikä, paino ja kohteen sukupuoli, dieetti ja antoaika ja antotaajuus, lääkeyhdistelmä (lääkeyhdistelmät), reaktioherkkyys (reaktioherkkyudet) sekä hoidon sieto/vaste. Pitkävaikutteisia

farmaseuttisia koostumuksia voidaan antaa joka 3:ntenä tai 4:ntenä päivänä, joka viikko tai kerran joka kahdessa viikossa tietyn formulaation puoliintumisajan ja puhdistumisnopeuden mukaan.

- 5 Keksinnön muunnetun IL-4-muteiinin reseptorin antagonisteja koodaavia polynukleotideja voidaan konstruoida ja viedä soluun joko *ex vivo* tai *in vivo* käyttämällä ennestään tunnettuja tekniikoita, joihin sisältyy, näihin rajoittumatta transferriinipolykationin välittämä DNA:n siirto, transfektio paljailla tai kapseloiduilla nukleiinihapoilla, liposomivälitteinen solufuusio, DNA:lla
- 10 päällystettyjen lateksihelmien kuljetus solun sisään, protoplastifusio, virusinfektio, elektroporaatio, "geenikanuuna" sekä DEAE- tai kalsiumfosfaattivälitteinen transfektio.

- Antagonistin tehokkaat annokset *in vivo* ovat potilaan kehon painoa kohti alueella,
- 15 joka on noin 5–50 µg/kg, noin 50 µg/kg–5 mg/kg, noin 100–500 µg/kg ja noin 200–250 µg/kg. Antagonistia koodaavien polynukleotidien antoon tehokkaat annokset *in vivo* ovat alueilla, jotka ovat noin 100–200 ng, 500 ng – 50 mg, noin 1 µg –2 mg, noin 5–500 µg ja noin 20–100 µg DNA:ta.

- 20 Keksinnön muunnettua IL-4-muteiini reseptorin antagonistia sisältävien koostumusten antotapa voi olla mikä tahansa sopiva reitti, joka luovuttaa antagonistin isännälle. Keksinnön farmaseuttisia koostumuksia käytetään erityisesti parenteraaliseen, toisin sanoen ihonalaiseen, lihaksensisäiseen, laskimonsisäiseen, henkitorvensisäiseen tai nenäsisäiseen antoon, tai keuhkoihin
- 25 toteutettaviin muihin antotapoihin.

- Tämän julkaisun kaikki patentit ja patenttihakemukset on sisällytetty tähän nimenomaan viitteinä. Edellä esitetty selitys kuvaa esillä olevaa keksintöä yleisesti. Täydellisemmän ymmärtämisen saavuttamista varten viitataan seuraaviin
- 30 spesifisiin esimerkkeihin, jotka annetaan käyttöön vain valaisutarkoituksessa eikä niitä ole tarkoitettu rajoittamaan keksintöä.

Esimerkkejä

Esimerkki 1

5

IL-4-RA- ja IL-4-RE-kysteiinimuteiinien yhdistelmätuotanto

pET-suuntaava TOPO®-ilmentymisjärjestelmä (Invitrogen) valittiin IL4:n yhdistelmäilmentymistä varten. Järjestelmä käyttää erittäin tehokkaasti yksivaiheista "TOPO®-kloonausstrategiaa" kloonaamaan suunnatusti tylppäpäistä PCR-tuotetta sekä T7/ac-promoottoria kiinnostavan geenin korkeaa tasoa sekä IPTG:llä indusoituvaa ilmentymistä varten *E. coli*ssa. Lisäpiiteisiin sisältyy *lacI*-geeni perustason transkription vähentämiseen, pBR322-alku plasmidin replikaatiota eli kopioitumista varten sekä ampicilliiniresistenssigeeni valintaa varten.

IL-4 kloonattiin pET101/D-TOPO-vektoriin yhdistelmä-IL-4-proteiinin valmistusta varten. Oligonukleotidialukkeet esitetään taulukossa 4. Suunniteltiin forward-PCR-alue 5'CACC-ulokkeen kera helpottamaan suuntaavaa kloonausta, jota aluketta seurasi ainutlaatuinen NdeI-restriktioentsyymikohta alakloonaukseen sekä ensimmäinen ATG-aloituskodoni. Reverse-PCR-alue sisälsi kaksi pysäytyskodonaa varmistamaan sen, ettei yhtään c-terminaalista kaistaa liittynyt, ja ainutlaatuisen BamHI-restriktioentsyymikohdan alakloonaukseen varten. Luotiin tylppäpäinen IL-4-PCR-tuote käyttämällä templaattina aiemmin kloonattua humaani IL-4:ää. Tuote puhdistettiin geelillä ja sitä inkuboitiin suolaliuoksen ja TOPO®-vektorin kanssa viiden minuutin ajan huoneenlämpötilassa, jotta sallittiin suunnattu kloonaus pET101/D-TOPO-vektoriin. Yhdistelmävektori transformoitiin kemiallisesti kelvolliseen One Shot TOP10 *E.coli*in. Yhdistelmä plasmidi-DNA lähetettiin DNA:n sekvensointiin oikean sekvenssin varmistamista varten.

Taulukko 4

Oligonukleotidialukkeita IL-4-RE-kysteiinimuteiinien muodostamiseen

5

10

15

20

25

30

SEQ ID No.	Oligot IL4 RE:t ä varten	Sekvenssi
17	T28C Fwd	GAAGACTCTGTGCACCGAGTTGTGCGTAACA GACATCTTTGC
18	T28C Rev	GCAAAGATGTCTGTTACGCACAACTCGGTGC ACAGAGTCTTC
19	S36C Fwd	GTAACAGACATCTTTGCTGCCTGCAAGAACA CAACTGAG
20	S36C Rev	CTCAGTTGTGTTCTTGCAGGCAGCAAAGATGT CTGTTAC
21	K37C Fwd	CCGTAACAGACATCTTTGCTGCCTCCTGCAAC ACAACTGAGAAGG
22	K37C Rev	CCTTCTCAGTTGTGTTGCAGGAGGCAGCAAA GATGTCTGTTACGG
23	N38C Fwd	GACATCTTTGCTGCCTCCAAGTGCACAACTGA GAAGGAAACC
24	N38C Rev	GGTTTCCTTCTCAGTTGTGCACTTGGAGGCAG CAAAGATGTC
25	A104C Fwd	GAATTCCTGTCCTGTGAAGGAATGCAACCAG AGTACGTTGG
26	A104C Rev	CCAACGTACTCTGGTTGCATTCTTCACAGGA CAGGAATTC
27	N105C Fwd	CCTGTGAAGGAAGCCTGCCAGAGTACGTTGG AAAACTTC
28	N105C Rev	GAAGTTTTCCAACGTACTCTGGCAGGCTTCCT TCACAGG
29	Q106C Fwd	CCTGTCCTGTGAAGGAAGCCAAGTGCAGTAC GTTGGAAAACCTTC
30	Q106C Rev	GAAGTTTTCCAACGTACTGCAGTTGGCTTCCT TCACAGGACAGG

IL-4/pET101/D-TOPO toimi templaattina IL-4-RE-kysteiinimuteiinien tuottamista varten Stratagenen QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kitin kanssa. Kukin kysteiinimuteiini valmistettiin käyttämällä oligonukleotidialukkeita, joista kukin oli komplementaarinen vektorin vastakkaisille säikeille ja sisälsi kodonin TGC tai GCA halutun kysteiinimutaation sisällyttämistä varten. Taulukossa 4 luetellaan alukkeet, joita käytettiin IL-4-RE-muteiinien tuottamiseen. Tuotettiin vuoroittaisia lovia sisältävä mutatoitu plasmidi käyttämällä kierrätysparametrejä ja olosuhteita, jotka on määritelty valmistajan ohjeissa. Tuotetta käsiteltiin DpnI-endonukleasilla yhden tunnin ajan 37 °C:ssa, metyloidun, mutatoitumattoman parentaalisen DNA-templaatin pilkkomista varten. DpnI:llä käsitelty DNA transformoitiin ylikykeneviin XL-1Blue-soluihin, jolloin mutatoituneen plasmidin lovet korjattiin. Mutageeninen plasmidi-DNA analysoitiin standardisekvenssitekniikoin oikean sekvenssin varmistamista varten.

15 Esimerkki 2

Rekombinantin ilmentyminen & puhdistus

Proteiinia sisältävillä plasmideilla transformoituja BL21 Star (DE3) One Shot -soluja (Invitrogen) luonnehdittiin optimi-ilmentymisen suhteen ja niitä kasvatettiin 37 °C:ssa, kunnes OD₆₀₀ saavutti noin arvon 0,4, ja indusoiittiin 1 mmoolilla IPTG:tä (Invitrogen) kolmen tunnin ajan 37 °C:ssa. Yksi litra soluja sentrifugoitiin pelletiksi nopeudella 13 000 kierrosta minuutissa 10 minuutin ajan, solut punnittiin ja niitä säilytettiin -80 °C:ssa. Jäädyltetty solupelletti lietettiin uudelleen 8 millilitraan soluja hajottavaa puskuria (0,1 M fosfaattipuskuri pH 7,3, 0,1 % Triton X100:aa, 1 mM EDTA:ta) solujen grammaa kohti ja niitä sonikoitiin neljä kertaa yhden minuutin ajan yhden minuutin välein. Soluhajote poistettiin sentrifugoimalla 35 000 g:llä 10 minuutin ajan. Solupelletit pestiin sitten 2–3 kertaa liettämällä ne uudelleen 30 millilitraan soluja hajottavaa puskuria, sonikoimalla niitä yhden minuutin ajan, mitä seurasi sentrifugointi. Hieno solupelletti, inkluusiokappaleet, säilytettiin -20 °C:ssa. Inkluusiokappaleet lietettiin uudelleen 5 millilitraan solubilisaatiopuskuria (0,2 M Tris, pH 9, 7 M guanidiinihydrokloridi) solujen grammaa kohti. Lisättiin sulfotolyyssireagensseja (0,16 grammaa natriumsulfiittia, 0,08 g

kaliumtetratrionaattia solujen grammaa kohti) ja inkluusiokappaleita sekoitettiin huoneenlämpötilassa kahden tunnin ajan. Liukenemattomat aineosat poistettiin sitten sentrifugoimalla 35 000 g:llä 20 minuutin ajan, mikä jätti jäljelle solubilisoituja inkluusiokappaleita. Inkluusiokappaleet ajettiin kokoekskluusiokromatografialla (Akta) proteiinin eristämistä varten. Pylväs tasapainotettiin kahdella pylvään tilavuudella 6-molaarista guanidiinihydrokloridia/PBS:ää, pH 7; virtausnopeudella 1 ml/min ja proteiini eluointiin 1,5 CV:ssä. Koottiin huippujakeet (kukin 1,5 ml) ja ne tutkittiin 12-prosenttisella tai 4–20-prosenttisella Bis-Tris-SDS-geelielektroforeesilla. Proteiinia sisältävät jakeet koottiin ja lisättiin lopullinen pitoisuus 7,5 mmolaarista DTT:tä, jotta vähennettiin proteiinimolekyyliä. Kahden tunnin mittaisen, huoneenlämpötilassa toteutetun inkuboinnin jälkeen laimennettiin seos viisi kertaa vedellä ja dialysoitiin 4,5 litralla 3-mmolaarista NaH_2PO_4 :a, 7-mmolaarista Na_2HPO_4 :a, 2-mmolaarista KCl:a, 120 mmolaarista NaCl:a. Dialyysia jatkettiin 3–4 päivän ajan vaihtamalla tuore puskuri ainakin kolme kertaa.

Dialysoitu materiaali suodatettiin sitten 0,2 μm :n suodattimen läpi ja pH säädettiin viideksi etikkahapolla. Pylväs tasapainotettiin 10 CV:llä puskuria 1 (24-mmolaarinen ammoniumasetaatti, pH 5), mitä seurasi 20 minuutin gradientti 100-prosenttiseen puskuriin B (25-mmolaarinen ammoniumasetaatti, pH 5/1-molaarinen NaCl) injektion jälkeen. Huippujakeet (0,5 ml kukin) koottiin ja ne tutkittiin 12-prosenttisella tai 4–20-prosenttisella Bis-Tris-SDS-geelielektroforeesilla. Tuotetta sisältävät jakeet yhdistettiin ja ne laimennettiin kaksi kertaa puskuriin A (0,1 prosenttia TFA vedessä). Proteiini kromatografoitiin sitten C4-käänteisfaasi-HPCXL:llä (Beckman-järjestelmä, Gold), käyttämällä viiden millilitran näytesilmukkaa ja virtausnopeutta 1 ml/minuutti ja seuraavaa ohjelmaa:

10-prosenttinen puskuri A injektion keston ajan, 10 minuutin gradientti 40-prosenttiseen puskuriin B (0,1 prosenttia TFA:ta/ACN), 30 minuutin gradientti 50-prosenttiseen puskuriin B sekä viiden minuutin gradientti 100-prosenttiseen puskuriin B. Koottiin huippujakeet (0,5 ml kukin) ja ne tutkittiin 12-prosenttisella tai 4–20-prosenttisella Bis-Tris-SDS-geelielektroforeesilla. Proteiinia sisältävät jakeet kuivattiin ja lietettiin uudelleen 0,1-molaariseen MES:ään, pH 6,1 analyysia ja määrittelyä varten.

Esimerkki 3

Paikkaspesifinen kysteiinin PEGylaatio ja puhdistaminen

- 5 Saatiin aikaan ohje kysteiiniä sisältävien IL-4-muteiinien PEGylaatiolle proteiinin sulhydryyliryhmän ja lineaarisen 22 kD:n metoksipolyetyleeniglykolimaleimidijohdannaisen (Nektar Therapeutics) maleimidiryhmän välisen, stabiilin tioetterisidoksen kautta. Lisättiin kaksinkertainen molaarinen ylimäärä mPEG-MAL 22 kD -reagenssia 60 μ mooliin
- 10 proteiinia, joka oli reaktiopuskurissa (0,1 M MES, pH 6). Puolen tunnin kuluttua huoneenlämpötilassa reaktio lopetettiin mPEG-MAL 22kD:n suhteen kysteiinin kaksikertaisella molaarisella ylimäärällä (kuvio 1). PEGyloitu proteiini puhdistettiin reagoimattomasta mPEG-MAL 22 kD:stä (tukahdutettu kysteiinillä) ja reagoimaton IL-4 RA -kysteiinimuteiinista kationinvaihdolla ja kokoeksklusiokromatografialla.
- 15 Raa'at reaktioseokset pantiin Vivapure Mini S -kationinvaihtopylväisiin (Vivascience), jotka oli tasapainotettu 0,4 millilitralla 0,1-molaarista MES:ää, pH 6. Pylväät pestiin kaksi kertaa 0,4 millilitralla 0,1-molaarista MES:ää, pH 6, kunkin pesun jälkeen seurasi sentrifugointi 2 000 x g:llä. Näytteet eluoiitiin sentrifugoimalla ne pylväästä 0,4 millilitralla 0,6-molaarista NaCl:a/0,1-molaarista MES:ää, pH 6.
- 20 Eluutiot (0,4 ml) pantiin koon mukaan lajittelevaan pylvääseen TSK-GEL 2000SWXL HPLC (Tosoh Biosep) käyttämällä Beckmannin HPLC Gold -järjestelmää. Näytteet erotettiin käyttämällä fosfaatilla puskuroitua keittosuolaliuosta (Dulbecon PBS) liikkuvana faasina virtausnopeudella 1 ml/minuutti 30 minuutin ajan. Koottiin huippujakeet (0,5 ml) ja ne arvioitiin
- 25 PEGyloidun proteiinin suhteen 4–12-prosenttisella Bis-Tris-SDS-geelelektroforeesilla. Koottiin tuotteen sisältävät jakeet ja ne väkevöitiin Ultrafree Biomax-5 -laitetta käyttämällä noin 60 μ mooliin (eli noin 1 milligrammaan millilitrassa) analyysiä ja *in vitro* -määrityksiä varten. Määritettiin lopulliset pitoisuudet PEGyloitujen proteiinien suhteen aminohappoanalyysiä käyttämällä.
- 30 Lopulliset saannot kuvataan taulukossa 5.

Taulukko 5

Puhdistuksen saannot PEGyloitujen IL4RA-kysteiinimuteiinien suhteen

Muteiini	PEGyloitu ensimmäinen (mg,	PEGyloitu lopullinen) (mg,	% saanto
IL4RA	ND	ND	ND
T28C	0,267	0,064	24,0
S36C	0,392	0,057	14,5
K37C	0,264	0,011	4,2
N38C	0,387	0,083	21,4
A104C	0,213	0,010	4,7
N105C	0,289	0,044	15,2
106C	0,125	0,023	18,4
Keskiarvo	0,176	0,042	14,6

5

Esimerkki 4

BiaCore IL-4-reseptori -sitoutumismääritys

10

IL-4-reseptori immobilisoitiin amiinikytkennällä tutkimustason BIAcore CM5 -anturilastuun. Sensorin pinta aktivoitiin EDC/NHS-pulssilla. IL-4-reseptori liuotettiin 10-millimolaariseen asetaattipuskuriin (pH 5,0) ja injektointi virtauskyvetiin 2, mitä seurasi 1,0-molaarisen etanoliamiini-HCl:n pulssi pinnan deaktivoitua varten. Reseptorille immobilisaatiotasoa oli noin 300 RU. Virtauskyveti1 aktivoitiin myös ilman ligandia, jotta tämä toimii nollakokeena. Kinetiikan analysointiin käytettiin the Biacore Wizardia. IL4RE-antagonistien ehdokas laimennettiin HBS-EP:hen (ajopuskuri) ja injektointi virtausnopeudella 30 µl minuutissa kolmen minuutin ajan ja 15 minuutin dissosioitumisajan. Lastu regeneroitiin 10 mmolaarisen glysiinin, pH 2,5, kahdella 30 sekunnin injektioilla (virtaus 100 µl/min) perustasoon ennen pitoisuussarjojen toista injektioita. Suoran sitoutumiskinetiikan perusteella laskettiin kullekin ehdokkaalle

20

dissosioitumisvakion (K_D) arvot (taulukko 5). Tulokset osoittavat, että rakenteet IL4-RE-A104C, IL4-RE-N105C sekä IL4-RE-Q106C tuottivat kaikki dissosioitumisvakioita, jotka olivat pienempiä kuin 0,6 nmoolia.

5 Esimerkki 5

TF-1-solun proliferaation määrittäminen

TF-1-solujen proliferatiivista vastetta IL-4:lle (0,5 ng/ml, 0,033 nM) tai IL-13:lle (5 ng/ml, 0,416 nM) käytettiin IL-4RE-molekyylien toiminnallisen antagonistiaktiivisuuden määrittämiseen. Tässä määritysmenetelmässä viljeltiin TF-1-soluja 2–4 päivän ajan 96-kammioisissa levyissä (1×10^4 /kammio, 100 μ l:n tilavuus) RPMI:ssä, jossa oli 10 prosenttia seerumia IL-4- tai IL-13- sekä IL-4Re-molekyylien kanssa ja ilman näitä. Positiivisena kontrollina käytettiin GM-CSF-käsittelyä. Kaksikymmentäneljä tuntia ennen lopullista luentaa lisättiin kuhunkin kammioon 10 μ l AlamarBlueta (10 tilavuusprosenttista). Fluoresenssi määritettiin 530/590 nm:ssä käyttämällä laitetta WALLAC Victor 2. Pitoisuus, jossa inhibointi oli 50 prosenttinen (IC_{50}), laskettiin IL-4RE-ehdokasmolekyylien annostitrauksen perusteella. TF-1:llä toteutettujen IL-4- ja IL-13-inhibition biomääritystulosten yhteenveto esitetään taulukossa 6. Tulokset ilmaisevat, että konstruktiot IL4-RE-K37C, IL4-RE-N38C sekä IL4-RE-A104C havainnollistivat IL-4-RA:han verrattavia IC_{50} -arvoja IL-4:n tai IL-13:n läsnäollessa.

Taulukko 6

PEGyloitujen muteiinien PEG-IL4RE BIAcore -sitoutumismääritys ja bioaktiivisuuden arviointi IL4RA:han verrattuna TF-1-solun proliferaatiomäärityksissä

Muteiini	BIAcore Affiniteetti, NM	TF-1/IL-4 IC ₅₀ , nM	TF-1/IL-13 IC ₅₀ , nM
Bay 16-9996 IL-4RA	0,11	0,56 + 0,86 (n = 17)	1,17 + 1,77 (n = 6)
IL4-RE-T28C	0,89	2,35 + 0,75 (n = 2)	2,87 + 0 (n = 1)
IL4-RES36C	1,15	1,20 + 0,02 (n = 2)	1,21 + 0 (n = 1)
IL4-RE-K37C	0,74	0,82 + 0,01 (n = 2)	1,22 + 0,58 (n = 2)
IL4-RE-N38C	0,77	0,70 + 0,18 (n = 2)	1,24 + 0,58 (n = 2)
IL4-RE-A104C	0,56	0,55 + 0,10 (n = 2)	1,34 + 1,21 (n = 2)
IL4-RE-N105C	0,59	2,26 + 0,20 (n = 2)	2,11 + 0 (n = 1)
IL4-RE-Q106C	0,52	2,44 + 0,68 (n = 2)	1,95 + 0 (n = 1)

Esimerkki 6

10

Primaarisolun proliferaatiomääritys

15

20

Humaani primaarisolujen (T- ja B-solujen) proliferatiivinen vaste IL-4:lle arvioitiin IL-4RE-molekyyliesikäsittelyn jälkeen. Eristettiin perifeerisen veren mononukleaarisia soluja (PBMC:itä) perifeerisestä verestä ja joitakin käsiteltiin PHA:lla neljän päivän ajan T-solublastin muodostumisen indusointia varten. PBMC:itä käsiteltiin myös anti-CD40:llä B-soluaktiivisuuden aktivointia varten ja ne käytettiin välittömästi. Solut ympättiin 96-kammioisiin levyihin (10^5 solua kammiota kohti). PHA T -solublasteja sekä B-soluvalmisteita stimuloitiin kolmen päivän ajan IL-4:llä (10 ng/ml, 0,667 nM), siten että läsnä oli IL-4RE-molekyylien vaihtelevia pitoisuuksia. Tritoidun tymidiinin liittymistä inkuboinnin viimeisten 20 tunnin aikana

käytettiin proliferaation indikaattorina. Määritysten tulokset esitetään taulukossa 7. Tulokset ilmaisevat, että PEGyloidut rakenteet havainnollistivat IC_{50} :n, joka oli vähemmän kuin viisi kertaa suurempi kuin IL-4RA:n IC_{50} molemmille primaarisolumäärittäyksille.

5

Taulukko 7

PEG-IL4RE:n biologisen aktiivisuuden arviointi B-solun ja T-solublastin proliferaation määrittäyksissä

10

Muteiini	B-solu IC_{50} , nM	T-solublasti, IC_{50} , nM
BAY 16-9996 IL-4RA	0,86 + 0,42 (n = 10)	3,22 + 3,26 (n = 16)
IL4-RE-K37C	3,73 + 2,15 (n = 2)	13,86 + 12,77 (n = 2)
IL4-RE-N38C	3,33 + 2,68 (n = 2)	9,94 + 8,99 (n = 2)
IL4-RE-A104C	3,29 + 1,46 (n = 2)	4,67 + 4,65 (n = 2)

Esimerkki 7

15 Farmakokineettiset tutkimukset rotalla

Käytettiin täysikasvuisia, koiraspuolisia Sprague-Dawley-rottia, jotka painoivat 250–300 grammaa. Rottien kaulasuoni kanyloitiin verinäytteen kokoamista varten. Lisäksi lääkkeenantoa varten kanyloitiin reisilaskimokatetreilla ryhmä rottia, jotka saivat laskimonsisäisen (IV) annoksen,.

20

Rotille annettiin joko IL-4RA:ta tai muunnettua IL-4-muteiinireseptorin antagonistia vastaavasti annoksina, jotka olivat 1 ja 0,5 mg/kg. Käytettiin sekä IV- että SC- (ihonalaista) antotietä. IV-annos annettiin injektiona suoraan paikallaan olevaan reisilaskimokatetriin. SC-annos annettiin injektiona dorsaaliseen torakaaliseen alueeseen. Kuhunkin annosryhmään käytettiin kolme rottaa.

25

Yhden lääkepulloinjektion jälkeen (IV tai SC) koottiin verinäytteet ennen annosta ja ennalta määritettyinä aikoina aina 168 tuntiin saakka annoksen jälkeen. Näytteiden sentrifugointi alkoi yhden tunnin kuluttua keräämisestä. Koottiin plasma ja se asetettiin kuivajäähän, ennen kuin sitä säilytettiin noin -70 °C:ssa.

5

IL-4RA:n ja muunnetun muteiinin plasmapitoisuudet kvantitoitiin entsyymi-immunologisella määrittämis menetelmällä. Reagenssien päälylytämiseen ja ilmaisuun käytettiin anti-IL-4-vasta-ainetta. Kvantitoinnin alaraja tälle määrittäkselle oli 0,2 ng/ml. Farmakokineettiset parametrit johdettiin "non-compartmental"-analyysillä (ei-allasanalyysillä) käyttämällä WinNonlinia (Pharsight, Mountain View, CA). Erityistä mielenkiintoa on määrittää absorptio ja eliminaatiokinetiikka, jakaumatilavuudet sekä absorboitunut määrä.

10



Viitteet

1. Ying, S., M. Humbert, J. Barkans, C.J. Corrigan, R. Pfister, G. Menz, M. Larche, D. S. Robinson, S. R. Durham ja A. B. Kay, 1997. Expression of IL-4-
5 and IL-5 mRNA and protein product by CD⁺ and CD8⁺ T cells, eosinophils, and mast cells in bronchial biopsies obtained from atopic and nonatopic (intrinsic) asthmatics, *J. Immunol.* 158: 3539–3544.
2. Huang, S. K., H. Q. Xiao, J. Kleine-Tebbe, G. Paciotti, D. G. Marsh, L. M. Lichtenstein ja M. C. Liu, 1995. IL-13 expression at the sites of allergen
10 challenge in patients with asthma. *J. Immunol.* 155:2688–2694.
3. Zhu, Z., R. J. Homer, Z. Wang, Q. Chen, G. P. Geba, J. Wang, Y. Zhang ja J. A. Elias, 1999. Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation,
15 mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. *J. Clin. Invest.* 103: 779–788.
4. Henderson, W. R. J., E. Y. Chi ja C. R. Maliszewski, 2000. Soluble IL-4-
20 receptor inhibits airway inflammation following allergen challenge in a mouse model of asthma. *J. Immunol.* 164: 1086–1095.
5. Sambrook (1989) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, N. Y., 1995.

Patenttivaatimukset

1. Puhdistettu polynukleotidi, **joka** käsittää
 - a) nukleotidisekvenssin, joka on esitetty SEQ ID NO: 2:ssa, SEQ ID NO: 3:ssa, SEQ ID NO: 4:ssä, SEQ ID NO: 5:ssä, SEQ ID NO: 6:ssa, SEQ ID NO: 7:ssä tai SEQ ID NO: 8:ssa, tai
 - b) nukleotidisekvenssin, joka koodaa polypeptidiä, jolla on aminohapposekvenssi, joka on esitetty SEQ ID NO: 10:ssä, SEQ ID NO: 11:ssä, SEQ ID NO: 12:ssa, SEQ ID NO: 13:ssa, SEQ ID NO: 14:ssä, SEQ ID NO: 15:ssä, SEQ ID NO: 16:ssa.
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen ilmentymisvektori.
3. Isäntäsolu, **joka** käsittää patenttivaatimuksen 2 mukaisen vektorin.
4. Menetelmä muunnetun IL-4-muteiinireseptoriantagonistin valmistukseen, **joka** menetelmä käsittää vaiheet, joissa
 - a) viljellään patenttivaatimuksen 3 mukaista isäntäsolua olosuhteissa, joissa antagonisti ilmentyy, ja
 - b) antagonisti puhdistetaan isäntäsoluviljelmästä.
5. Patenttivaatimuksen 4 mukaisella menetelmällä tuotettu muunnettu IL-4-muteiinireseptorin antagonisti, **jolloin** antagonisti inhiboi IL-4- ja IL-13-välitteistä aktiivisuutta.
6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen muunnettu IL-4-muteiinireseptorin antagonisti, **joka** on kytketty polymeeriin, joka ei ole proteiini, joka polymeeri on valittu ryhmästä, joka koostuu polyetyleeniglykolista, polypropyleeniglykolista ja polyoksialkyleeneistä.
7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen muunnettu IL-4-muteiinireseptorin antagonisti, **jolloin** muunnettu muteiinireseptorin antagonisti sitoutuu IL-4-reseptorin alfaketjuun K_d :llä, joka on noin 0,1 nM – 10 μ M, noin 0,5 nM – 1 μ M tai noin 1,0–100 nM.

8. Patenttivaatimuksen 6 mukainen muunnettu IL-4-muteiinireseptorin antagonisti, **jolloin** muunnettu IL-4-muteiinireseptorin antagonisti inhiboi TF-1-solujen proliferaatiivisen vasteen IL-4:ää kohtaan, siten että IC_{50} on noin 0,1 nM – 10 μ M, noin 0,5 nM – 1 μ M tai noin 1,0–100 nM.

5

9. Patenttivaatimuksen 6 mukainen muunnettu IL-4-muteiinireseptorin antagonisti, **jolloin** muunnettu IL-4-muteiinireseptorin antagonisti inhiboi TF-1-solujen proliferaatiivisen vasteen IL-13:a kohtaan, siten että IC_{50} on noin 0,1 nM:sta noin 10 μ M:iin, noin 0,5 nM:sta noin 1,0 μ M:iin tai noin 1,0–100 nM.

10

10. Patenttivaatimuksen 6 mukainen muunnettu IL-4-muteiinireseptorin antagonisti, **jolloin** muunnettu IL-4-muteiinireseptorin antagonisti inhiboi humaani B-solujen proliferaatiivisen vasteen IL-4:ää kohtaan, siten että IC_{50} on noin 0,1 nM:sta noin 10 μ M:iin, noin 0,5 nM:sta noin 1,0 μ M:iin tai noin 1,0–100 nM.

15

11. Patenttivaatimuksen 6 mukainen muunnettu IL-4-muteiinireseptorin antagonisti, **jolloin** muunnettu IL-4-muteiinireseptorin antagonisti inhiboi humaani T-solujen proliferaatiivisen vasteen IL-4:ää kohtaan, siten että IC_{50} on noin 0,1 nM:sta noin 10 μ M:iin, noin 0,5 nM:sta noin 1,0 μ M:iin tai noin 1,0–100 nM.

20

12. Patenttivaatimuksen 6 mukainen muunnettu IL-4-muteiinireseptorin antagonisti, **jolloin** muunnetulla IL-4-muteiinireseptorin antagonistilla puoliintumisaika plasmassa on ainakin noin 2–10 kertaa suurempi kuin muuntamattomalla IL-4-reseptorin antagonistilla.

25

13. Patenttivaatimuksen 6 mukainen muunnettu IL-4-muteiinireseptorin antagonisti, **jolloin** muunnettu IL-4-muteiinireseptorin antagonisti on kytketty polymeeriin, joka ei ole proteiini, IL-4:n aminohappotähteessä, asemassa 28, 36, 37, 38, 104, 105 tai 106.

30

14. Patenttivaatimuksen 13 mukainen muunnettu IL-4-muteiinireseptorin antagonisti, **jolloin** aminohappotähte asemassa 28, 36, 37, 38, 104, 105 tai 106 on kysteiini.

15. Menetelmä ihmisen sairauden hoitoon, johon sairauteen liittyy IL-4:n ja IL-13:n lisääntynyt aktiivisuus, **joka** menetelmä käsittää vaiheet, joissa

- a) edellytetään henkilöä, jolla on sairaus, jossa IL-4:n tai IL-13:n aktiivisuus on lisääntynyt, ja
- 5 b) mainitulle henkilölle annetaan tehokas määrä patenttivaatimuksen mukaista muunnettua IL-4-muteiinireseptorin antagonistia.

16. Patenttivaatimuksen 15 mukainen menetelmä, **jossa** sairaus on astma, krooninen ahtauttava keuhkosairaus tai näille läheisiä keuhkosairauksia.

10

17. Patenttivaatimuksen 16 mukainen menetelmä, **jossa** krooninen ahtauttava keuhkosairaus on keuhkolaajentuma tai krooninen bronkiitti.

18. Farmaseuttinen koostumus, **joka** käsittää

- 15 a) patenttivaatimuksen 6 mukaisen muunnetun IL-4-muteiinireseptorin antagonistin ja
- b) farmaseuttisesti hyväksyttävän kantaja-aineen.

19. Menetelmä ihmisen sairauden hoitoon, johon sairauteen liittyy IL-4:n ja IL-13:n lisääntynyt aktiivisuus, joka menetelmä käsittää vaiheet, **joissa**

20

- a) edellytetään henkilöä, jolla on sairaus, jossa IL-4:n tai IL-13:n aktiivisuus on lisääntynyt, ja
- b) mainitulle henkilölle annetaan tehokas määrä patenttivaatimuksen 18 mukaista farmaseuttista koostumusta.

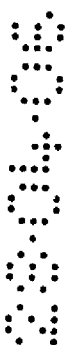
25

20. Patenttivaatimuksen 19 mukainen menetelmä, **jolloin** sairaus on astma, krooninen ahtauttava keuhkosairaus tai näille läheisiä keuhkosairauksia.

21. Patenttivaatimuksen 20 mukainen menetelmä, **jolloin** ahtauttava keuhkosairaus on keuhkolaajentuma tai krooninen bronkiitti.

30

22. Muunnettu IL-4-muteiinireseptorin antagonisti, joka on kytketty polymeeriin, joka ei ole proteiini, IL-4:n aminohappotähteessä, asemassa 28, 36,



37, 38, 104, 105 tai 106, **jolloin** polymeeri, joka ei ole proteiini, on polyetyleeniglykoli, polypropyleeniglykoli tai polyoksaalkyleeni.

23. Patenttivaatimuksen 22 mukainen muunnettu IL-4-muteiinireseptorin antagonist, **joka** käsittää SEQ ID NO: 10:ssä esitetyn aminohapposekvenssin.

24. Patenttivaatimuksen 22 mukainen muunnettu IL-4-muteiinireseptorin antagonist, **joka** käsittää SEQ ID NO: 11:ssä esitetyn aminohapposekvenssin.

25. Patenttivaatimuksen 22 mukainen muunnettu IL-4-muteiinireseptorin antagonist, **joka** käsittää SEQ ID NO: 12:ssa esitetyn aminohapposekvenssin.

26. Patenttivaatimuksen 22 mukainen muunnettu IL-4-muteiinireseptorin antagonist, **joka** käsittää SEQ ID NO: 13:ssa esitetyn aminohapposekvenssin.

27. Patenttivaatimuksen 22 mukainen muunnettu IL-4-muteiinireseptorin antagonist, **joka** käsittää SEQ ID NO: 14:ssä esitetyn aminohapposekvenssin.

28. Patenttivaatimuksen 22 mukainen muunnettu IL-4-muteiinireseptorin antagonist, **joka** käsittää SEQ ID NO: 15:ssä esitetyn aminohapposekvenssin.

29. Patenttivaatimuksen 22 mukainen muunnettu IL-4-muteiinireseptorin antagonist, **joka** käsittää SEQ ID NO: 16:ssa esitetyn aminohapposekvenssin.

30. Patenttivaatimuksen 22 mukainen muunnettu IL-4-muteiinireseptorin antagonist, **jolloin** muunnettu muteiinireseptorin antagonist sitoutuu IL-4-reseptorin alfaketjuun K_d :llä, joka on noin 0,1 nM – 10 μ M, noin 0,5 nM – 1 μ M tai noin 1,0–100 nM.

31. Patenttivaatimuksen 22 mukainen muunnettu IL-4-muteiinireseptorin antagonist, **joka** inhiboi TF-1-solujen proliferatiivisen vasteen IL-4:ää kohtaan, siten että IC_{50} on noin 0,1 nM – 10 μ M, noin 0,5 nM – 1 μ M tai noin 1,0–100 nM.

32. Patenttivaatimuksen 22 mukainen muunnettu IL-4-muteiinireseptorin antagonisti, **jolloin** muunnettu IL-4-muteiinireseptorin antagonistin inhiboi TF-1-solujen proliferatiivisen vasteen IL-13:a vastaan, siten että IC_{50} on noin 0,1 nM:sta noin 10 μ M:iin, noin 0,5 nM:sta noin 1,0 μ M:iin tai noin 1,0–100 nM.

5

33. Patenttivaatimuksen 22 mukainen muunnettu IL-4-muteiinireseptorin antagonistin, **jolloin** muunnettu IL-4-muteiinireseptorin antagonistin inhiboi humaani B-solujen proliferatiivisen vasteen IL-4:ää kohtaan, siten että IC_{50} on noin 0,1 nM:sta noin 10 μ M:iin, noin 0,5 nM:sta noin 1,0 μ M:iin tai noin 1,0–100 nM.

10

34. Patenttivaatimuksen 22 mukainen muunnettu IL-4-muteiinireseptorin antagonistin, **jolloin** muunnettu IL-4-muteiinireseptorin antagonistin inhiboi humaani T-solujen proliferatiivisen vasteen IL-4:ää kohtaan, siten että IC_{50} on noin 0,1 nM:sta noin 10 μ M:iin, noin 0,5 nM:sta noin 1,0 μ M:iin tai noin 1,0–100 nM.

15

35. Patenttivaatimuksen 22 mukainen muunnettu IL-4-muteiinireseptorin antagonistin, **jolloin** muunnetulla IL-4-muteiinireseptorin antagonistilla puoliintumisaika plasmassa on ainakin noin 2–10 kertaa suurempi kuin muuntamattomalla IL-4-reseptorin antagonistilla.

20

36. Patenttivaatimuksen 22 mukainen muunnettu IL-4-muteiinireseptorin antagonistin, **jolloin** aminohappotähde asemassa 28, 36, 37, 38, 104, 105 tai 106 on kysteiini.

25

37. Farmaseuttinen koostumus, **joka** käsittää
a) muunnetun IL-4-muteiinireseptorin antagonistin sekä
b) farmaseuttisesti hyväksyttävän kantaja-aineen.

30

38. Menetelmä ihmisen sairauden hoitoon, johon sairauteen liittyy IL-4:n ja IL-13:n lisääntynyt aktiivisuus, joka menetelmä käsittää vaiheet, **joissa**
a) edellytetään henkilöä, jolla on sairaus, jossa IL-4:n tai IL-13:n aktiivisuus on lisääntynyt, ja

b) mainitulle henkilölle annetaan tehokas määrä patenttivaatimuksen 37 mukaista farmaseuttista koostumusta.

39. Patenttivaatimuksen 38 mukainen menetelmä, **jolloin** sairaus on
5 astma, krooninen ahtauttava keuhkosairaus tai näille läheisiä keuhkosairauksia.

40. Patenttivaatimuksen 39 mukainen menetelmä, **jolloin** ahtauttava keuhkosairaus on keuhkolaajentuma tai krooninen bronkiitti.

10 41. Menetelmä muunnetun IL-4-muteiinireseptorin antagonistin valmistukseen, **joka** menetelmä käsittää vaiheet, joissa

- a) viljellään patenttivaatimuksen 3 mukaista isäntäsolua olosuhteissa, joissa antagonistit ilmentyy,
- b) annetaan antagonistin laskostua uudelleen ditiotreitolin ollessa läsnä ja
- 15 c) antagonistit puhdistetaan isäntäsoluviljelmästä.

42. Patenttivaatimuksen 41 mukainen menetelmä, **joka** käsittää edelleen vaiheet, joissa

- d) antagonistit kytketään polymeeriin, joka ei ole proteiini ja
- 20 e) puhdistetaan antagonistit, joka on kytketty polymeeriin, joka ei ole proteiini.

43. Patenttivaatimuksen 41 tai 42 mukaisella menetelmällä tuotettu muunnettu IL-4-muteiinireseptorin antagonistit, **jolloin** antagonistit inhiboi IL-4- ja IL-13-välitteistä aktiivisuutta.

25

44. Patenttivaatimuksen 43 mukainen muunnettu IL-4-muteiinireseptorin antagonistit, **joka** on kytketty polymeeriin, joka ei ole proteiini, joka polymeeri on polyetyleeniglykoli, polypropyleeniglykoli tai polyoksialkyleeni.

30 45. Patenttivaatimuksen 44 mukainen muunnettu IL-4-muteiinireseptorin antagonistit, **jolloin** muunnettu muteiinireseptorin antagonistit sitoutuu IL-4-reseptorin alfaketjuun K_d :llä, joka on noin 0,1 nM – 10 μ M, noin 0,5 nM – 1 μ M tai noin 1,0–100 nM.

46. Patenttivaatimuksen 44 mukainen muunnettu IL-4-muteiinireseptorin antagonisti, **jolloin** muunnettu IL-4-muteiinireseptorin antagonistin inhiboi TF-1-solujen proliferatiivisen vasteen IL-4:ää kohtaan, siten että IC_{50} on noin 0,1 nM –
 5 10 μ M, noin 0,5 nM – 1 μ M tai noin 1,0–100 nM.

47. Patenttivaatimuksen 44 mukainen muunnettu IL-4-muteiinireseptorin antagonistin inhiboi TF-1-solujen proliferatiivisen vasteen IL-13:a kohtaan, siten että IC_{50} on noin 0,1 nM:sta
 10 noin 10 μ M:iin, noin 0,5 nM:sta noin 1 μ M:iin tai noin 1,0–100 nM.

48. Patenttivaatimuksen 44 mukainen muunnettu IL-4-muteiinireseptorin antagonistin inhiboi humaani B-solujen proliferatiivisen vasteen IL-4:ää kohtaan, siten että IC_{50} on noin 0,1
 15 nM:sta noin 10 μ M:iin, noin 0,5 nM:sta noin 1,0 μ M:iin tai noin 1,0–100 nM.

49. Patenttivaatimuksen 44 mukainen muunnettu IL-4-muteiinireseptorin antagonistin inhiboi humaani T-solujen proliferatiivisen vasteen IL-4:ää kohtaan, siten että IC_{50} on noin 0,1
 20 nM:sta noin 10 μ M:iin, noin 0,5 nM:sta noin 1,0 μ M:iin tai noin 1,0–100 nM.

50. Patenttivaatimuksen 44 mukainen muunnettu IL-4-muteiinireseptorin antagonistin, **jolloin** muunnetulla IL-4-muteiinireseptorin antagonistilla puoliintumisaika plasmassa on ainakin noin 2–10 kertaa suurempi kuin
 25 muuntamattomalla IL-4-reseptorin antagonistilla.

51. Patenttivaatimuksen 44 mukainen muunnettu IL-4-muteiinireseptorin antagonistin, **jolloin** muunnettu IL-4-muteiinireseptorin antagonistin on kytketty polymeeriin, joka ei ole proteiini, aminohappotähteessä, asemassa 28, 36, 37, 38,
 30 104, 105 tai 106.

52. Patenttivaatimuksen 51 mukainen muunnettu IL-4-muteiinireseptorin antagonisti, **jolloin** aminohappotähde asemassa 28, 36, 37, 38, 104, 105 tai 106 on kysteini.

5 53. Menetelmä ihmisen sairauden hoitoon, johon sairauteen liittyy IL-4:n ja IL-13:n lisääntynyt aktiivisuus, **joka** menetelmä käsittää vaiheet, joissa
 a) edellytetään henkilöä, jolla on sairaus, jossa IL-4:n tai IL-13:n aktiivisuus on lisääntynyt, ja
 b) mainitulle henkilölle annetaan tehokas määrä patenttivaatimuksen mukaista
 10 muunnettua IL-4-muteiinireseptorin antagonistia.

54. Patenttivaatimuksen 53 mukainen menetelmä, **jolloin** sairaus on astma, krooninen ahtauttava keuhkosairaus tai näille läheisiä keuhkovaivoja.

15 55. Patenttivaatimuksen 54 mukainen menetelmä, **jolloin** krooninen ahtauttava keuhkosairaus on keuhkolaajentuma tai krooninen bronkiitti.

56. Farmaseuttinen koostumus, **joka** käsittää
 a) patenttivaatimuksen 43 mukaista muunnettua IL-4-muteiinireseptorin
 20 antagonistia ja
 b) farmaseuttisesti hyväksyttävää kantaja-ainetta.

57. Menetelmä ihmisen sairauden hoitoon, johon sairauteen liittyy IL-4:n ja IL-13:n lisääntynyt aktiivisuus, joka menetelmä käsittää vaiheet, **joissa**
 25 a) edellytetään henkilöä, jolla on sairaus, jossa IL-4:n tai IL-13:n aktiivisuus on lisääntynyt, ja
 b) mainitulle henkilölle annetaan tehokas määrä patenttivaatimuksen 56 mukaista farmaseuttista koostumusta.

30 58. Patenttivaatimuksen 57 mukainen menetelmä, **jolloin** sairaus on astma, krooninen ahtauttava keuhkosairaus tai näille läheisiä keuhkosairauksia.

59. Patenttivaatimuksen 58 mukainen menetelmä, **jolloin** ahtauttava keuhkosairaus on keuhkolaajentuma tai krooninen bronkiitti.

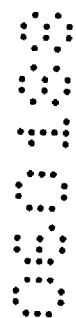
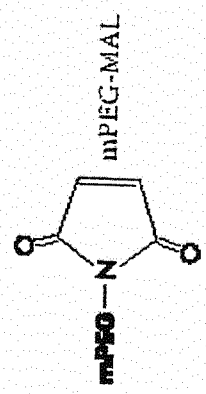
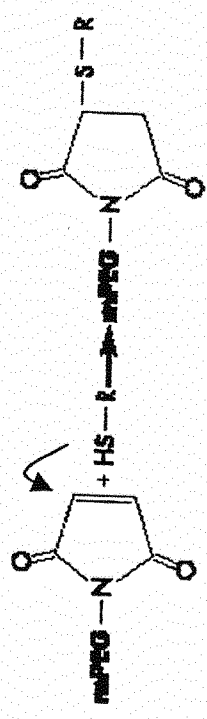


Figure 1

PEGylylaatioreaktion kemia



mPEG-MAL 22 kD
Lineaarinen PEG



PEGylylaatioreaktion kemia