(19) SUOMI - FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 970009 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS**
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE PUBLIC

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 970009

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification
C07K 14/54
C07K 7/06
C07K 16/34
A61K 38/20
A61K 39/395

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **07.06.1995**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **02.01.1997**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **04.03.1997**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - Internationell ansökan - International application **07.06.1995 PCT/DK1995/000227**

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

05.07.1994 DK 0800/94

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • **Steeno Research Group A/S,** Dunbirkevej 6 5250 Odense SV, Danmark, TANSKA, (DK)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • **Larsen, Christian Groenhoej,** Danmark, TANSKA, (DK)
2 • **Gesser, Borbala,** Danmark, TANSKA, (DK)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Immunomodulaattoreita

Immunomodulatorer

Immunomodulaattoreita

Keksinnön ala

Tämä keksintö koskee sellaisen aineen farmaseuttista käyttöä, joka on interleukiini-10:n (IL-10:n) agonisti, erityisesti keksinnön mukaisen aineen käyttöä farmaseuttisen koostumuksen valmistamiseksi sellaisten tautien ehkäisyä ja/tai hoitoa varten, joiden patogeneesi liittyy immunoinhibitoristen välittäjäaineiden, erityisesti sytokiinien, alentuneeseen tuottoon ja/tai toimintaan ja/tai liittyy tiettyjen immunoinflammatoristen välittäjäaineiden, erityisesti sytokiinien, lisääntyneeseen tuottoon ja/tai toimintaan. Erityisesti keksintö koskee keksinnön mukaisen aineen käyttöä farmaseuttisen koostumuksen valmistamiseksi autoimmuunitautien (diabetes mellitus, tyyppi I, ruoansulatuskanavan tulehdustaudit, reumatoidiartriitti), virtsahappoartriitin (kihdin), ihoallergian, ihon, keuhkojen ja ruoansulatuskanavan allergisten reaktioiden (mukaan lukien keuhkoastma), hypoksiasta/iskemiasta johtuvan kudosvaurion (infarkti, reperfuusio), ateroskleroosin, psoriasiksen, kroonisen granulomatoosin, kroonisen myeloidisen leukemian, akuutin myeloidisen leukemian, syövän, käänteishyljintäreaktion ("graft vs. host reaction") ja siirrännäisen hyljintään liittyvien tilojen, keuhkofibroosin, maksafibroosin, kroonisen ei-infektiivisen keuhkotulehduksen, glomerulonefriitin, ennenaikaisen synnytyksen, periodontiitin, virusinfektioista johtuvien tulehdustilojen, osteoporoosin, septisen sokin ehkäisyä ja/tai hoitoa varten ja/tai ehkäisyvalmisteen valmistamiseksi.

Keksinnön tausta

Tutkimus kahdelta viimeiseltä vuosikymmeneltä on osoittanut, että nisäkkäissä tulehdusreaktioden alkaminen, säätely ja loppuminen sekä myös kasvun ja erilaistumisen säätely on tietyn signaalipolypeptidien ryhmän, jota kutsutaan yleensä sytokiineiksi, tiukassa kontrollissa. Syto-

kiinit ovat polypeptidejä, joita useimmat tumalliset solut voivat tuottaa ja jotka välittävät säätelysignaaleja solujen välillä, muodostaen näin viestintäverkoston eliön saman- tai erityyppisten solujen välillä. Sytokiinit ovat äärimmäisen voimakkaita välittäjäaineita ja ovat aktiivisia niinkin pienissä konsentraatioissa kuin 10^{-15} M. Sytokiinit ovat myös avaintekijöitä solun immuunireaktioiden kehittymiselle, jotka puolestaan muodostavat perustan infektiosta, allergiasta, traumasta, käänteishyljintäreaktioista ja autoimmuunitaudeista johtuvan tulehduksen kliinisille ilmenemille. Allergia- ja autoimmuunitaudit selittyvät immuunijärjestelmän poikkeavuuksista, erityisesti T-lymfosyyttivälitteisessä immuniteetissa, mutta yleensä näiden tautien syyt ovat tuntemattomat. *In vitro* -tutkimukset, eläinkokeet ja kokeelliset kliiniset tutkimukset ovat osoittaneet sytokiineilla olevan tärkeitä patofysiologisia tehtäviä tulehdusreaktiossa, jotka liittyvät autoimmuunitauteihin, allergiaan, iskemiaan, reperfuusiovaurioon, traumaan, infektioon, ja ne ovat tärkeitä syövän, ateroskleroosin, raskauden ja sikiön kehitykselle, luun homeostaasille. Sytokiinit voivat olla mukana muissa immunoinflammatorisissa ja proliferatiivisissa taudeissa kuten seuraavassa kuvataan yksityiskohtaisemmin.

Kyseiset taudit ovat tavallisesti kroonisia ja hoito on lievittävää, ts. useimmat kyseisten tautien yhteydessä määrättävät lääkkeet kohdistuvat oireiden lievittämiseen eikä niillä tavallisesti ole parantavaa vaikutusta. Muita hoitoja ovat ns. korvaushoidot, joihin liittyy sellaisten aineiden, esim. hormonien, elämän loppuun kestävä antaminen potilaalle, joita tarvitaan johtuen kyseisen aineen vähentyneestä/riittämättömästä sisäisestä tuotannosta. Kyseiset hoidot ovat usein epätyydyttäviä, niihin liittyy ei-toivottuja ja usein vakavia sivuvaikutuksia, ja ne vain viivyttävät ennemmin kuin estävät taudin etenemis-

tä. Siten parannetut hoitomenetelmät ja parannetut farmaseuttiset koostumukset ovat erittäin tarpeellisia.

Interleukiini-10 (IL-10) on hiljattain kuvattu luonnollinen, endogeeninen immunosuppressiivinen sytokiini, joka on tunnistettu sekä hiiressä että ihmisessä. Hiiren interleukiini-10 (mIL-10) kuvattiin alunperin sytokiinisynteesiä estävänä tekijänä, jota vapautui TH_2-avustaja-T-solukloneista, mutta sillä on myös proliferatiivisia vaikutuksia moniin lymfosyyttien osajoukkoihin, mukaan luettuina vahvistava vaikutus hiiren pernan CD4-,8+-T-solujen kloonaustehokkuuteen (4). Ihmisen interleukiini-10 (hIL-10) on hiljattain sekvensoitu, ja sillä on osoittautunut olevan korkea homologia mIL-10:n kanssa DNA-sekvenssitasolla sekä myös aminohappotasolla. Lisäksi sian interleukiini-10 on hiljattain sekvensoitu, ja sillä on osoittautunut olevan korkea homologia ihmisen IL-10:n kanssa DNA-sekvenssitasolla sekä myös aminohappotasolla (88), katso myös kuvio 2. hIL-10:llä on myös korkea homologia Epsteinin-Barrin viruksen genomissa olevan avoimen lukukehyksen, BCRF1:n kanssa, ja viruksen IL-10:llä nähdään jonkin verran hIL-10:n kanssa samankaltaista aktiivisuutta, vrt. kuvio 1 (5).

Ihmisen IL-10:tä tuottavat aktivoidut T-solukloonit ja kuolemattomiksi tulleet B-solut, ja sen sytokiinisynteesiä inhiboivan tekijäaktiivisuuden (CSIF-aktiivisuuden), useiden pro-inflammatoristen sytokiinien ja kantasoluryhmiä stimuloivien tekijöiden tuotannon inhiboinnin, lisäksi se myös aiheuttaa mononukleaaristen solujen luonnollisen interleukiini-1-reseptoriantagonistiproteiinin/peptidin (IRAP) tuotannon, siten epäsuorasti inhiboiden IL-1-aktiivisuutta. IL-10 myös alasajaa oman tuotantonsa monosyyteissä ja inhiboi luokan II MHC-ekspressiota (12). Lisäksi hIL-10 vähentää ihmisen T-solujen ja CD4+-T-solukloonien antigeenispesifistä lisääntymistä, kun käytetään monosyyttejä antigeeniä esittelevinä soluina. *In vivo* -ko-

keet hiirissä viittaavat siihen, että *Leishmania*-infektion tulos riippuu vasteen antavan CD4+-T-lymfosyytin sytokiiniprofiilista (13). *Leishmania*-infektiolle resistenteissä C57BL/6-hiirissä kokoavien ("draining") imusolmukkeiden CD4+-T-soluissa nähdään IFN-γ- ja IL-2-sytokiinien ylösajo, kun taas herkissä BALB/c-hiirissä on niiden kokoavissa imusolmukkeissa CD4-positiivisia vasteen antavia T-soluja, jotka vapauttavat IL-4:ää ja IL-10:tä, minkä voitiin osoittaa korreloivan taudin etenemisen kanssa (13). Siten IL-10 voi kohdistaa voimakkaita säätelyvaikutuksia immunologisiin vasteisiin sekä *in vitro* että *in vivo*. Lisäksi IL-10 vaikuttaa voimakkaasti kemokiinien biologiaan, koska ihmisen interleukiini-10 on spesifinen kemotaktinen tekijä CD8+-T-soluja kohtaan, kun IL-10 suppressoi CD4+- mutta ei CD8+-T-solujen kykyä vaeltaa vasteena T-soluille kemotaktiselle sytokiinille IL-8:lle (14). IL-10 inhiboi myös muiden kemokiinien, MCP-1/MCAF:n ja RANTES:in kemotaktista vaikutusta (75). Koska IL-10 on monosyytti/makrofagitoimintojen deaktivaattori ja Th1-aktiivisuuden inhibiittori, lääkeaineilla, joilla on täysi tai osittainen IL-10:n kaltainen aktiivisuus, voi olla hoitava vaikutus taudeissa, joille on tunnusomaista epätasapaino sytokiinituotannossa ja/tai -aktiivisuuksissa.

Aikaisemmin on esitetty hIL-10:tä tai vIL-10:tä käsittävien farmaseuttisten koostumusten valmistamista ja hIL-10:n tai vIL-10:n käyttöä farmaseuttisten koostumusten valmistamiseksi erilaisten tilojen, kuten septinen tai toksinen sokki, reumatoidiartriitti, käänteishyljintä, kudoshyljintä, diabetes mellitus, autoimmuunihäiriöt, leukemia ja syöpä, hoitoa varten on esitetty esim. julkaisuissa WO93/02 693 ja WO94/04 180. Lisäksi IL-10:n antagonistit, esim. IL-10:een spesifisesti sitoutuvat vasta-aineet, on esitetty esim. julkaisuissa EP 405 980 ja WO94/06 473, ja on ajateltu, että tällaiset vasta-aineet

voisivat olla hyödyllisiä HIV-infektoituneiden potilaiden hoidossa.

Keksinnön yhteenveto

Tämän keksinnön mukaisesti on havaittu, että ainetta, joka on muu kuin ihmisen interleukiini-10, jolla on yksi tai useampi seuraavista ominaisuuksista:

a) indusoi inhibition ihmisen monosyyttien spontaanille IL-8:n tuotannolle,

b) indusoi inhibition ihmisen perifeerisen veren mononukleaaristen solujen (PBMC) IL-1β:lla indusoidulle IL-8:n tuotannolle,

c) indusoi ihmisen monosyyttien interleukiini-1-antagonistiproteiinin (IRAP) tuotannon,

d) indusoi ihmisen CD8+-T-lymfosyyttien kemotaktisen migraation *in vitro*,

e) epäherkistää ihmisen CD8+-T-soluja johtaen vasteen alenemiseen rhIL-10:lle,

f) suppressoi ihmisen CD4+-T-lymfosyyttien kemotaktista vastetta IL-8:lle,

g) suppressoi ihmisen monosyyttien kemotaktista vastetta MCAF:lle/MCP-1:lle,

h) ei inhiboi luokan II MHC-molekyylien ekspressiota ihmisen monosyyteissä, toisin kuin ihmisen IL-10,

i) indusoi viljeltyjen, normaalien ihmisen CD4+-T-solujen IL-4:n tuotannon,

j) vähentää TNFα:n tuotantoa ihmisen lymfosyyttien sekoitusreaktiossa ("mixed lymphocyte reaction"),

kuten polypeptidiä, joka käsittää aminohapposekvenssin Ala-Tyr-Met-Thr-Met-Lys-Ile-Arg-Asn, tai kyseisen sekvenssin (nonapeptidin, jolla on sekvenssihomologia hIL-10:n kanssa, nimeltään IT9302) analogia tai muunnosta ja näiden johdannaisia voidaan käyttää tulehdusprosessien tiettyjen muotojen estämiseen ja/tai hoitoon, erityisti sellaisten muotojen, jotka liittyvät immuuni- ja/tai hormonijärjestelmään. Ajatellaan (kuten seuraavassa immunologisten me-

kanismien kuvauksessa yksityiskohtaisesti kuvataan), että vaikutusmekanismi on immuunijärjestelmän välittäjäaineiden häirinnän kautta, erityisesti sytokiinien, kuten monokiinien, lymfokiinien, kemokiinien ja monokiinireseptoriantagonistien, ts. keksinnön mukainen aine häiritsee/suppressoi tiettyjen sytokiinien tuotantoa ja/tai toimintaa ja siten inhiboi kudosvaurioon johtavia patologisia prosesseja ja että keksinnön mukainen aine indusoi luonnollisten monokiinireseptoriantagonistien tuotannon siten häiriten/suppressoiden tiettyjen sytokiinien toimintaa ja siten inhiboi patologisia prosesseja, jotka johtavat kudosvaurioon.

Siten tämän keksinnön tärkeä suoritusmuoto koskee farmaseuttista koostumusta, joka käsittää vaikuttavana aineena keksinnön mukaisen aineen. Muita keksinnön suoritusmuotoja ovat aine, joka kykenee neutraloimaan yhden tai useamman edellä mainituista aktiivisuuksista a - g, esim. vasta-aine, ja tällaisen aineen sisältävä farmaseuttinen koostumus.

Vielä eräältä kannalta tämä keksintö koskee keksinnön mukaisen aineen käyttöä farmaseuttisen koostumuksen valmistamiseksi sytokiiniin liittyvän biologisen vaikutuksen oleellisesti inhiboimista varten, ts. keksinnön mukaisen aineen käyttöä IL-1-reseptoriantagonistiproteiinina/peptidinä, lymfokiininä, monokiininä, interleukiinina, interferonina, kemokiininä tai kantasoluryhmiä stimuloivana tekijänä. Eräs toinen puoli koskee keksinnön mukaisen aineen käyttöä farmaseuttisen koostumuksen valmistamiseksi sellaisen tilan ennaltaehkäisyä tai hoitoa varten, joka liittyy sytokiinijärjestelmän häiriöön, ts. IL-1-reseptoriantagonistiproteiini/peptidi-, lymfokiini-, monokiini-, interleukiini-, interferoni-, kemokiini- tai kantasoluryhmiä stimuloivan tekijän järjestelmän häiriöön. Eräältä toiselta puolelta keksintö koskee myös menetelmää, jolla hoidetaan ihmisessä tilaa, joka liittyy sytokiinijärjes-

telmän häiriöön, jolle menetelmälle on tunnusmerkillistä, että annetaan saajalle tehokas määrä keksinnön mukaista ainetta.

Soluvälitteinen immuunijärjestelmä ottaa osaa sellaisten häiriöiden kehittymiseen kuin infektio-, tulehdus- ja neoplasiataudit. Immunokompetenteilla soluilla ja niiden tuotteilla voi olla tärkeitä tehtäviä tulehdustilojen alkamisessa, etenemisessä ja mahdollisessa kroonistumisluonteessa. Näille häiriöille ei usein tunneta syitä, ja niihin kuuluu yleisiä tauteja, kuten diabetes mellitus, reumatoidiartriitti, ruoansulatuskanavan ja ihon tulehdustaudit. Näiden esimerkkien lisäksi soluvälitteinen immuniteetti tai proinflammatoriset välittäjäaineet kuitenkin myötävaikuttavat moniin muihin tulehdus- ja proliferaatiotauteihin (ks. taulukko 2).

Taulukko 2

Joitakin tauteja, joissa makrofagi/T-lymfosyyttivälitteisiä immuunireaktioita pidetään patogeneettisesti tärkeinä

Ihotauteja:

Psoriasis
Atooppinen dermatiitti
Kontaktidermatiitti
Ihon T-solulymfooma (CTCL)
Sezaryn oireyhtymä
pemfigus
pemfigoidi
Erythema nodosum
Skleroderma

Autoimmunitauteja (mukaan luettuina reumataudit):

Silmän keskikalvontulehdus
Bechetin tauti
Boeckin sarkoidoosi
Sjögrenin oireyhtymä

Reumatoidiartriitti
Juveniili artriitti
Reiterin oireyhtymä
Kihti
Osteoartroosi
Systeeminen lupus erythematosis
Polymyosiitti
Myokardiitti
Primaarinen biliaarikirroosi
Crohnin tauti
Ulseratiivinen koliitti
Multippeliskleroosi ja muut demyelinoivat taudit
Aplastinen anemia
Idiopaattinen trombosytopeeninen purppura
Multippelimyelooma ja B-solulymfooma
Simmonsin panhypopituitarismi
Gravesin tauti ja Gravesin oftalmopatia
Subakuutti tyreoidiitti ja Hashimoton tauti
Addisonin tauti
Insuliinista riippuva diabetes mellitus (tyyppi 1)

Muita tauteja:

Useat kliiniset oireyhtymät, joissa on mukana vaskuliitti (esim. polyarteritis nodosa, Wegenerin granulomatoosi, jättisoluarteriitti
Kuume, pahoinvointi
Anoreksia (esim. akuuteissa ja kroonisissa tulehdus- ja infektiotaudeissa)
Disseminoitunut intravaskulaarinen koagulaatio (DIC)
Arterioskleroosi (ateroskleroosi)
Sokki (esim. gram-negatiivisessa sepsiksessä)
Kakeksia (esim. syövässä, kroonisissa infektio- ja kroonisissa tulehdustaudeissa)
Siirrännäisen hyljintä ja käänteishyljintä

Sytokiinit

T-lymfosyytit ovat avainosassa soluvälitteisten immuunireaktioiden induktiossa ja säätelyssä, ja T-solujen sytokiinituotteet (lymfokiinit) aloittavat immuunivasteen ja säätelevät sitä (1,2). Antigeenejä esittelevien solujen tuottamat lymfosyyttejä aktivoivat välittäjäaineet (lymfokiinit) kuuluvat sytokiineiksi kutsuttuun polypeptidien ryhmään. Sytokiinit ovat solujenvälisen viestinnän välittäjiä sekä fysiologisissa että patofysiologisissa tiloissa, ja ne voivat toimia myös hormoneina tuoden tarjolle signaaleja immuunijärjestelmän ja muiden kudosten ja elinten välillä. Myös immuunijärjestelmän ulkopuoliset solut voivat tuottaa sytokiinejä, ja yleisesti uskotaan, että kaikki tumalliset solut kykenevät tuottamaan yhtä tai useita sytokiinejä. Siten esim. keratinosyytit ja fibroblastit ovat voimakkaita sytokiinien tuottajia, ja tässä järjestelmässä sytokiinit voivat toimia autokriinisinä tai parakriinisinä hormoneina immuunijärjestelmästä riippumattomasti (3).

Interleukiini-10

Hiiren interleukiini-10 (mIL-10) kuvattiin alunperin TH_2-auttaja-T-solukloonien vapauttamana sytokiinien synteesiä inhiboivana tekijänä (CSIF), mutta sillä on myös proliferatiivisia vaikutuksia moniin lymfosyyttien osajoukkoihin, mukaan luettuna vahvistava vaikutus hiiren pernan CD4-,8+-T-solujen kloonaustehokuuteen (4). Ihmisen interleukiini-10 (hIL-10) on hiljattain kuvattu (5), ja sillä on korkea homologia Epsteinin-Barrin viruksen genomissa olevan avoimen lukukehyksen, BCRF1:n kanssa, ja viruksen IL-10:llä nähdään jonkin verran hIL-10:n kanssa samankaltaista aktiivisuutta. Seuraavassa esitetään yhteenveto IL-10:n biokemiallisista, biologisista, fysiologisista ja mahdollisista patofysiologisista rooleista.

IL-10:n rakenne

Hiiren (mIL-10) ja ihmisen IL-10:n (hIL-10) primaarirakenteista nähtiin korkea-asteinen nukleotidisekvenssihomologia (> 80 %) koko niiden pituudelta (4, 5). Ainoa merkittävä ero on ihmisen Alu-toistosekvenssijakson insertio hIL-10:n cDNA-kloonin 3'-pään polypeptidin tuotantoon osallistumattomassa alueessa. mIL-10:n ja hIL-10:n cDNA:t koodittavat hyvin samankaltaiset 178 aminohapon avoimet lukukehykset (ORF:it), joihin sisältyy hydrofobiset signaalisekvenssit ja jotka vastaavat 73 %:n aminohappohomologiaa. mIL-10, joka on aktiivinen hiiren solujen suhteen, ei ristireagoi merkittävästi ihmisen solujen suhteen. hIL-10 on 18 kDa polypeptidi, jossa ei ole havaittavasti hiilihydraattia, mutta mIL-10 on N-glykosyloitunut sellaiseen kohtaan, lähellä sen N-päätä, joka hIL-10:stä puuttuu. Sekä mIL-10:tä että rekombinantti-hIL-10:tä (rhIL-10:tä) ekspressoidaan ei-kovalenttisina homodimeereinä. Missä määrin mIL-10- ja hIL-10-monomeerit ovat biologisesti aktiivisia, ei ole vielä varmaa. mIL-10:llä ja hIL-10:llä, joissa on N-päässä ainakin 8 aminohapon ja C-päässä 21 aminohapon polypeptidi-"merkki" ("tag"), ei nähty havaittavaa aktiivisuuden menetystä Mooren ym., jotka olivat ensimmäiset ihmisen IL-10:n sekvensoineet, julkaisun mukaan (6). Koko IL-10:n C- ja N-pään merkitseminen ei välttämättä aiheuta toiminnallisia muutoksia, koska merkitseminen on satunnaista. Suuri määrä mahdollisia aminohappo-substituutioita, kuten edempänä tarkemmin kuvataan, voisi myös selittää samaan aikaan kun ("while") merkitsemisellä jäi näkymättä toimintojen puuttuminen. Rekombinanttisia mIL-10:tä ja hIL-10:tä on ekspressoitu CDS7-soluissa, hiiren myeloomasoluissa, kiinanhamsterin munasarjasoluissa, bakuloviruseksprессiosysteemissä ja *E. coli*ssa. Näiden rIL-10-proteiinien biologiset aktiivisuudet ovat toistaiseksi toisistaan erottumattomat (6).

mIL-10-geeni käsittää viisi eksonia, jotka ovat järjestyneet noin 5,1 kb:n DNA-alueelle. Itse genominen klooni koodittaa ekspressoitavaa mIL-10-proteiinia. mIL-10- ja hIL-10-geenit ovat hiiren ja ihmisen kromosomissa 1 (6, 7).

mIL-10:llä ja hIL-10:llä nähdään voimakas DNA- ja aminohapposekvenssihomologia Epsteinin-Barrin viruksen genomissa olevan avoimen lukukehyksen, BCRF1:n kanssa, ja homologia rajoittuu kypsää proteiinia koodittavaan sekvenssiin, eikä sitä havaita signaalisekvenssissä eikä 5'- tai 3'-pään sekvensseissä, joista ei tuoteta polypeptidiä (5). Näistä kolmesta sekvenssistä mIL-10 ja hIL-10 ovat läheisintä sukua oleva pari DNA-sekvenssitasolla (81 %), kun taas kypsiä hIL-10:tä ja BCRF1-proteiineja koodittavilla sekvensseillä on 71 %:n homologia. Homologia hIL-10:n ja B CRF1:n välillä on 84 % aminohappotasolla. Otaksutaan, että mIL-10- ja hIL-10-geenit ovat kehittyneet yhteisestä edeltäjästä, kun taas BCRF1 edustaa vanhakantaista, prosessoitua, kiinni saatua solun sytokiinin geeniä, ja että BCFR1-proteiinilla on ollut rajoituksena muistuttaa hIL-10:tä. BCFR1:tä ekspressoidaan EBV:n lyyttisen syklin aikana. BCFR1:n ORF koodittaa 17 kDa eritettävää polypeptidiä, jossa, kuten hIL-10:ssä, on vain vähän tai ei lainkaan glykosylaatiota. BCFR1:llä nähdään joitakin IL-10:n aktiivisuuksia, ja sitä on kutsuttu virus-IL-10:ksi (vIL-10:ksi), vaikka sen aktiivisuuden on havaittu olevan 10 % hIL-10:stä.

IL-10:n aktiivisuus sytokiinien tuottoon

hIL-10 inhiboi joukon sytokiinejä tuotantoa monosyyteissä/makrofaageissa ja/tai T-lymfosyyteissä, mukaan luettuina interferoni-γ (IFN-γ), tuumorinekroositekijä-α (TNF-α), granulosyytti-makrofagikantasoluryhmiä stimuloiva tekijä (GM-CSF), granulosyytti-CSF (G-CSF), IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-6, IL-8 ja monosyyttien kemotaktinen polypeptidi 1 (MCP-1/MCAF) (4, 5). IL-10 myös inhiboi monosyyttien

kykyä kulkeutua vasteena kemokiini MCP-1/MCAF:lle (75). Lisäksi hIL-10 indusoi endogeenisen, luonnollisen interleukiini-1-reseptoriantagonistin (IRAP) tuotannon (6), joka inhiboi IL-1α:aa ja IL-1β:aa kilpailemalla reseptoriin sitoutumisesta. Koska IL-8 on vahvasti indusoitavissa oleva IL-1α:lla ja IL-1β:lla, IL-10 aikaansaa osan sen IL-8:n tuotantoa inhiboivasta vaikutuksesta stimuloimalla IL-1-reseptoriantagonistin (IRAP) tuotantoa. Tämä viimemainittu mekanismi on huomattavan tärkeä tälle keksinnölle, kuten seuraavassa kuvataan ja esimerkein valaistaan. IRAP:illa on anti-inflammatorisia aktiivisuuksia (9), ja sen hoitavaan vaikutukseen reumatoidiartriitissa on viitattu (10). IRAP osoittautui tehokkaaksi myös sepsisoireyhtymän hoidossa, ja annoksesta riippuva 28 päivän hengissäpysymisetu liittyi IRAP-hoitoon ($p = 0,015$) Fisherin ym. tutkimuksessa (11). IRAP voi aikaansaada osan sen anti-inflammatorisista vaikutuksista inhiboimalla kemokiinien tuotantoa, kuten IL-8:n tuotantoa.

IL-10 ja antigeeniekspressio

IL-10 inhiboi luokan II MHC:n ekspressiota ihmisen monosyyteissä (8). HLA-DR/DP:n ja DQ:n konstitutiivinen ja IL-4:llä tai IFN-γ:lla indusoitu ekspressio inhiboitui hIL-10:llä (12). Lisäksi monosyytteihin, joita on esi-inkuboitu IL-10:n kanssa, ei sen jälkeen tehoa luokan II MHC:n ekspression induktio IL-4:llä tai IFN-γ:lla. IL-10 inhiboi luokan II ekspressiota ihmisen monosyyteissä LPS:llä aktivaation jälkeen (12, 76). BALB/c-hiiret, joille annettiin 1 - 10 mg IL-10:tä yhdessä tappavan LPS-annoksen kanssa, olivat kuolemalta suojassa (6).

IL-10 inhiboi typpivälituotteita ja superoksidianioneja. IL-10 inhiboi myös makrofagien reaktiivista typpivälituotetta (NO) sekä myös reaktiivisia happivälituotteita (H_2O_2) IFN-γ:lla aktivoinnin jälkeen (13).

IL-10 ja T-soluaktiivisuus

IL-10:llä on myös moduloivia vaikutuksia T-solujen toimintoihin/aktiivisuuteen. Siten hIL-10 on voimakas kemotaktinen tekijä CD8+-T-lymfosyyteille, kun taas hIL-10:llä ei nähdä kemotaksista CD4+-T-solujen suhteen (14). Lisäksi IL-10 suppressoi CD4+-T-solujen kykyä antaa vaste β-kemokiinille RANTES sekä myös α-kemokiinille IL-8. hIL-10 inhiboi myös suoraan ihmisen perifeerisen veren T-solujen ja CD4+-T-solukloonien lisääntymistä (14).

IL-10 ja B-lymfosyytit

hIL-10 kostimuloi B-solujen lisääntymistä, joka on indusoitu verkkouttamalla pinta-Ig immobilisoidulla anti-IgM-vasta-aineella, ja tämä vaikutus tehostuu, kun B-solu ja on stimuloitu verkkouttamalla niiden CD40-antigeeni CD40-vasta-aineella ja hiiren L-soluilla, jotka ekspressoivat ihmisen FcγRII:ta/CD32:ta (15). IL-10:n vaikutus aktivoitujen ihmisen B-solujen lisääntymiseen ja erilaistumiseen viittaa siihen, että tämä sytokiini voi paljolti selittää ihmisen hIL-10:tä ekspressoivien T-solujen paremman kyvyn tarjota apua B-soluvasteille.

IL-10 homeostaattisena tekijänä immuunijärjestelmälle

IL-10:n edellä mainittujen toimintojen fysiologisten seurausten uskotaan olevan tietynasteinen homeostaasi immuunijärjestelmään. Siten IL-10 selvästi inhiboi auttaja-T-solutoimintoja ja luultavasti stimuloi T-soluja, joilla on suppressoritoimintoja. Siksi IL-10:n uskotaan IL-4:n tavoin säätelevän tasapainoa T-solujen Th1- ja Th2-sytokiiniprofiilien välillä. Erityisesti uskotaan IL-10:n inhiboivan Th1-solujen erilaistumista. Koska Th1-soluille on tunnusmerkillistä sellaisten sytokiinien (IFN-γ ja IL-2) tuotanto, jotka suosivat soluvälitteisiä immuunivasteita, kun taas Th2-solut tuottavat sellaisia sytokiinejä (IL-4, IL-5 ja IL-10), jotka suosivat humoraalista vastetta ja suppressoivat soluvälitteistä immuunivastetta, IL-10

todennäköisesti suppressoi T-soluvälitteistä immuunireaktiota, kuten viivästyneen tyyppisiä yliherkkyysreaktioita, kun taas se suosii humoraalisia vasteita.

Seurauksena IL-10:n edellä mainituista piirteistä, IL-10:n aktiivisuutta on kuvattu makrofagien ja Th1:ien sytokiinisynteesin inhibiittorina. Siksi on tutkittu, oli siko IL-10:n tuotannon ja/tai aktiivisuuden puuttumisella osuutta taudeissa, joissa tehostuneella soluvälitteisellä immuunireaktiivisuudella uskotaan olevan osuus taudissa, kuten autoimmuunitaudeissa ja tulehduksessa. IL-10-vasta-aineella käsitellyissä hiirissä nähdään voimakkaampi tulehdusvaste monokiineillä indusoituun tulehdukseen, ja ne ovat merkitsevästi herkempiä kuolemalle, jonka aiheuttaa LPS:llä indusoitu septinen sokki, monokiinivälitteinen tulehdusreaktio (16). Myös hiirillä, joilta on poistettu IL-10-geeni, kehittyy spontaanisti suoliston tulehdusreaktioita, jotka ovat samankaltaisia kuin colitis ulcerosa (17). Lisäksi on tutkittu, onko IL-10:llä osuutta erilaisissa parasiitti-, mykobakteeri- ja virusinfektioissa, ja IL-10:llä on osoitettu olevan patofysiologinen rooli *Schistosoma mansoni* -infektioon liittyvässä immuunipareesissa (18). Myös osuutta *Mycobacterium leprae* -infektioissa on esitetty. Hiljattain on havaittu, että AIDS-potilailla, joilla on huono ennuste, on korkeampi IL-10-taso plasmassa, ja on esitetty, että tämä myötävaikuttaa immuunipareesiin, joka AIDS:sta tunnetaan (19).

Hoidollisia näkökohtia

Nämä *in vivo* -tulokset viittaavat voimakkaasti IL-10:n homeostaattiseen rooliin soluvälitteisen ja monokiinivahvisteisen immuunitulehduksen säätelyssä ja osoittavat IL-10:n tai lääkeaineen, jolla IL-10:n kaltainen aktiivisuus, laaja-alaiset hoitosovellukset sellaisten tautien hoidossa, joille on tunnusmerkillistä IL-10:n vähentynyt/riittämätön tuotanto ja/tai aktiivisuus. Koska

tämän keksinnön mukainen aine, josta IT9302 on esimerkki, osoittaa IL-10:n kaltaista aktiivisuutta

1) indusoimalla ihmisen monosyyttien IRAP:in tuotannon,

2) inhiboimalla ihmisen monosyyttien sopontaania IL-8:n tuotantoa,

3) inhiboimalla perifeerisen veren mononukleaaristen solujen (PBMC) IL-1β:lla stimuloitua IL-8:n tuotantoa,

4) stimuloimalla CD8-positiivisten, mutta ei CD4-positiivisten ihmisen T-lymfosyyttien kemotaktista migraatiota,

5) epäherkistämällä ihmisen CD8+-T-soluja johtaen vasteen alenemiseen rhIL-10:lle,

6) inhiboimalla IL-8-välitteistä ihmisen CD4+-T-solujen kemotaksista, ja

7) inhiboimalla MCP-1/MCAF-välitteistä ihmisen monosyyttien kemotaksista,

8) indusoimalla viljeltyjen, normaalien ihmisen CD4+-T-solujen IL-4:n tuotannon,

9) vähentämällä TNFα:n tuotantoa ihmisen leukosyyttien sekoitusreaktiossa,

tällä polypeptidillä ja sen analogeilla voi siten olla samat hoitomahdollisuudet kuin hIL-10:llä. Taulukko 3 luettelee joitakin tauteja, joissa IL-10:n kaltainen immunomodulaattori tai immunomodulaattori, jolla on IL-10:n kaltainen aktiivisuus, voi olla tärkeä hoidossa:

Taulukko 3

Joitakin tauteja, joissa immunomodulaattori, jolla on IL-10:n kaltainen aktiivisuus, sen IRAP:n tuotannon induktion ja/tai sytokiinituotannon ja/tai -aktiivisuuden inhibition takia voi olla tärkeä hoidossa (viitteet 20 - 74)

Infektion tai muiden tilojen aiheuttama ennenaikainen synnytys

Reumatoidiartriitti

Lymen artriitti
Kihti
Sepsisoireyhtymä
Hypertermia
Ulseratiivinen koliitti tai enterokoliitti
Osteoporoosi
Sytomegalovirus
Periodontaalisairaudet
Glomerulonefriitti
Keuhkojen krooninen, ei-infektiivinen tulehdus (esim. sarkoidoosi ja tupakoijan keuhkot)
Granulooman muodostuminen
Maksan fibroosi
Keuhkojen fibroosi
Siirrännäisen hyljintä
Käänteishyljintä
Krooninen myeloidinen leukemia
Akuutti myeloidinen leukemia
Muut neoplastiset taudit
Keuhkoastma
Diabetes mellitus, tyyppi I (insuliinista riippuva)
Arterioskleroosi/ateroskleroosi
Psoriasis
Krooninen B-lymfosyyttileukemia
CVI-tauti ("common variable immunodeficiency")
Sivuvaikutukset käytettäessä muita biologisen vasteen muuttajia
Disseminoitunut intravaskulaarinen koagulaatio
Systeeminen skleroosi
Enkefalomyeliitti
Keuhkotulehdus
Hyper-IgE-oireyhtymä
Enterokoliitti
Syövän etäpesäke ja kasvu
Adoptiivinen immuuniterapia

Hankittu hengitysvaikeusoireyhtymä
Sepsis
Reperfuusio-oireyhtymä
Leikkauksen jälkeinen tulehdus
Elinsiirto
Alopekia

Keksinnön yksityiskohtainen kuvaus

IL-10:n kanssa homologisen nonapeptidin, jolla on IL-10:n kaltainen aktiivisuus, kehittäminen

Osittaisia hIL-10:n sekvenssejä, joiden pituus oli 9 aminohappoa, valittiin sillä periaatteella, että sekvensseissä pitäisi olla korkea homologia vIL-10:n ja hIL-10:n kanssa, mutta mahdollisimman alhainen homologia mIL-10:n kanssa. Tämä strategia perustui siihen, että vIL-10 ristireagoi osittain hIL-10:n kanssa, kun taas mIL-10 ei ristireagoi hIL-10:n kanssa (ks. edeltä). Siispä hIL-10:n sekvenssit, jotka vastaavat tietyista aktiivisuuksista ihmisessä, saattavat sijaita alueissa, joissa on korkea homologia hIL-10:n ja vIL-10:n välillä mutta alhainen suhteessa mIL-10:een.

hIL-10:n signaalipeptidin oletetaan koostuvan ensimmäisistä 18 aminohaposta. Kypsä proteiini alkaa aminohaposta nro 19 (nro 1 toimivassa proteiinissa, joka on seriini), ja koko proteiini sisältää 160 aminohappoa. Katsomalla ihmisen ja viruksen IL-10:n COOH-terminaalisia sekvenssejä ja varsinkin asemia 157 ja 159, jotka sisältävät lysiini- ja arginiinitähteet, tämän alueen havaittiin olevan otollinen olemaan osaksi vastuussa reseptoriin sitoutumisesta. (Kuviot 1 ja 2).

Kun oli seulottu useita kemiallisella synteesillä saatuja kandidaatteja IL-10-aktiivisuuden suhteen, havaittiin, että synteettisellä nonapeptidillä IT9302 oli joitakin immunosuppressiivisia aktiivisuuksia, jotka jäljittelevät hIL-10:n ominaisuuksia, kuten seuraavissa esimer-

keissä yksityiskohtaisemmin kuvataan. IT9302 vastaa hIL-10:n C-terminaalisesta päästä olevaa nonapeptidisekvenssiä, jolla on seuraava aminohapposekvenssi:

NH_2-Ala-Tyr-Met-Thr-Met-Lys-Ile-Arg-Asn-COOH (sekvenssi nro 1)

IT9302:lla on 100 %:n homologia hIL-10:n C-terminaalisessa päässä aminohappoja 152 - 160 vastaavan segmentin kanssa. Lisäksi tällä polypeptidisekvenssillä on 6 aminohappoa yhteistä viruksen vIL-10:n kanssa vastaavalla alueella, ks. kuviot 1 ja 2, mikä tarkoittaa, että kuusi yhdeksästä eli 66 % aminohapoista on homologisia tässä määritellyn mukaisesti, ja 4 aminohappoa on yhteistä mIL-10:n kassa, ts. neljä yhdeksästä eli 44 %. Tämä nonapeptidi on ainoa hIL-10:stä saatu tai johdettu ja tähän hetkeen mennessä tutkittu sekvenssi, jolla on esimerkeissä osoitetut erityisominaisuudet. Ennen kuin tämän keksinnön keksijät sitä pohtivat, kukaan ei ollut viitannut tähän sekvenssiin funktionaalisena alueena.

Laajimmassa mielessään tämä keksintö siis koskee ainetta, jolla nähdään hIL-10-agonistiaktiivisuus, ts. ainetta, joka ei ole ihmisen interleukiini-10, ja jolla on yksi tai useampi seuraavista ominaisuuksista:

a) indusoi inhibition ihmisen monosyyttien spontaanille IL-8:n tuotannolle,

b) indusoi inhibition ihmisen perifeerisen veren mononukleaaristen solujen (PBMC) IL-1β:lla indusoidulle IL-8:n tuotannolle,

c) indusoi ihmisen monosyyttien interleukiini-1-resptoriantagonistiproteiinin (IRAP) tuotannon,

d) indusoi ihmisen CD8+-T-lymfosyyttien kemotaktisen migraation *in vitro*,

e) epäherkistää ihmisen CD8+-T-soluja johtaen vasteen alenemiseen rhIL-10:lle,

f) suppressoi ihmisen CD4+-T-lymfosyyttien kemotaktista vastetta IL-8:lle,

g) suppressoi ihmisen monosyyttien kemotaktista vastetta MCAF:lle/MCP-1:lle,

h) ei inhiboi luokan II MHC-molekyylien ekspressiota ihmisen monosyyteissä, toisin kuin ihmisen IL-10,

i) indusoi viljeltyjen, normaalien ihmisen CD4+-T-solujen IL-4:n tuotannon,

j) vähentää TNFα:n tuotantoa ihmisen lymfosyyttien sekoitusreaktiossa.

Näistä aktiivisuuksista ainutlaatuisimpia katsotaan olevan d - g. Eräs tärkeä keksinnön suoritusmuoto on aine, jolla nähdään edellä määritellyn mukainen hIL-10-agonistiaktiivisuus ja joka käsittää aminohapposekvenssin Ala-Tyr-Met-Thr-Met-Lys-Ile-Arg-Asn tai kyseisen sekvenssin analogin tai variantin. Tämä sekvenssi ja kaikki muut polypeptidisekvenssit tässä patenttijulkaisussa ja patenttivaatimuksissa ovat, myös silloin, kun sitä ei erikseen mainita, tavanomaisessa muodossa N-terminaalista C-terminaaliin kirjoitettuja.

Nonapeptidi IT9302 on erittäin voimakas indusoimaan eri toimintoja, ja se on erittäin stabiili, ja oletetaan, ettei se kykene liittymään väärin reseptoreihin. Nonapeptidi on valittu, koska yleensä 9 aminohapon polypeptidisekvenssi on ainutkertainen proteiinille. Kuitenkin on huomattava, että hIL-10:n aivan päässä olevat 6 aminohappoa vaikuttavat olevan tärkeimmät. Siten tämän keksinnön suojapiiriin kuuluu aine tai polypeptidi, joka käsittää osasekvenssin aminohapposekvenssistä Ala-Tyr-Met-Thr-Met-Lys-Ile-Arg-Asn (sekvenssi nro 1).

Pidetään todennäköisenä, että joillakin aminohapposubstituutioilla ei ole haitallisia vaikutuksia tässä määritellyn mukaiseen hIL-10-agonistiaktiivisuuteen, kunhan vain treoniini, lysiini ja arginiini ovat mukana yhden aminohapon välein.

Eräältä kannalta tämä keksintö siis koskee polypeptidiä, jolla on kaava

Thr-X_4-Lys-X_5-Arg-X_6 (sekvenssi nro 19)

jossa

X_4 ja X_5 voivat olla toisistaan riippumatta Met, Ile, Leu tai Val, ja

X_6 voi olla Asn, Asp, Gln tai Glu, sillä edellytyksellä, että polypeptidi ei ole Thr-Met-Lys-Ile-Arg-Asn.

Eräältä toiselta kannalta tämä keksintö koskee polypeptidiä, jolla on kaava

X_3-Thr-X_4-Lys-X_5-Arg-X_6 (sekvenssi nro 20)

jossa

X_3, X_4 ja X_5 voivat olla toisistaan riippumatta Met, Ile, Leu tai Val, ja

X_6 voi olla Asn, Asp, Gln tai Glu.

Vielä eräältä toiselta kannalta tämä keksintö koskee polypeptidejä, joilla on kaava

X_2-X_3-Thr-X_4-Lys-X_5-Arg-X_6 (sekvenssi nro 21)

jossa

X_2 on Tyr tai Phe,

X_3, X_4 ja X_5 voivat olla toisistaan riippumatta Met, Ile, Leu tai Val, ja

X_6 voi olla Asn, Asp, Gln tai Glu.

Keksinnön edulliset suoritusmuodot ovat polypeptidejä, joilla on kaava

X_1-X_2-X_3-Thr-X_4-Lys-X_5-Arg-X_6 (sekvenssi nro 22)

jossa

X_1 on Ala tai Gly,

X_2 on Tyr tai Phe,

X_3, X_4 ja X_5 voivat olla toisistaan riippumatta Met, Ile, Leu tai Val, ja

X_6 voi olla Asn, Asp, Gln tai Glu.

Siten tämä keksintö koskee ainetta tai polypeptidiä, joka käsittää edellä määritellyn mukaisen aminohapposekvenssin, sillä edellytyksellä, että aine tai polypeptidi ei ole ihmisen IL-10.

Esimerkkejä spesifisistä polypeptideistä, joilla oletetaan olevan edellä määritellyn mukaista hIL-10-agonistiaktiivisuutta, ovat seuraavat:

1. NH_2-Ala-Tyr-Met-Thr-Ile-Lys-Met-Arg-Asn-COOH (sekvenssi nro 2)
2. NH_2-Ala-Phe-Met-Thr-Leu-Lys-Leu-Arg-Asn-COOH (sekvenssi nro 3)
3. NH_2-Ala-Tyr-Met-Thr-Met-Lys-Val-Arg-Glu-COOH (sekvenssi nro 4)
4. NH_2-Gly-Tyr-Met-Thr-Met-Lys-Ile-Arg-Asp-COOH (sekvenssi nro 5)
5. NH_2-Ala-Phe-Met-Thr-Met-Lys-Ile-Arg-Asp-COOH (sekvenssi nro 6)
6. NH_2-Ala-Tyr-Ile-Thr-Met-Lys-Ile-Arg-Asp-COOH (sekvenssi nro 7)
7. NH_2-Ala-Tyr-Leu-Thr-Met-Lys-Ile-Arg-Asp-COOH (sekvenssi nro 8)
8. NH_2-Ala-Tyr-Val-Thr-Met-Lys-Ile-Arg-Asp-COOH (sekvenssi nro 9)
9. NH_2-Ala-Tyr-Met-Thr-Ile-Lys-Ile-Arg-Asp-COOH (sekvenssi nro 10)
10. NH_2-Ala-Tyr-Met-Thr-Leu-Lys-Ile-Arg-Asp-COOH (sekvenssi nro 11)
11. NH_2-Ala-Tyr-Met-Thr-Val-Lys-Ile-Arg-Asp-COOH (sekvenssi nro 12)
12. NH_2-Ala-Tyr-Met-Thr-Met-Lys-Ile-Arg-Asp-COOH (sekvenssi nro 13)
13. NH_2-Ala-Tyr-Met-Thr-Met-Lys-Met-Arg-Asp-COOH (sekvenssi nro 14)
14. NH_2-Ala-Tyr-Met-Thr-Met-Lys-Val-Arg-Asp-COOH (sekvenssi nro 15)
15. NH_2-Ala-Tyr-Met-Thr-Met-Lys-Ile-Arg-Gln-COOH (sekvenssi nro 16)
16. NH_2-Ala-Tyr-Met-Thr-Met-Lys-Ile-Arg-Glu-COOH (sekvenssi nro 17)

Vertailun vuoksi syntetisoitiin toinen nonapeptidi nimeltään IT9301, jolla oli 100 %:n homologia hIL-10:n sekvenssin kanssa. Tämä polypeptidi, IT9301, vastaa hIL-10:n N-terminaalista alkavaa nonapeptidisekvenssiä (aminohapot nro 19 - 27, ts. kypsän proteiinin 9 ensimmäistä aminohappoa), ja sillä on seuraava sekvenssi:

NH_2-Ser-Pro-Gly-Gln-Gly-Thr-Gln-Ser-Glu-COOH (sekvenssi nro 18)

Tällä polypeptidillä ei nähty IL-10:n kaltaista aktiivisuutta käyttäen edempänä kuvattavia menetelmiä, ja se valittiin vain siksi, että se on hIL-10:n toisessa päässä, ja enimmäkseen se toimi negatiivisten tulosten kontrollina. Sillä ei ole C-terminaalisen sekvenssin ominaispiirteitä mitä tulee sekvenssihomologiaan vIL-10:n kanssa ja reseptoriinsitoumiselle otollisiin aminohappoihin. IT9301 testattiin IL-8:n tuotannon IL-1β:lla indusoidussa perifeerisen veren mononukleaaristen solujen systeemissä, mutta se ei aiheuttanut lainkaan inhibitiota IL-8:n tuotannolle soluista.

Tämän keksinnön mukaisesti termi "keksinnön mukainen hIL-10:n agonistiaine" käsittää minkä tahansa farmaseuttisesti aktiivisen ja soveliaan yhdisteen, joka on IT9302:n kanssa identtinen tai rakenteeltaan samankaltainen ja jolla nähdään IT9302:n toimintojen kanssa samankaltaiset relevantit biologiset toiminnot, mukaan luettuina IT9302:n johdannaiset, erityisesti IT9302:n tai IT9302-johdannaisten, mukaan luettuina peptidomimeetit, farmaseuttisesti soveliaat suolat, esterit ja solvaatit, sekä myös konjugaatit. IT9302:n kovalenttinen kytkeminen NH_2-päästään sopiviin kantajiin, esim. polyetyleeniglykoliin tai sokeriin, saattaa pidentää polypeptidin puoliintumisaikaa *in vivo*.

Seuraavia määritelmiä käytetään tässä tekstissä:

"Sytokiini" on yleistermi proteiinivälittäjäaineelle, jota vapauttaa pääasiassa mutta ei yksinomaisesti immuunijärjestelmän solupopulaatio vasteena spesifiselle stimuloivalle aineelle, esim. spesifiselle antigeenille tai alloantigeenille, tai ei-spesifiselle polyklonaaliselle aktivaattorille, esim. endotoksiinille tai muille gramnegatiivisen bakteerin soluseinän komponenteille.

"Lymfokiini" on yleistermi proteiinivälittäjäaineelle, jota vapauttavat herkistyneet lymfosyytit vasteena stimuloivalle aineelle, esim. spesifiselle antigeenille

tai alloantigeenille, tai lymfosyytti, joka on altistettu polyklonaaliselle aktivaattorille, esim. endotoksiinille tai muille gram-negatiivisen bakteerin soluseinän komponenteille.

"Interleukiini" on yleistermi proteiinivälittäjäaineelle, jota vapauttaa pääasiassa mutta ei yksinomaisesti makrofagi, T-, B- tai NK-solu vasteena stimuloivalle aineelle, esim. spesifiselle antigeenille tai alloantigeenille, tai lymfosyytti, joka on altistettu polyklonaaliselle aktivaattorille, esim. endotoksiinille tai muille gram-negatiivisen bakteerin soluseinän komponenteille.

"Monokiini" on yleistermi proteiinivälittäjäaineelle, jota vapauttaa pääasiassa mutta ei yksinomaisesti mononukleaarinen fagosyytti (esim. monosyytti tai makrofagi tai Kupfferin solu (maksa) tai Langerhansin solu (iho) vasteena mille tahansa stimuloivalle aineelle.

"Kemokiini" on yleistermi kemotaktiselle ja/tai valkosoluja aktivoivalle proteiinivälittäjäaineelle, jota vapauttaa pääasiassa mutta ei yksinomaisesti immuunijärjestelmän solupopulaatio vasteena spesifiselle stimuloivalle aineelle, esim. spesifiselle antigeenille tai alloantigeenille, tai ei-spesifiselle polyklonaaliselle aktivaattorille, esim. endotoksiinille tai muille gram-negatiivisen bakteerin soluseinän komponenteille, ja joka kuuluu tiettyyn geeniperheeseen, joko kemokiini-α- tai kemokiini-β-geeniperheeseen.

"Interferoni" on yleistermi antiviraaliselle ja/tai monosyyttejä aktivoivalle proteiinivälittäjäaineelle, jota vapauttaa pääasiassa mutta ei yksinomaisesti immuunijärjestelmän solupopulaatio vasteena virukselle tai interferonin indusoijalle, kuten polynukleotidille; erityisesti immunijärjestelmän solut vasteena spesifiselle stimuloivalle aineelle, esim. spesifiselle antigeenille tai alloantigeenille, tai ei-spesifiselle polyklonaaliselle akti-

vaattorille, esim. endotoksiinille tai muille gram-negatiivisen bakteerin soluseinän komponenteille.

"Kantasoluryhmiä stimuloiva tekijä" on yleistermi hematopoieettiselle, kantasoluryhmiä stimuloivalle proteiinivälittäjäaineelle, jota vapauttaa pääasiassa mutta ei yksinomaisesti immuunijärjestelmän solupopulaatio vasteena spesifiselle stimuloivalle aineelle, esim. spesifiselle antigeenille tai alloantigeenille, tai ei-spesifiselle polyklonaaliselle aktivaattorille, esim. endotoksiinille tai muille gram-negatiivisen bakteerin soluseinän komponenteille.

"Polypeptidi" tarkoittaa tässä käytetyn mukaisesti sekä lyhyitä peptidejä, jotka ovat pituudeltaan vähintään kaksi aminohappotähdettä ja enintään 10 aminohappotähdettä, oligopeptidejä (11 - 100 aminohappotähdettä) ja pidempiä peptidejä ("polypeptidin" tavallinen tulkinta, ts. pituudeltaan yli 100 aminohappotähdettä) sekä myös proteiineja (funktionaalinen kokonaisuus, joka käsittää ainakin yhden peptidin, oligopeptidin tai polypeptidin, joka voi olla kemiallisesti muunnettu olemalla glykosyloitunut, olemalla lipidoitunut tai käsittämällä prosteettisia ryhmiä). Polypeptidien määritelmä käsittää myös peptidien/proteiinien natiivit muodot ihmisessä sekä myös rekombinanttiproteiinit tai -peptidit minkä tahansa tyyppisissä, mitä tahansa isäntää transformoivissa ekspressiovektoreissa, ja myös kemiallisesti syntetisoidut peptidit.

Eräs tämän keksinnön suoritusmuoto koskee polypeptidiä, joka käsittää ihmisen IL-10:n sekvenssin osasekvenssin ja jolla on vIL-10:n kanssa 66 %:n homologia-aste ja mIL-10:n kanssa 44 %:n homologia-aste, erityisesti sekvenssiä nro 1. Termillä "homologia" tarkoitetaan aminohapposekvenssien identtisyyttä kahden tai useamman aminohapon segmenteissä, kun niitä verrataan polypeptideissä olevien aminohappojen identiteetin ja aseman suhteen.

Homologiaa terminä käytetään siten tässä kahden aminohapposekvenssin (tai nukleotidisekvenssin) samankaltaisuuden mittana. Homologia ilmaistaan täsmäävien aminohappojen (tai emästen) osuutena tai prosenttiosuutena sen jälkeen, kun kaksi sekvenssiä (mahdollisesti eripituiset) on kohdennettu. Termiä kohdennus käytetään viitteessä 76 määritellyssä merkityksessä. Karkeasti ottaen kaksi sekvenssiä kohdennetaan maksimoimalla täsmäävien emästen (tai aminohappojen) lukumäärä kahden sekvenssin välillä lisäämällä minimimäärä "tyhjiä" emäksiä kumpaan vain sekvenssiin maksimaalisen päällekkäisyyden aikaansaamiseksi.

Termiä "homologinen" käytetään siten tässä muun muassa kuvaamaan tietyn polypeptidin aminohapposekvenssin ja IT9302:n aminohapposekvenssin identtisyysastetta. IT9302:n aminohapposekvenssin kanssa verrattava aminohapposekvenssi voidaan päätellä nukleotidisekvenssistä, kuten DNA- tai RNA-sekvenssistä, joka on saatu esim. hybridisoimalla kuten edempänä määritellään, tai se voidaan saada tavanomaisilla aminohapposekvensointimenetelmillä. Homologia-aste määritetään edullisesti kypsän polypeptidin aminohapposekvenssistä, ts. ottamatta huomioon signaalisekvenssiä. Yleensä vain koodittavia alueita käytetään, kun verrataan nukleotidisekvenssejä niiden sisäisen homologian määrittämiseksi.

Vaikka ajatellaan, että oleellinen homologia-aste hIL-10:n ja vIL-10:n välillä on edullinen, ei ole epätodennäköistä, että hIL-10:n osasekvenssin osasekvensseillä, joilla nähdään alempi homologia-aste vIL-10:n kanssa, vaikkapa esim. 50 %, 55 % tai 60 %, voitaisiin myös nähdä yksi tai useampia suotuisia hIL-10-agonistiaktiivisuuksia. Lisäksi edellä pohditun mukaisesti ei pidetä ehdottoman välttämättömänä, että homologia-aste hIL-10:n kanssa on 100 %. Tämän keksinnön suojapiiriin kuuluvat myös polypeptidit, joilla on alempi homologia-aste hIL-10:n kanssa, kuten 75 %, 80 %, 85 %, 90 % tai 95 %, joskin 100 % on edullinen.

Tällaisia polypeptidejä voidaan pitää nonapeptidin analogeina. Termillä "sen analogi tai variantti" tarkoitetaan siis polypeptidiä, jolla ei ole täsmälleen aminohapposekvenssi Ala-Tyr-Met-Thr-Met-Lys-Ile-Arg-Asn (sekvenssi nro 1), mutta jolla on silti edellä määritellyn mukainen "hIL-10-agonistiaktiivisuus". Yleensä tällaiset polypeptidit ovat polypeptidejä, jotka vaihtelevat esim. tietyssä määrin aminohappokoostumuksen tai translaation jälkeisten muutosten, esim. glykosylaation tai fosforylaation suhteen, esimerkeissä kuvattavaan IT9302:een verrattuna.

Termiä "analogi" tai "variantti" käytetään siis tässä yhteydessä ilmaisemaan proteiinia tai polypeptidiä, jolla on jonkin verran erilainen, mutta kuitenkin samankaltainen aminohapposekvenssi kuin IT9302:n aminohapposekvenssi, sallien pieniä muunnnoksia, jotka muuttavat aminohapposekvenssiä, esim. deleetioita, kohdennettuja mutaatioita, ylimääräisten aminohappojen insertioita tai näiden yhdistelmiä IT9302:n polypeptidianalogien muodostamiseksi.

Kohdennettu mutageneesi tarjoaa erään vaivattoman tavan saada aikaan konservatiivisia aminohapposubstituutioita ja vastaavia natiiviin proteiinisekvenssiin. Vaihtoehtoisesti analogeja voidaan valmistaa sinänsä tunnetulla tavalla neste- tai kiinteän faasin polypeptidisynteesillä käyttäen polypeptidisekvenssin yksittäisten aminohappojen peräkkäistä liittämistä, tai polypeptidi voidaan syntetisoida liittämällä yhteen yksittäisiä aminohappoja, muodostaen polypeptidisekvenssin fragmentteja, jotka myöhemmin liitetään yhteen siten, että tulokseksi saadaan haluttu polypeptidi.

"Konservatiivinen", kuten sanaa tässä käytetään, tarkoittaa (i) että muutokset ovat konformaation kannalta niin neutraaleja kuin mahdollista, ts. suunniteltuja tuottamaan minimaaliset muutokset mutanttipolypeptidien tertiäärirakenteeseen natiiviin proteiiniin verrattuna, ja (ii)

että muutokset ovat antigeenisesti niin neutraaleja kuin mahdollista, ts. suunniteltuja tuottamaan minimaaliset muutokset mutanttipolypeptidien antigeenisiin determinanteihin natiiviin proteiiniin verrattuna. Konformationaalinen neutraalisuus on toivottavaa biologisen aktiivisuuden säilyttämiseksi, ja antigeeninen neutraalisuus on toivottavaa immunogeenisten vasteiden laukaisemisen välttämiseksi keksinnön mukaisilla aineilla hoidettavissa potilaissa tai eläimissä. Vaikka on vaikea valita ehdottomalla varmuudella, mitkä vaihtoehdot ovat konformationaalisesti ja antigeenisesti neutraaleja, on olemassa sääntöjä, jotka voivat ohjata ammattimiehiä tekemään muutoksia, joilla on suuri todennäköisyys olla konformationaalisesti ja antigeenisesti neutraaleja, ks. esim. (77) ja (78). Eräisiin tärkeimpiin sääntöihin kuuluvat (1) hydrofobisten tähteiden korvaus tuottaa vähemmän todennäköisesti muutoksia antigeenisyyteen, koska ne todennäköisesti sijaitsevat proteiinin sisäosassa, esim. Bertzofsky (siteerattu edellä) ja Bowie ym. (siteerattu edellä), (2) korvaus fysikokemiallisesti samankaltaisilla, ts. synonyymisillä aminohappotähteillä tuottaa vähemmän todennäköisesti konformaatiomuutoksia, koska korvaava aminohappo voi olla samassa rakenteellisessa tehtävässä kuin korvattu aminohappo, ja (3) evoluutiossa säilyneiden sekvenssien muuttaminen todennäköisesti tuottaa vahingollisia konformaatiovaikutuksia, koska säilyminen evoluutiossa viittaa siihen, että sekvenssit voivat olla funktionaalisesti tärkeitä. Tällaisten muteiinisekvenssien valinnan perussääntöjen lisäksi on tarjolla määrityksiä muokattujen molekyylien biologisen aktiivisuuden ja konformaation varmistamiseksi. Biologiset määritykset keksinnön mukaisille aineille kuvataan täydellisemmin esimerkeissä. Konformaation muutoksia voidaan testata ainakin kahdella tunnetulla määrityksellä: mikrokomplementtifiksaatiomenetelmä, esim. (79) ja (80), jota käytetään laajasti proteiinien tertiäärirakenteiden

evoluutiotutkimuksissa, ja affiniteetit joukolle konformaatiospesifisiä monoklonaalisia vasta-aineita, esim. (81).

Eräs tämän keksinnön tärkeä suoritusmuoto siis koskee polypeptidiä, jossa ainakin yksi aminohappotähde on korvattu eri aminohappotähteellä, ja/tai jossa ainakin yksi aminohappotähde on poistettu tai lisätty niin, että tuloksena saadaan polypeptidi, joka käsittää aminohapposekvenssin, joka on erilainen kuin tämä aminohapposekvenssi tai sen seuraavassa määriteltävän mukainen osasekvenssi, mutta jolla on oleellisesti edellä määritellyn mukainen hIL-10-agonistiaktiivisuus.

Eräs keksinnön kiinnostava suoritusmuoto koskee polypeptidiä, joka on analogi ja/tai käsittää ainakin osan keksinnön mukaisesta polypeptidistä ollen yhteensä 10 - 100 aminohappoa, esim. vähintään 12 aminohappoa, vähintään 15 aminohappoa, vähintään 20 aminohappoa tai vähintään 30 aminohappoa.

Edullisessa keksinnön suoritusmuodossa ainetta tai polypeptidiä käytetään oleellisesti puhtaassa muodossa. Tähän pääsemiseksi voidaan tarvita polypeptidin puhdistamista. Esimerkkejä menettelyistä, joita polypeptidien puhdistamiseksi käytetään, ovat: (i) immunopresipitaatio tai affiniteettikromatografia vasta-aineilla, (ii) affiniteettikromatografia sopivalla ligandilla, (iii) muut kromatografiamenetelmät, kuten geelisuodatus, ioninvaihto tai korkean suorituskyvyn nestekromatografia tai minkä tahansa edeltävien johdannaiset, (iv) elektroforeesimenetelmät kuten polyakryyliamidigeelielektroforeesi, denaturoiva polyakryyliamidigeelielektroforeesi, agaroosigeelielektroforeesi ja isoelektrinen fokusointi, (v) mahdolliset muut spesifiset liukoistamis- ja/tai puhdistusmenetelmät.

Tämän keksinnön suojapiiriin kuuluu myös edellä määritellyn mukaista polypeptidiä koodittava nukleotidisekvenssi, erityisesti nukleotidisekvenssi, joka koodittaa

polypeptidiä, joka käsittää aminohapposekvenssin sekvenssi nro 1 tai on se, esim. nukleotidisekvenssi, joka käsittää sekvenssin GCC TAC ATG ACA ATG AAG ATA CGA AAC (sekvenssi nro 23) tai nukleotidisekvenssi, joka koodittaa polypeptidiä, jolla on kyseisen aminohapposekvenssin osasekvenssi. Lisäksi sellainen muunnettu nukleotidisekvenssi, joka poikkeaa edeltävästä nukleotidisekvenssistä siten, että ainakin yksi nukleotidi on poistettu, korvattu tai muunnettu tai ainakin yksi nukleotidi lisää on sijoitettu, niin että tuloksena saadaan nukleotidisekvenssi, joka koodittaa polypeptidiä, jolla on hIL-10-agonistiaktiivisuus, kuuluu keksinnön suojapiiriin.

Tässä patenttijulkaisussa ja patenttivaatimuksissa termi "osasekvenssi" tarkoittaa sekvenssiä, joka on kooltaan edullisesti ainakin 18 nukleotidia, edullisemmin ainakin 21 nukleotidia ja edullisimmin ainakin 24 nukleotidia. Joukossa keksinnön suoritusmuotoja keksinnön mukaisen nukleotidisekvenssin osasekvenssi tai analogi käsittää ainakin 27 nukleotidia, kuten ainakin 30 nukleotidia tai ainakin 45 nukleotidia. "Osasekvenssin" koodittaman polypeptidin pitäisi täyttää ainakin yksi edeltävistä kriteereistä a - g ja/tai nukleotidi"osasekvenssin" pitäisi hybridisoitua sekvenssi nro 23:n käsittävän nukleotidisekvenssin kanssa erittäin vaativissa olosuhteissa ("under high stringency conditions").

Termi "erittäin vaativa", kun sitä käytetään hybridisaatio-olosuhteiden yhteydessä, on alalla määritellyn mukaisesti joka on 5 - 10 °C sulamispisteen T_m alapuolella, vrt. Sambrook ym., 1989, sivut 11.45 - 11.49.

Termiin "analogi", kun kyse on keksinnön mukaisista DNA-fragmenteista, sisältyy nukleotidisekvenssi, joka koodittaa polypeptidiä, joka on identtinen tai oleellisesti identtinen edellä viitatun DNA:n koodittaman polypeptidin kanssa. On tunnettua, että samaa aminohappoa voivat koodittaa eri kodonit, kodonien käytön ollessa suhteessa mm.

kyseessä olevien nukleotidisekvenssiä ekspressoivien eliöiden preferenssiin. Siten yksi tai useampia nukleotideja tai kodoneita keksinnön mukaisessa DNA-fragmentissa voidaan vaihtaa toisiin, jotka ekspressoituina johtavat polypeptidiin, joka on identtinen tai oleellisesti identtinen edellä esitetyn DNA-fragmentin koodittaman polypeptidin kanssa.

Lisäksi termien "analogi" ja "osasekvenssi" on tarkoitus sallia sekvenssissä sellaiset muunnokset, kuten substituutio, insertio (mukaan lukien intronit), yhden tai useamman nukleotidin lisääminen ja uudelleenjärjestyminen, joilla ei ole mitään oleellista haittavaikutusta DNA-fragmentin tai sen osasekvenssin koodittaman polypeptidin hIL-10-agonistiaktiivisuuteen. Siten keksintöön sisältyy myös nukleotidisekvenssi, joka koodittaa polypeptidiä, jolla on aminohapposekvenssin sekvenssi nro 1 osasekvenssi.

Keksinnön mukaisia polypeptidejä voidaan tuottaa yhdistelmä-DNA-tekniikkaa käyttäen. Eräs tämän keksinnön tärkeä suoritusmuoto koskee ekspressiosysteemiä, joka käsittää keksinnön mukaisen nukleotidisekvenssin. Keksinnön suojapiiriin siis kuuluu myös ekspressiosysteemi, joka käsittää keksinnön mukaisen nukleotidisekvenssin, kuten replikoitavissa oleva ekspressiovektori, jossa on edellä määritellyn mukainen nukleotidisekvenssi, ja joka kykenee välittämään sen ekspressiota.

Eliö, jota käytetään keksinnön mukaisen polypeptidin tuottamiseen, voi olla korkeampi eliö, esim. eläin, tai alempi eliö, esim mikro-organismi kuten *Escherichia coli*, hiiva, alkueläin, monisoluisesta eliöstä kuten sienestä peräisin oleva solu, hyönteissolu, kasvisolu, nisäkässolu tai solulinja, jossa on edellä määritellyn mukainen ekspressiosysteemi.

Riippumatta käytetyn eliön tyypistä, keksinnön mukainen DNA-fragmentti viedään eliöön joko suoraan tai sopivan vektorin avulla. Vaihtoehtoisesti polypeptidejä voi-

daan tuottaa nisäkässolulinjoissa viemällä sisään keksinnön mukainen DNA-fragmentti tai sen analogi tai osasekvenssi joko suoraan tai ekspressiovektorin avulla. Keksinnön mukaisia polypeptidejä voidaan tuottaa myös kemiallisella synteesillä edellä käsitellyn mukaisesti.

Keksintö koskee lisäksi plasmidivektoria, joka käsittää keksinnön mukaista polypeptidiä tai tässä määriteltävän mukaista fuusiopolypeptidiä koodittavan DNA-sekvenssin. Eräässä erityisen tärkeässä suoritusmuodossa keksinnön mukainen DNA-fragmentti tai sen analogi tai osasekvenssi tai keksinnön mukainen, tässä määriteltävän mukainen fuusio-DNA-fragmentti voi olla mukana replikoitavissa olevassa ekspressiovektorissa, joka kykenee replikoitumaan isäntäeliössä tai -solulinjassa.

Vektori voi erityisesti olla plasmidi, faagi, kosmidi, minikromosomi tai virus. Eräässä mielenkiintoisessa keksinnön suoritusmuodossa vektori voi olla sellainen vektori, joka isäntäsoluun vietynä integroituu isäntäsolun genomiin.

Edellä kuvatun mukaisesti tuotettava polypeptidi voi joutua translaation jälkeisten tai synteesin jälkeisten muutosten kohteeksi lämpökäsittelyn, kemiallisen käsittelyn (formaldehydi, glutaraldehydi jne.) tai entsyymikäsittelyn takia (peptidaasit, proteaasit ja proteiineja muokkaavat entsyymit). Polypeptidi voidaan prosessoida eri tavalla, kun sitä tuotetaan eliössä, verrattuna sen luonnolliseen tuotantoympäristöön. Esimerkiksi glykosylaatio saadaan usein aikaan, kun polypeptidiä ekspressoi korkeamman eliön, kuten hiivan tai edullisesti nisäkkään solu. Glykosylaatiota tavataan yleensä aminohappotähteiden Asn, Ser, Thr tai hydroksilysiini yhteydessä.

Eräs keksinnön suoritusmuoto siis koskee edellä määritellyn mukaisen polypeptidin tuottomenetelmää, joka käsittää, että:

(a) sijoitetaan edellä määritellyn mukainen nukleotidisekvenssi ekspressiovektoriin,

(b) transformoidaan sopiva isäntäeliö vaiheessa a tuotetulla vektorilla,

(c) viljellään vaiheessa b tuotettua isäntäeliötä sopivissa olosuhteissa polypeptidin ekspressoimiseksi,

(d) kerätään talteen polypeptidi ja

(e) mahdollisesti pannaan polypeptidi translaation jälkeisiin muunnoksiin.

On ajateltu, että hIL-10:lle tai vIL-10:lle voidaan saada aikaan antagonistivaikutuksia muun muassa käyttäen vasta-aineita, jotka sitoutuvat spesifisesti nonapeptidiin IT9302, ja että näitä voidaan käyttää hoidossa korkean IL-10-konsentraation neutraloimiseksi.

Eräänä puolenaan tämä keksintö siis koskee vasta-ainetta, joka sitoutuu spesifisesti keksinnön mukaiseen polypeptidiin.

Termi "vasta-aine" viittaa aineeseen, joka on nisäkkään, tai tarkemmin immuunijärjestelmään kuuluvan nisäkäsperäisen solun tuottama vasteena keksinnön mukaisella polypeptidiantigeenillä altistamiselle. Tässä patenttijulkaisussa ja patenttivaatimuksissa "vasta-aine" määritellään koostuvaksi oleellisesti spesifisesti sitoutuvasta perusyksiköstä, joka koostuu kahdesta raskasketjusta ja kahdesta kevytketjusta. Laajimmalta näkökannalta kuitenkin vasta-aineen käsitteen pitäisi sisältää myös esim. perusyksikön dimeeri tai pentameeri.

Vasta-aineen vaihteleva domeeni koostuu vaihtelevista ja vakiosekvensseistä. Domeenin vaihtelevaa osaa kutsutaan vasta-aineen idiotyypiksi. Vasta-aineen tämä osa on vastuussa interaktiosta antigeenin kanssa, antigeenin sitomisesta. Puheena olevassa yhteydessä termi vasta-aine ymmärretään kokonaiseksi vasta-aineeksi tai miksi tahansa sen fragmenteiksi. Vasta-aine voidaan fragmentoida tuotannon aikana ja/tai jälkeen. Se voidaan myös tehdä alun pe-

rin fragmentoidussa muodossa ja käyttää sellaisenaan tai käyttää eri fragmenttien liittämisen jälkeen. Erityisen kiinnostavia fragmentteja ovat keksinnön mukaisten vasta-aineiden sitoutuvat fragmentit, esim. Fab- ja Fab'-fragmentit.

Vasta-aineen idiotyyppinen (antigeeniä sitova) rakenne on antigeeninen ja voi siten saada syntymään idiotyyppistä rakennetta vastaan suuntautuvia spesifisiä vasta-aineita. Idiotyyppiä vastaan muodostettuja vasta-aineita kutsutaan anti-idiotyyppisiksi vasta-aineiksi. Tällaiset vasta-aineet voivat jäljitellä alkuperäisen antigeenin rakennetta ja voivat siksi toimia alkuperäisen antigeenin tehtävässä. Tällaiset vasta-aineet voivat kyetä korvaamaan alkuperäisen antigeenin osaksi tai kokonaan keksinnön mukaisen alkuperäisen polypeptidin tehtävissä, käyttökelpoisuudessa ja ominaisuuksissa.

Keksinnön mukaiset vasta-aineet käsittävät polykloonaliset vasta-aineet sekä myös monoklonaaliset vasta-aineet.

Vasta-aine tai sen fragmentit voivat olla monospesifistä (polykloonalista) lajia. Monospesifinen vasta-aine voidaan valmistaa injektoimalla sopivaan eläimeen keksinnön mukaisen polypeptidin oleellisesti puhdasta preparaattia. Tätä voi seurata yksi tai useampi tehosteruiske sopivin väliajoin ennen ensimmäistä verenottoa. Eläimiltä otetaan verta noin 5 - 7 päivää jokaisen immunisaation jälkeen. Vasta-aineet voidaan haluttaessa eristää seerumista käyttäen tavanomaisia vasta-aineiden puhdistusmenetelmiä.

Keksinnön mukaiseen polypeptidiin sitoutuvien vasta-aineiden valmistamiseen käytettävä eläin voi edullisesti olla kani, apina, lammas, vuohi, hiiri, rotta, sika, hevonen tai marsu. Vasta-ainetta valmistavat solut voivat olla pernasoluja tai perifeerisen veren lymfosyyttejä.

Monoklonaalinen vasta-aine tai sen fragmentteja voidaan tuottaa polypeptidin oleellista komponenttia, ts.

epitooppia vastaan. Monoklonaalinen vasta-aine voidaan valmistaa sinänsä tunnetulla tavalla (Köhler ja Milstein, 1975) käyttäen hybridoomasolulinjaa tai sen klooneja tai alikklooneja taikka soluja, joissa on kyseistä monoklonaalista vasta-ainetta tuottavasta hybridoomsolulinjasta ole vaa geneettistä informaatiota. Monoklonaalista vasta-ainetta voidaan tuottaa fuusiomalla kyseistä monoklonaalista vasta-ainetta tuottavat solut sopivan solulinjan solujen kanssa ja kloonamalla saadut kyseistä monoklonaalista vasta-ainetta tuottavat hybridoomasolut. Vaihtoehtoisesti monoklonaalista vasta-ainetta voidaan tuottaa tekemällä kuolemattomaksi kyseistä monoklonaalista vasta-ainetta tuottava fuusioimaton solulinja. Lopulta monoklonaaliset vasta-aineet kerätään talteen solujen elatusaineesta. Monoklonaalista vasta-ainetta tuottamaan käytettäviä hybridoomasoluja voidaan kasvattaa *in vitro* tai eläimen ruumiinontelossa. Monoklonaalinen vasta-aine tai sen fragmentti voidaan myös tehdä yhdistelmä-DNA-menetelmiä käyttäen (Huse ym. 1989).

Monoklonaalisia vasta-aineita voidaan tehdä myös immunisoimalla soveliaita eläimiä keksinnön mukaisen polypeptidin puhdistamattomalla preparaatilla. Saadut monoklonaalisia vasta-aineita erittävät hybridoomakloonit pitäisi seuloa niiden polypeptidiin/polypeptideihin tai sen analogiin sitoutumiskyvyn suhteen.

Tarkoituksiin, joissa ei vaadita korkeaa spesifisyyttä, vasta-aine voi olla polyklonaalinen vasta-aine. Polyklonaalisia vasta-aineita voidaan saada esim. viitteessä Harboe ja Ingild, ks. edellä, kuvatun mukaisesti. Spesifisemmin sanottuna, kun on saatava polyklonaalisia vasta-aineita, keksinnön mukaista polypeptidiä tai sen analogia, edullisesti soveliaan adjuvantin, kuten Freundin epätäydellisen tai täydellisen adjuvantin lisäyksen jälkeen, ruiskutetaan eläimeen. Eläimistä otetaan verta säännöllisesti, esimerkiksi viikon välein, ja saadusta verestä

erotetaan vasta-aineen sisältävä seerumifraktio, ja mahdollisesti kyseiseen fraktioon kohdistetaan vielä muita tavanomaisia vasta-aineen puhdistusmenettelyjä ja/tai menettelyjä, joihin kuuluu puhdistetun polypeptidin tai sen analogin käyttö.

Vasta-aine voi olla myös anti-anti-idiotyyppinen vasta-aine, joka kohdistuu anti-idiotyyppistä vasta-ainetta vastaan, joka taas on vasta-aine, joka kohdistuu vasta-aineen siihen kohtaan, joka on antigeenin epitoopin kanssa reaktiivinen. Anti-idiotyyppinen vasta-aine voidaan valmistaa samankaltaisella menetelmällä kuin edellä on hahmoteltu monoklonaaliselle tai polyklonaaliselle vasta-aineelle.

Keksinnön suojapiiriin kuuluu vasta-aine, joka sitoutuu edellä määritellyn mukaiseen aineeseen tai polypeptidiin, erityisesti vasta-aine, joka sitoutuu spesifisesti polypeptidiin, jolla on aminohapposekvenssi Ala-Tyr-Met-Thr-Met-Lys-Ile-Arg-Asn.

Laajalta näkökannalta keksintö siis koskee ainetta, joka kykenee neutraloimaan yhden tai useamman hIL-10:n aktiivisuuksista a - j, ts. jolla on hIL-10-antagonistiaktiivisuus, kuten vasta-ainetta, jolla on näitä ominaisuuksia. Monoklonaalinen vasta-aine 19F1 (82), joka kykenee spesifisesti sitoutumaan IL-10:een, tunnetaan, ja se kykenee estämään LPS:llä stimuloitujen monosyyttien tuottamaa endogeenistä IL-10:tä, ks. taulukko 1 (82). Tämä vasta-aine tunnistaa natiivisti laskostunen IL-10:n, mutta ei välttämättä koko toiminnallista aluetta; kuitenkaan tämä vasta-aine ei sito spesifisesti IT9302:ta.

Tämän keksinnön suojapiiriin kuuluu myös farmaseuttinen koostumus, joka käsittää tällaisen aineen sekä myös farmaseuttinen koostumus, joka käsittää keksinnön mukaisen aineen tai polypeptidin.

Eräs erittäin tärkeä keksinnön puoli koskee farmaseuttista koostumusta, joka käsittää aineen, jolla on

edellä määritellyn mukainen hIL-10-agonistiaktiivisuus tai hIL-10-antagonistiaktiivisuus, ja farmaseuttisesti soveliaan apuaineen. Koostumus voi käsittää esim. puhdistetun syntetisoidun proteiinin tai puhdistetun rekombinanttipolypeptidin, monoklonaalisen tai polyklonaalisen vasta-aineen tai minkä tahansa muun aineen, joka täyttää kriteerit a - j, tai jos sillä on hIL-10-antagonistiaktiivisuus, kykenee neutraloimaan yhden tai useamman hIL-10:n aktiivisuuksista a - j.

Tässä keksinnössä käytettävä IL-10-agonisti tai -antagonisti voidaan valmistaa formulaatioiksi farmaseuttisesti soveliaisiin väliaineisiin, esimerkiksi suolaliuokseen, fosfaattipuskuroituun suolaliuokseen (PBS), Ringerin liuokseen, dekstroosi/suolaliuokseen, Hankin liuokseen ja glukoosiin. Koostumukset voivat sisältää farmaseuttisesti soveliaita apuaineita sen mukaan kuin tarvitaan likimain fysiologisiin olosuhteisiin pääsemiseksi, kuten puskurointiaineita, osmoottisen paineen säätöaineita, kostutusaineita, detergenttejä ja vastaavia. Lisäaineisiin voi myös kuulua muita vaikuttavia aineita, esim. bakterisidisiä aineita tai stabilointiaineita. Potilaalle annettava määrä vaihtelee riippuen siitä, mitä annetaan, antamisen tarkoituksesta, kuten ennaltaehkäisy tai hoito, saajan tilasta, antotavasta ja vastaavasta.

Farmaseuttiset koostumukset on tyypillisesti tarkoitettu transdermaalista tai parenteraalista antamista varten, esim. laskimonsisäisesti, ihonalaisesti tai lihaksensisäisesti. Suun kautta annettavat muodot ovat myös toivottavia, ja niitä voidaan tuoda tarjolle muuttamalla koostumusta siten, että vatsaympäristö ohitetaan. Koostumusta voidaan käyttää ennaltaehkäisyyn ja/tai hoitoon. Farmaseuttisia koostumuksia annetaan edullisesti laskimonsisäisesti. Siten keksintö tuo tarjolle koostumuksia, jotka käsittävät IL-10-agonisti- tai -antagonistiaineen liuotettuna tai suspensoituna soveliaaseen kantajaan, edulli-

sesti vesipohjaiseen kantajaan. Nämä koostumukset voidaan steriloida tavanomaisilla sterilointimenetelmillä tai steriilisuodattaa.

Saadut vesipohjaiset liuokset voidaan pakata käyttöä varten sellaisenaan tai lyofilisoida, ja lyofilisoitu preparaatti yhdistetään steriiliin vesipohjaiseen kantajaan ennen antamista. IL-10-agonistia tai -antagonistia voidaan myös antaa toisen biologisesti aktiivisen aineen kanssa, kuten tavanomaisen kemoterapia-aineen. Tällaisiin aineisiin kuuluvat, näihin rajoittumatta, vinkristiini, daunorubidisiini, L-asparaginaasi, mitoksantroni ja amsakriini.

Hoitosovelluksissa farmaseuttisia koostumuksia annetaan potilaalle määrä, joka on riittävä tuottamaan halutun vaikutuksen, joka määritellään "terapeuttisesti tehokkaaksi annokseksi". IL-10-agonistin tai -antagonistin terapeuttisesti tehokas annos vaihtelee esimerkiksi kulloisenkin käytön, jota varten hoito tehdään, antotavan, potilaan terveyden ja tilan ja hoitavan lääkärin arvion mukaan. Esimerkiksi annos jatkuvassa infuusiossa on tyypillisesti alueella noin 500 ng - 800 µg päivässä 70-kiloiselle potilaalle, edullisesti välillä noin 10 - 300 µg. Annos on tyypillisesti välillä 700 ng/kg/päivä - 16 µg/kg/päivä.

IL-10-agonistin tai -antagonistin pitoisuus farmaseuttisissa formulaatiossa voi vaihdella laajasti, ts. noin 10 µg:sta 5 mg:aan millilitrassa, edullisesti välillä noin 100 µg - 2 mg/ml. Konsentraatio valitaan tavallisesti etupäässä nestetilavuuksien, viskositeettien jne. perusteella kulloinkin valitun antotavan mukaisesti. Siten tyypillinen farmaseuttinen koostumus laskimonsisäistä infuusiota varten voitaisiin tehdä sisältämään 250 ml dekstroosi/suolaliuosta ja 2,5 mg IL-10-agonistia tai -antagonistia.

Kiinteitä koostumuksia varten voidaan käyttää tavanomaisia myrkyttömiä kiinteitä kantajia, joihin kuuluvat esimerkiksi farmaseuttisen puhtausasteen mannitoli, laktoosi, tärkkelys, magnesiumstearaatti, natriumsakkariini, talkki, selluloosa, glukoosi, sakkaroosi, magnesiumkarbonaatti ja vastaavat. Suun kautta antamista varten muodostetaan farmaseuttisesti sovelias myrkytön koostumus sisällyttämällä siihen tavanomaisesti käytettäviä apuaineita, kuten edellä lueteltuja kantajia, ja yleensä 10 - 95 % vaikuttavaa ainetta, ts. IL-10-agonisti- tai -antagonistiainetta, edullisesti 25 - 75 %.

Aerosolina antamista varten IL-10-agonisti tai -antagonisti toimitetaan edullisesti hienojakoisessa muodossa yhdessä pinta-aktiivisen aineen ja ponneaineen kanssa. Tyypilliset IL-10-agonistin tai -antagonistin prosenttiosuudet ovat 0,01 - 20 painoprosenttia, edullisesti 1 - 10 %. Pinta-aktiivisen aineen täytyy tietysti olla myrkytön ja edullisesti ponneaineeseen liukoinen. Kuvaavia tällaisia aineita ovat 6 - 22 hiiliatomia sisältävien rasvahappojen, kuten kaproni-, oktaani-, lauriini-, palmitiini-, stearііni-, linoli-, linoleeni-, oleostearііni- ja oleiinihapon esterit tai osittaiset esterit alifaattisen polyhydrisen alkoholin tai sen syklisen anhydridin kanssa, kuten esimerkiksi etyleeniglykolin, glyserolin, erytritolin, arabitolin, mannitolin, sorbitolin, sorbitolista johdettujen heksitolianhydridien kanssa, ja näiden esterien polyoksietyleeni- ja polyoksipropyleenijohdannaiset. Seosestereitä, kuten seos- tai luonnollisia glyseridejä voidaan käyttää.

Pinta-aktiivinen aine voi muodostaa 0,1 - 20 painoprosenttia koostumuksesta, edullisesti 0,25 - 5 %. Loppuosa koostumuksesta on yleensä ponneainetta. Nesteytetyt ponneaineet ovat tyypillisesti kaasuja vallitsevissa olosuhteissa ja tiivistyvät paineessa. Sopivia nesteytettyjä ponneaineita ovat enintään 5-hiiliset alkaanit, kuten bu-

taani ja propaani, ja edullisesti fluori- tai fluorikloorialkaanit. Edeltävien seoksia voidaan myös käyttää. Aerosolin tuottamiseksi sopivalla venttiilillä varustettu astia täytetään asianmukaisella ponneaineella, joka sisältää hienojakoisen polypeptidin/polypeptidit ja pinta-aktiivisen aineen. Siten ainesosat pysyvät korkeassa paineessa, kunnes ne vapautuvat venttiilin toimiessa.

Puoliintumisajan parantamiseksi seerumissa IL-10-agonisti tai -antagonisti voidaan kapseloida, viedä liposomien sisään, valmistaa kolloidiksi, tai voidaan käyttää muita tavanomaisia menetelmiä, joilla polypeptideille saadaan pidempi elinaika. Siten tietyissä suoritusmuodoissa IL-10-agonisti tai -antagonisti voidaan kapseloida liposomiin. Joukko eri menetelmiä on tarjolla liposomien valmistamiseksi, kuten on kuvattu esim. viitteissä (83), (84), (85) ja (86).

Siten eräs tärkeä keksinnön suoritusmuoto koskee sellaisen aineen käyttöä, jolla vähennetään tai neutraloidaan hIL-10:n ja/tai vIL-10:n korkeaa pitoisuutta, kuten sellaisen aineen käyttöä, jolla on hIL-10-antagonistiominaisuuksia, farmaseuttisen koostumuksen valmistamiseksi munasarjasyövän ja/tai AIDSin hoitoa tai ennaltaehkäisyä varten (87, 19).

Keksinnön suojapiiriin kuuluu myös munasarjasyövän ja/tai AIDSin hoito- ja/tai ennaltaehkäisymenetelmä, joka menetelmä käsittää, että sitä tarvitsevalle potilalle annetaan terapeuttisesti tai ennaltaehkäisevästi tehokas määrä hIL-10-antagonistiainetta, sekä myös sellaisen yhdisteen, jolla on hIL-10-antagonistiaktiivisuutta, käyttö farmaseuttisen koostumuksen valmistamiseksi munasarjasyövän ja/tai AIDSin hoitoa tai ennaltaehkäisyä varten.

Tämän keksinnön mukaisen aineen käyttö

Tämän keksinnön mukaisesti on keksitty, kuten edellä on kuvattu, että IT9302 ja sen analogit ja variantit ovat hyödyllisiä estämään sytokiinien vaikutuksia, joiden

tiedetään olevan mukana edellä kuvattujen patologisten tilojen patogeneesissä.

Siksi ajatellaan sellaisen hoidon mahdollisuuksia, joissa käytetään keksinnön mukaista polypeptidiä tai sen analogeja tai johdannaisia, ja niitä pitäisi tutkia kaikissa taudeissa, joissa hIL-10:n ja/tai IRAP:in hoitavaa vaikutusta odotetaan (ks. edellä, taulukko 3).

Keksinnön eräät erittäin tärkeät suoritusmuodot koskevat keksinnön mukaisen aineen tai polypeptidin käyttöä yhden tai useamman taulukossa 3 mainitun taudin hoitoon tai ennaltaehkäisyyn, keksinnön mukaisen aineen tai polypeptidin käyttöä yhden tai useamman taulukossa 3 mainitun taudin hoitoon tai ennaltaehkäisyyn tarkoitetun farmaseuttisen koostumuksen valmistamiseksi sekä myös menetelmää yhden tai useamman taulukossa 3 mainitun taudin hoitamiseksi tai ennaltaehkäisemiseksi, joka menetelmä käsittää, että annetaan sitä tarvitsevalle potilaalle terapeuttisesti tai ennaltaehkäisevästi tehokas määrä keksinnön mukaista ainetta tai polypeptidiä.

Siten eräs keksinnön tärkeä puoli on IT9302:n tai sen funktionaalisen johdannaisen käyttö farmaseuttisen koostumuksen valmistamiseksi sytokiiniin, kuten lymfokiiniin, interleukiiniin, monokiiniin, kemokiiniin, interferoniin, kantasoluryhmiä stimuloivaan tekijään, prostaglandiiniin ja/tai leukotrieeniin ihmisessä liittyvän biologisen vaikutuksen oleellisesti inhiboimista varten, jotta ennaltaehkäistäisiin tai hoidettaisiin tilaa, joka liittyy sytokiinijärjestelmän, kuten lymfokiini-, interleukiini-, monokiini-, kemokiini-, interferoni- tai kantasoluryhmiä stimuloivan tekijän järjestelmän häiriöön ja/tai prostaglandiini- ja/tai leukotrieenijärjestelmän häiriöön. Kuten termiä tässä käytetään, "farmaseuttinen koostumus" käsittää minkä tahansa koostumuksen, joka soveltuu ihmiskäyttöön kuten edellä on yksityiskohtaisesti kuvattu.

Keksintö koskee erityisesti IT9302:n tai sen funktionaalisen johdannaisen käyttöä

- sytokiiniin ihmisessä liittyvän biologisen vaikutuksen oleellisesti *inhiboimista* varten, jotta ennaltaehkäistäisiin tai hoidettaisiin tilaa, joka liittyy sytokiinijärjestelmän häiriöön, ja/tai
- lymfokiiniin ihmisessä liittyvän biologisen vaikutuksen oleellisesti *inhiboimista* varten, jotta ennaltaehkäistäisiin tai hoidettaisiin tilaa, joka liittyy lymfokiinijärjestelmän häiriöön, ja/tai
- interleukiiniin ihmisessä liittyvän biologisen vaikutuksen oleellisesti *inhiboimista* varten, jotta ennaltaehkäistäisiin tai hoidettaisiin tilaa, joka liittyy interleukiinijärjestelmän häiriöön, ja/tai
- monokiiniin ihmisessä liittyvän biologisen vaikutuksen oleellisesti *inhiboimista* varten, jotta ennaltaehkäistäisiin tai hoidettaisiin tilaa, joka liittyy monokiinijärjestelmän häiriöön, ja/tai
- kemokiiniin ihmisessä liittyvän biologisen vaikutuksen oleellisesti *inhiboimista* varten, jotta ennaltaehkäistäisiin tai hoidettaisiin tilaa, joka liittyy kemokiinijärjestelmän häiriöön, ja/tai
- lymfokiiniin ihmisessä liittyvän biologisen vaikutuksen oleellisesti *inhiboimista* varten, jotta ennaltaehkäistäisiin tai hoidettaisiin tilaa, joka liittyy lymfokiinijärjestelmän häiriöön, ja/tai
- interferoniin ihmisessä liittyvän biologisen vaikutuksen oleellisesti *inhiboimista* varten, jotta ennaltaehkäistäisiin tai hoidettaisiin tilaa, joka liittyy interferonijärjestelmän häiriöön, ja/tai
- kantasoluryhmiä stimuloivaan tekijään ihmisessä liittyvän biologisen vaikutuksen oleellisesti *inhiboimista* varten, jotta ennaltaehkäistäisiin tai hoidettaisiin tilaa, joka liittyy kantasoluryhmiä stimuloivan tekijän järjestelmän häiriöön, ja/tai

- prostaglandiiniin ihmisessä liittyvän biologisen vaikutuksen oleellisesti *inhiboimista* varten, jotta ennaltaehkäistäisiin tai hoidettaisiin tilaa, joka liittyy prostaglandiinijärjestelmän häiriöön, ja/tai

- leukotrieeniin ihmisessä liittyvän biologisen vaikutuksen oleellisesti *inhiboimista* varten, jotta ennaltaehkäistäisiin tai hoidettaisiin tilaa, joka liittyy leukotrieenijärjestelmän häiriöön.

Kuvioiden tekstit

Kuviossa 1 nähdään mIL-10:n, hIL-10:n ja BCRFI:n ennustettujen aminohapposekvenssien vertailu. Aminohapposekvenssien identtisyyskohdat on ilmaistu pystyviivoin.

Kuviossa 2 nähdään IL-10:n COOH-terminaaliset polypeptidisekvenssit, joihin sisältyy 9 aminohappoa, ja verrataan sian, ihmisen, BCRFI- ja hiiren proteiineja.

Kuvio 3 on kaavio, joka näyttää, että IT9302 inhiboi puhdistettujen, viljeltyjen ihmisen monosyyttien spontaania IL-8:n tuotantoa.

Kuvio 4 on kaavio, joka näyttää, että IT9302 inhiboi ihmisen perifeerisen veren mononuklearistен solujen IL-1:llä (1 ng/ml) indusoitua IL-8:n tuotantoa.

Kuvio 5 esittää IT9302:lla stimuloitujen ihmisen monosyyttien IRAP:n tuotantoa.

Kuvio 6 esittää IL-10:llä stimuloitujen ihmisen monosyyttien IRAP:n tuotantoa.

Kuvio 7 esittää IT9302:n kemotaksisaktiivisuutta CD8+-T-soluille.

Kuvio 8 havainnollistaa DC8+-T-solujen epäherkistymistä IT9302:n vaikutuksesta, joka johtaa CD8+-T-solujen vasteen alenemiseen IL-10:llä (10 ng/ml) indusoituun kemotaksikseen.

Kuvio 9 havainnollistaa IL-8-aktiivisuuden suppressiota IT9302:n vaikutuksesta.

Kuvio 10 on kaavio, joka näyttää, että IT9302 inhiboi MCAF/MCP-1-indusoitua monosyyttien kemotaksista.

Kuviosta 11 nähdään IL-4:n tuotanto CD4+-T-solujen sytosolifraktiossa ECL-Western-blottauksen avulla.

Kuviossa 12 nähdään TNF-α:n tuotanto ihmisen lymfosyyttien sekaviljelmän sytosolifraktiossa ECL-Western-blottauksen avulla. TNF-α:n Western-blottaus suoritettiin kuten IL-4:n, joka on kuvattu Materiaalit ja menetelmät -jaksossa, mutta käyttäen kanissa tuotettua ihmisen TNF-α:n vastaista vasta-ainetta (Pepro Tech. Inc., Lontoo, Englanti) ja piparjuuren peroksidaasilla leimattua sekundaarivasta-ainetta (luettelonumero P 217, Dako, Tanska).

Kuviossa 13 nähdään, että IT9302 moduloi LPS:n indusoimaa sokkia ja leukopeniaa, mikä nähdään leukosyyttien kokonaismääristä.

Esimerkit

Materiaalit ja menetelmät

Sytokiinit ja kemoattraktantit

Rekombinantti-hIL-10 saatiin yhtiöltä Pepro Tech Inc., NJ, USA (luettelonumero 200 10). Rekombinantti-hIL-1β ja Rekombinantti-hIL-8 olivat ystävällinen lahjoitus yhtiöltä Dainippon Pharmaceutical Company, Osaka, Japani. Elatusaine oli Gibcon RPMI 1640, LPS-vapaa Limulus-amebosyyttilysaattimäärityksen mukaan (Sigman E-TOXATE tarvikesarja, luettelonumero 210-A1). rhMCAF/MCP-1 oli ystävällinen lahjoitus professori Kouji Matsushimalta Japanin Kanazawasta.

Leukosyyttien kemotaksismääritys

T-solujen kemotaksis

T-lymfosyyttien CD4+- ja CD8+-osajoukot, joille tunnusmerkillistä on joko CD4- tai CD8-antigeenin ekspressio, puhdistettiin normaalien luovuttajien hepariiniverestä. Siten perifeerisen veren mononukleaarisia soluja (PBMC) puhdistettiin hepariiniverestä laimentamalla 100 ml verta Hanksin tasapainotetulla suolaliuoksella (HBSS) 1:1 ja sitten erotettiin panemalla solut kerrokseksi Lymphopac™:n (Nycomed Pharma, Oslo, Norja) päälle, mitä seurasi

gradienttisentrifugointi 2000 rpm nopeudella 20 minuutin ajan. Mononukleaariset solut pestiin kolmesti HBSS:ssä, ja solunappi laimennettiin 4 ml:aan HBSS:ää, joka sisälsi 1 %:n naudan sikiön seerumia, ja lajiteltiin 4 °C:n lämpötilassa käyttäen Dynabeads-helmiä, jotka oli pinnoitettu CD4- tai CD8-antigeenin vastaisella monoklonaalisella vasta-aineella (Dynabeads M-450 CD4, luettelonumero 111.16, Dynabeads M-450 CD8, luettelonumero 111.08, DETACHaBEAD, luettelonumero 125.04). Helmi:solu-suhde oli 10:1 ja inkubaatioaika 1 tunti. Helmet irrotettiin lisäämällä polyklonaalista hiiren vastaista vasta-ainetta valmistajan ohjeiden mukaisesti.

Kemotaksismääritys oli 48-kuoppainen mikrokammiomenetelmä (Neuroprobe, Rockville, MD, USA) kuten aikaisemmin on kuvattu (74; ks. viite 3 ja viite 14). Kemoattraktantit laimennettiin RPMI 1640:een (GIBCOn luettelonumero 61870-010), jossa oli 1 % steriilisuodatettua naudan sikiön seerumia, ja pantiin alempaan 25 µl:n kammioon. T-solujen kemotaksismäärityksen tapauksessa T-soluja (5 x 10^6/ml) suspensoitiin elatusaineeseen, ja 50 µl pantiin yläkammioon, jonka erotti alakammiosta 5 µm huokoskokoinen polykarbonaattinen, polyvinyylipyrrolidoniton suodatin (Nucleopore Corp., Pleasanton, CA, USA), joka oli pinnoitettu tyypin IV kollageenilla (Sigman luettelonumero C 0543). Solujen annettiin kulkeutua 2 tuntia 37 °C:n lämpötilassa 5-prosenttisessa CO_2:ssa. Sitten suodattimet irrotettiin varovasti, kiinitettiin 70-prosenttisessa metanolissa ja värjättiin 5 minuuttia Coomassie Brilliant Bluessa. Suodattimen alapintaan kiinnittyneet solut laskettiin mittaamalla niiden pinta-ala käyttäen mikroskoopin videokameraa, joka oli digitaalista analyysiä varten yhteydessä tietokonejärjestelmään ja jota tuki ohjelmisto kemotaksiskulkeutumisen objektiivista määrittämistä varten. Noin 5 % T-soluista kulkeutuu spontaanisti, mikä vastaa 12 000 - 13 000 solua; tämä voi vaihdella päivästä toiseen, mutta

hyvin vähän saman päivän kokeissa. Kuten aikaisemmin on kuvattu (viite 3 ja viite 14), siksi päätettiin raportoida tulokset näytteessä ja spontaania kulkeutumista edustavassa negatiivisessa kontrollissa kulkeutuvien solujen lukumäärien suhteena. Tähän suhteeseen viitataan kemotaksisindeksinä (CI). Kaikki näytteet analysoitiin kolmena rinnakkaisena, ja solujen kulkeutuminen kussakin kuopassa mitattiin kolmesta näkökentästä ennen kuin pinta-alan mediaaniarvo arvioitiin. Joissakin kokeissa kemotaksiskalvo *ei* ollut kollageenilla pinnoitettu, ja siksi tässä määritysysteemissä kulkeutuvat solut putoavat kemotaksiskammion alemman kuopan pohjalle.

Yhdessä kokeessa IT9302:n kemotaktinen aktiivisuus CD8+-T-soluille suoritettiin testaamalla IT9302:n sarjalaimennokset alakammioon lisättyinä ja määrittämällä kemotaksis edellä kuvatun mukaisesti.

Toisessa kokeessa IT9302:n kykyä epäherkistää CD8+-T-solujen kulkeutuminen vasteena rHIL-10:lle (10 ng/ml) tutkittiin lisäämällä IT9302:ta kohdesoluille 30 minuuttia ennen kemotaksista. IT9302 lisättiin sarjalaimennoksina, ja rhIL-10:n kemotaksisvaste määritettiin kuten edellä on kuvattu.

Kolmannessa kokeessa IT9302:n kykyä suppressoida CD4+-T-solujen kemotaksisvastetta rHIL-8:lle (10 ng/ml) tutkittiin lisäämällä IT9302:ta kohdesoluille 30 minuuttia ennen kemotaksiksen suoritusta. IT9302 lisättiin sarjalaimennoksina, ja rhIL-8:n kemotaksisvaste määritettiin kuten edellä on kuvattu.

Monosyyttien kemotaksis

Monosyyttien kemotaksis mitattiin käyttäen samaa Boydenin kammiolaitetta kun T-soluille edellä kuvattiin. Kemoattraktantti MCAF/MCP-1 laimennettiin RPMI 1640 -elatusaineeseen, jossa oli 0,5 % BSA:ta, ja lisättiin alakammioon konsentraatiossa 10 ng/ml. Monosyytit, tavanomaisella muoviadheesiomenetelmällä puhdistetut, normaaleista

ihmisen PBMC:istä, jotka oli saatu kuten edellä on kuvattu, suspensoitiin RPMI 1640 -elatusaineeseen, jossa oli 0,5 % BSA:ta, ja sitten inkuboitiin 30 minuuttia eri konsentraatioiden IT9302:ta ollessa läsnä. Sitten solut vietiin kemotaksiskammioiden yläosaan tiheydessä 10^6 solua/ml. Ylä- ja alakammiota erotti 8 μm huokoskokoinen polyvinyylipyrrolidoniton, polykarbonaattinen suodatin (Nucleopore Corp., Pleasanton, CA, USA). Kammiota inkuboitiin 37 °C:n lämpötilassa 90 minuuttia. Kulkeutuvia soluja sisältävät kalvot käsiteltiin kuten edellä on kuvattu, ja kemotaksisindeksi laskettiin edellä kuvatun menetelmän mukaisesti.

Normaalien ihmisen perifeeristen mononukleaaristen solujen (PBMC) IL-8:n tuotto

PBMC:t puhdistettiin normaalien ihmisluovuttajien hepariiniverestä. Lymphoprep™:llä (Nycomed Pharma, Oslo, Norja) gradienttisentrifugoinnin jälkeen mononukleaariset solut laimennettiin tiheyteen 2 x 10^6 LPS-vapaaseen RPMI 1640 -elatusaineeseen (GIBCOn luettelonumero 6187-010), jossa oli 1 % steriilisuodatettua, lämpöinaktivoitua naudan sikiön seerumia ja penisilliiniä (10 000 ky/ml), streptomysiiniä (10 mg/ml) ja gentamysiiniä (2,5 mg/ml). Soluja viljeltiin 24-kuoppaisilla Nunc Micro Plate -levyillä (Nunc, Tanska) eri pitoisuuksien IT9302:ta (0, 1 μg, 100 ng, 10 ng, 1 ng, 0,1 ng, 0,01 ng/ml) ollessa läsnä 24 tunnin ajan. 24 tunnin inkubaation jälkeen lisättiin vielä toinen annos IT9302:ta, ja tuntia myöhemmin soluviljelmiin lisättiin r-hIL-1β:a (1 ng/ml). Supernatantit kerättiin yhteensä 48 tunnin inkubaation jälkeen, ja eritetyn IL-8:n pitoisuus mitattiin IL-8-ELISA:lla käyttäen IL-8-ELISA-tarvikesarjaa (Dainippon Pharmaceutical Co. Ltd, Osaka, Japani). Lyhyesti kuvattuna standardeja ja solujen supernatantteja inkuboitiin tunnin ajan kahtena rinnakkaisena 20 °C:n lämpötilassa mikrolevyravistelijassa. Sitten pesun jälkeen lisättiin toinen vasta-aine tunnin ajaksi, mitä seurasi tunnin inkubaatio peroksi-

daasileimatun vuohessa tuotetun kanin IgG:n vastaisen vasta-aineen kanssa. Pesun jälkeen reaktio kehitettiin O-fenyylidiamiinilla. 30 minuuttia myöhemmin reaktio pysäytettiin 1,6 N rikkihapolla. Absorbanssi (A) mitattiin ELISA-lukulaitteella 490 nm aallonpituudella. IL-8:n konsentraatio laskettiin kalibrointikäyrän avulla tuntemattoman absorbanssista IL-8-standardien konsentraatioihin verraten.

IRAP-konsentraation määrittäminen

PBMC:t puhdistettiin kuten edellä on kuvattu. PBMC:itä viljeltiin RPMI 1640:ssä, 10-prosenttinen steriilin, lämpöinaktivoidun naudan sikiön seerumin suhteen (sisältäen penisilliiniä 10 000 ky/ml, streptomysiiniä 10 mg/ml, gentamysiiniä 2,5 mg/ml), ja solutiheys oli 5 x 10^6 solua/ml. Sitten monosyytit puhdistettiin tavanomaisella muoviadheesiomenetelmällä. Sitten monosyyttejä viljeltiin RPMI 1640:ssä, jossa oli 2 % FCS:ää (2,5 x 10^6 solua/ml) ja eri laimennuksia rhIL-10:tä tai IT9302:ta. Soluja stimuloitiin 24 tuntia, ja supernatantit kerättiin talteen IRAP-määritystä varten. IRAP-ELISA suoritettiin käyttäen ihmisen IL-1ra Quantikin Immunoassay Kit -tarvikesarjaa yhtiöltä R&D Systems Europe Ltd. (luettelonumero DRA 00, Abingdon, Oxon, UK).

Luokan II MHC-antigeeniekspression määrittäminen monosyyteissä

PBMC:t puhdistettiin kuten edellä on kuvattu, ja monosyytit eristettiin muoviadheesiomenetelmällä. Sitten monosyyttejä viljeltiin RPMI 1640:ssä, jossa oli 2 % FCS:ää ja joka sisälsi penisilliiniä 10 000 ky/ml, streptomysiiniä 10 mg/ml, gentamysiiniä 2,5 mg/ml, solutiheydessä 3 x 10^6/ml. Soluja stimuloitiin 40 tuntia mikrokuopissa (Nunc, Tanska) pitoisuudella 100 ng/ml rhIL-10:tä tai IT9302:lla 1 µg/ml, 100 ng/ml, 10 ng/ml. Stimulaation lopussa supernatantit poistettiin ja solut irrotettiin muovista jäädyttämällä -20 °C:n lämpötilassa 20 minuuttia. Solut kerättiin 1 ml:aan kylmää HBSS:ää, jossa oli 1 %

FCS:ää, ja lajiteltiin 20 °C:n lämpötilassa käyttäen 50 µl/ml Dynabeads M 450 -helmiä, jotka oli pinnoitettu luokan II HLA:n β-ketjun vastaisella monoklonaalisella vasta-aineella (luettelonumero 210.03). 20 minuutin inkubaation jälkeen solut pestiin kolmesti kylmällä HBSS:llä, jossa oli 1 % FCS:ää, ja kerättiin talteen magneettierotuslaitteella. Solut laimennettiin edeltävään puskuriin ja värjättiin metyleenisinisellä, ja ruusukkeen muodostavat solut (solut, joissa oli luokan II HLA:n mAb:tä sisältäviä Dynabeads-helmiä) laskettiin.

CD4+-T-lymfosyyttien IL-4:n tuotannon määrittäminen
Soluviljelmät

CD4+-T-lymfosyyttejä puhdistettiin normaalista ihmisen hepariiniverestä. Lymphoprep™-gradienttisentrifugoinnin (Nycomed Pharma, Oslo, Norja) jälkeen mononukleaariset solut edelleen lajiteltiin 4 °C:n lämpötilassa käyttäen Dynabeads-helmiä (Dynal AS, Norja), jotka oli pinnoitettu monoklonaalisella CD4-vasta-aineella. Helmet irrotettiin lisäämällä polyklonaalista hiiren vastaista vasta-ainetta (Dynal AS, Norja). Positiivisesti selektoitujen solujen puhtaus oli yli 99 % FACS-analyysillä arvioituna. Kun tutkittiin IL-8:lla stimuloitujen T-solujen IL-4:n *de novo* -tuotantoa, T-solut olivat viljelmiä, 5 x 10^6 solua/ml LPS-vapaassa RPMI 1640:ssä (Gibcon luettelonumero 61870-010), jossa oli 1 % steriilisuodatettua, lämpöinaktivoitua naudan sikiön seerumia (FCS), penisilliiniä (10 000 ky/ml), streptomysiiniä (10 mg/ml) ja gentamysiiniä (2,5 mg/ml). T-soluja stimuloitiin 3 päivää käyttäen rIL-8:aa (100 ng/ml), rIL-10:tä (100 ng/ml), IT9302:ta (10 ng/ml) ja IFN-γ:a (10 ng/ml). Ihmisen rekombinantti-IL-8 oli ystävällinen lahjoitus yhtiöltä Dainippon Pharmaceutical Co. Ltd., Osaka, Japani), ja IFN-γ hankittiin yhtiöltä Boehringer Ingelheim am Rhein, Saksa. IL-8-stimulaation inhiboimiseksi spesifisesti käytettiin monoklonaalista IL-8-vasta-ainetta (WS.4) (ystävällinen lahjoitus tri K. Mat-

sushimalta, Japani). Rekombinantti-IL-10 hankittiin yhtiöltä Pepro Tech, Inc. (Lontoo, Englanti).

Solumateriaalin ja viljelmän supernatantin valmistelu geelielektroforeesiin

Viljellyt T-solut ja elatusaine erotettiin sentrifugoimalla 2 000 rpm nopeudella 5 minuuttia. Supernatantit kylmäkuivattiin ja sitten liuotettiin 100 µl:aan hajotuspuskuria. Solut suspensoitiin suoraan 100 µl:aan geelihajotuspuskuria (9). Materiaali pidettiin -80 °C:n lämpötilassassa jatkotutkimuksiin asti.

CD4+-T-soluperäisten proteiinien ECL-Western-blottaus

Soluja tai kylmäkuivattuja soluviljelmien supernatantteja käytettiin IL-4-proteiinimäärän määritykseen. Yksisuuntaisten 15-prosenttisten SDS-PAGE-geelien proteiinit siirrettiin blottauksella Hybond-ECL-nitroselluloosakalvoille (Amersham RPN 2020D, UK) ja kyllästettiin 5-prosenttisella naudan seerumin albumiinilla (Sigma) Tris-puskuroidussa suolaliuoksessa, pH 7,8, joka sisälsi 0,1 % Tween-20:tä. Sitten blotattuja kalvoja inkuboitiin polyklonaalisen, vuohessa tuotetun, ihmisen IL-4:n vastaisen vasta-aineen (R & D Systems, UK) kanssa ja sen jälkeen piparjuuren peroksidaasilla leimatun sekundaarivasta-aineen kanssa (luettelonumero RPN 2106 ECL, Amersham, UK), ja immunovärjäytyminen havaittiin valottamalla filmiä (Kodak X-OMAT-S, USA) 90 sekuntia.

IT9302:n aminohapposekvenssin spesifisyys

IT9302:n sekvenssin mahdollista homologiaa muiden proteiinien kanssa etsittiin hakemalla EMBO:n proteiinitietokannasta tri Henrik Leffersin, Tanskan Aarhusin yliopiston, lääketieteellisen biokemian laitokselta, ystävällisellä avustuksella.

IT9302:n aminohapposekvenssin spesifisyys

EMBO:n proteiinitietokannasta (Heidelberg) 10. kesäkuuta 1994 saatujen tietojen mukaan IT9302:lla on

100 %:n homologia ihmisen IL-10:stä olevan sekvenssin kanssa, ja 75 % Epsteinin-Barrin viruksesta peräisin olevan proteiinin, joka on vIL-10:n kanssa identtinen, sekvenssin kanssa, Muilla virusproteiineilla, kuten T7-faagilla ja tomaatin keltalehtikäpristystautiviruksella ("tomato yellow leaf curl virus") nähtiin 75 %:n ja vastaavasti 85 %:n identtisyys.

Tulokset

Keksintö syntyi lokakuussa ja marraskuussa 1992, kun nonapeptidi nimeltään IT9302 suunniteltiin edellä hahmotellun strategian mukaisesti, ja ensimmäisen prototyypin (IT9302:n) kemiallisesta synteesistä päätettiin ja se tilattiin 27. marraskuuta 1992. Odotettiin, että tämän nonapeptidin pitäisi panna liikkeelle immunologisia säätelyaktiivisuuksia, joista jotkin jäljittelisivät IL-10:n kaltaista aktiivisuutta, ja seuraavat kontrollikokeet (esimerkit) suunniteltiin myös tänä aikana. Carlbiotech Ltd. A/S, Tanska, suoritti IT9302:n kemiallisen synteesin automaattista polypeptidisyntetisaattoria käyttäen keksijöiden maksettuna tilauksena. Sen jälkeen proteiini puhdistettiin HPLC:llä, ja sen puhtauden varmistettiin ylittävät 95 % HPLC:n mukaan. Tämä varmisti sen, että syntetisoitu tuote oli identtinen keksijöiden loka- ja marraskuussa 1992 suunnitteleman IT9302:n kanssa.

Esimerkki 1

Ihmisen monosyyttien spontaanin IL-8:n tuotannon IT9302:n indusoima inhibitio

Testi suoritettiin, kuten on kuvattu kohdassa "Normaalien ihmisen perifeeristen mononukleaaristen solujen (PBMC) IL-8:n tuotto". Monosyytit puhdistettiin muoviadheesiomenetelmällä, ja 3,0 x 10^6 solua/ml stimuloitiin 40 tuntia. Kuten kuviosta 3 nähdään, IT9302 inhiboi monosyyttien IL-8:n tuotantoa, ja pitoisuudessa 0,1 ng/ml IT9302:ta IL-8:n tuotanto oli suppressoitu 35 %:iin spontaanista tuotannosta *in vitro*. Elävien solujen osuus ylit-

ti aina 80 % yhden päivän viljelyn jälkeen, eikä IT9302:n lisäys tässä tai seuraavissa esimerkeissä vaikuttanut elävien osuuteen missään IT9302:n konsentraatiossa 0,1 ja 1 000 ng/ml välillä (IT9302:n molekyylipaino: 1 127 daltonia, rhIL-10:n ennustettu molekyylipaino: 18 400 daltonia).

Esimerkki 2

Ihmisen perifeerisen veren mononukleaaristen solujen (PBMC) IL-1β:lla indusoidun IL-8:n tuotannon IT9302:n indusoima inhibitio

Testi suoritettiin, kuten on kuvattu kohdassa "Normaalien ihmisen perifeerisen veren mononukleaaristen solujen (PBMC) IL-8:n tuotto". Kuten kuviosta 4 nähdään, IT9302 inhiboi annoksesta riippuvalla tavalla ihmisen perifeerisen veren mononukleaaristen solujen IL-1β:lla indusoitua IL-8:n tuotantoa *in vitro*. IL-8:n tuotannon suppressio tasaantui IT9302:n konsentraatiolla välillä 0,01 - 100 ng/ml.

Esimerkki 3

IT9302:n indusoima ihmisen monosyyttien interleukiini-1-reseptoriantagonistiproteiinin (IRAP) tuotanto

Testi suoritettiin, kuten on kuvattu kohdassa "IRAP-konsentraation määritys". Kuten kuviosta 5 nähdään, IT9302 indusoi annoksesta riippuvalla tavalla ihmisen monosyyttien IRAP:n tuotantoa. Tuotanto lisääntyi voimakkaasti, kun käytettiin IT9302:n konsentraatiota yli 10 ng/ml. Kuviosta 6 nähdään IRAP:n induktio rhIL-10:llä, ja koska hIL-10 on noin 20 kertaa suurempi kuin IT9302, 10 ng/ml on molaarisuutena yhtä suuri kuin 200 ng/ml IL-10:tä. Siksi IT9302:n ja rhIL-10:n tehokkudet ovat vertailukelpoiset ja likimäin yhtäsuuret IRAP:n induktion suhteen alemmissa konsentraatioissa. IT9302:n konsentraatiossa, jotka ylittävät 10 ng/ml, IRAP:n induktio lisääntyi voimakkaasti ja saavutti tason noin 700 ng/ml.

Esimerkki 4

IT9302:n kemotaktinen vaikutus ihmisen CD8+-T-lymfosyytteihin

Tämä koe suoritettiin, kuten on kuvattu kohdassa "Leukosyyttien kemotaksismääritys". Kuten kuviosta 7 nähdään, IT9302 indusoi ihmisen CD8+-T-lymfosyyttien kemotaktisen kulkeutumisen *in vitro*, kun taas CD4+-T-soluille ei ollut vaikutusta (tuloksia ei esitetä). IT9302:n tässä kokeessa osoittama aktiivisuus on jälleen vertailukelpoinen rhIL-10:n aikaisemmin (viite 14) osoittaman kanssa.

Esimerkki 5

IT9302 epäherkistää ihmisen CD8+-T-soluja johtaen vasteen alenemiseen rhIL-10:lle

Tämä koe suoritettiin, kuten on kuvattu kohdassa "Leukosyyttien kemotaksismääritys". IT9302:ta lisättiin CD8+-T-solujen suspensioon 30 minuuttia ennen kuin näiltä soluilta testattiin niiden kemotaktinen vaste rhIL-10:lle. Kuten kuviosta 8 nähdään, solujen esi-inkubaatio IT9302:n kanssa johtaa CD8+-T-solujen vasteen suppressoitumiseen hrIL-10:lle. Tämä viittaa siihen, että IT9302 voi vaikuttaa rhIL-10:n sitoutumiseen IL-10-reseptoriin.

Esimerkki 6

IT9302 suppressoi CD4+-T-lymfosyyttien kemotaktista vastetta IL-8:lle

Tämä koe suoritettiin, kuten on kuvattu kohdassa "Leukosyyttien kemotaksismääritys". Kuten kuviosta 9 nähdään, IT9302 inhiboi annoksesta riippuvalla tavalla ihmisen CD4+-T-lymfosyyttien suspensioon lisättynä CD4+-T-solujen vastetta IL-8:lle.

Esimerkki 7

IT9302 suppressoi ihmisen monosyyttien kemotaktista vastetta MCAF:lle/MCP-1:lle

Tämä koe suoritettiin, kuten on kuvattu kohdassa "Monosyyttien kemotaksis". Kuten kuviosta 10 nähdään, IT9302 inhiboi annoksesta riippuvalla tavalla ihmisen mo-

nosyyttien suspensioon lisättynä monosyyttien kemotaktista vastetta MCAF:lle/MCP-1:lle.

Esimerkki 8

IT9302 ei inhiboi luokan II MHC-molekyylien ekspressiota ihmisen monosyyteissä

Tämä koe suoritettiin, kuten on kuvattu osassa Materiaalit ja menetelmät, ja se osoittaa, että rhIL-10 inhiboi luokan II MHC-ekspressiota, mutta IT9302 ei, kuten seuraavasta taulukosta 4 nähdään.

Taulukko 4

Stimulaatio	**Ruusukkeen muodostavien monosyyttien määrä**
0	$12,0 \pm 1,0 \times 10^4$
100 ng/ml rhIL-10	$4,6 \pm 1,4 \times 10^4$
1 µg/ml IT9302	$11,0 \pm 3,0 \times 10^4$
100 ng/ml IT9302	$14,4 \pm 2,4 \times 10^4$
10 ng/ml IT9302	$11,2 \pm 3,2 \times 10^4$

Kokeisiin liittyvää pohdintaa

Nämä tulokset osoittavat synteettisen nonapeptidin IT9302 annoksesta riippuvan inhiboivan vaikutuksen prosesseihin, jotka kuvastavat pro-inflammatorista aktiivisuutta, mukaan lukien IL-8:n tuotanto ja monosyyttien ja/tai T-solujen kulkeutuminen. Niinpä IT9302 kykeni suppressoimaan yön yli viljeltyjen ihmisen monosyyttien spontaanin IL-8:n tuotannon. Tämän voisi selittää suoralla estovaikutuksella IL-8:n mRNA:n tuottoon ja/tai sitä seuraavaan proteiinin tuottoon ja tai vapautumiseen. Toinen mekanismi voitaisiin selittää sillä, että *in vitro* viljellyt monosyytit ekspressoivat ja tuottavat IL-1:tä, joka sitten vuorostaan indusoi IL-8:n tuotannon. Tätä tukee se, että on osoitettu IT9302:n voimakkaasti indusoivan IRAP:n tuotannon monosyyteistä. Siksi IT9302 saattaa inhiboida myös

spontaania IL-8:n tuotantoa häiritsemällä IL-1:n aktiivisuutta. Havaittu IRAP:n induktio IT9302:n vaikutuksesta näyttää indusoivan biologisesti aktiivista IRAP:tä, koska viljelmiin lisätty IT9302 vastavaikuttaa IL-1:llä indusoituun IL-8:n tuotantoon, mutta vain silloin, kun se on lisätty ainakin 16 tuntia ennen kuin IL-1 lisätään viljelmiin. Tämä voisi tarkoittaa, että IT9302 inhiboi IL-1:llä indusoitua IL-8:n tuotantoa indusoimalla IRAP:n tuotannon, joka vuorostaan salpaa IL-1:n aktiivisuuden sen reseptorin kautta. Jos IT9302 estäisi suoraan IL-8:n tuotantoa, olisi odotettu, että IT9302:n lisäämisen viljelmiin tuntia ennen IL-1:n lisäystä pitäisi inhiboida IL-8:n tuotantoa, miten asia ei ollut (tuloksia ei esitetä). Siksi IT9302:n havaittu IL-8:n tuotannon inhibitio luultavasti johtuu IRAP:n tuotannon induktiosta ennemmin kuin IL-8:n tuotannon suorasta inhibitiosta. Nämä IT9302:n toiminnat voidaan tavata myös hIL-10:llä, mikä osoittaa, että IT9302:lla on IL-10:n kaltaisia aktiivisuuksia. IT9302 myös jäljittelee IL-10:n aktiivisuutta suppressoimalla CD4+-T-solujen kyvyn kulkeutua vasteena IL-8:lle. Koska IL-8 liittyy tulehduksen moniin eri vaiheisiin ja koska CD4+-T-solut ilmestyvät varhain T-soluvälitteisen immuunitulehduksen, kuten ihoallergian, infiltraattiin, tällä piirteellä voi osoittautua olevan merkittävää hoidollista arvoa T-soluvälitteisen immuunitulehduksen hallintaan.

IT9302:n osoitettu CD8+-T-solujen kemotaktinen aktiivisuus on myös IL-10:n aktiivisuuden kanssa samansuuntainen, ja siten IT9302 voi aktivoida T-solupopulaatiota, joilla on suppressoriaktiivisuutta, edesauttaen T-soluvälitteisen immuunitulehduksen loppumiseen. Siksi IT9302:lla on edellä esitettyjen esimerkkien mukaan hoidollista arvoa taudeissa, joissa IL-10:llä ja/tai IRAP:llä myös on hoidollista arvoa. Lisäksi IT9302:lla voi olla hoidollista arvoa taudeissa, joissa IL-8:lla ja/tai MCAF:llä ja/tai IL-1:llä uskotaan olevan osuutta patogeneesissä.

Esimerkki 9

IT9302 ja IL-10 indusoivat IL-4:n tuotannon CD4+-T-lymfosyyteissä

Tausta

Kuten IL-10, IL-4 on T_H2-tyyppisten CD4+-T-solujen tuote. Ihmisen rekombinantti-IL-10:n havaittiin indusoivan viljeltyjen ihmisen CD4+-T-solujen IL-4:n tuotannon. Tämä tarkoittaa, että IL-10, sen omien immunosuppressiivisten toimintojen lisäksi, indusoi myös toisen immunosuppressiivisen sytokiinin, IL-4:n tuotannon. Siksi testattiin, indusoiko myös IT9302 CD4+-T-solujen IL-4:n tuotannon.

Siten CD4+-T-soluja, puhdistettu kuten on kuvattu kohdassa "Menetelmät T-solujen kemotaksista varten" ja viljelty kuten on kuvattu jaksossa "CD4+-T-lymfosyyttien IL-4:n tuotannon määrittäminen", stimuloitiin 3 päivää IT9302:lla (10 ng/ml) tai IL-10:llä (100 ng/ml). Sytosolifraktiot kerättiin talteen, ja niiden IL-4-sisältö analysoitiin käyttäen Western-blottausta (kuvio 11) ja vuohessa tuotettua ihmisen IL-4:n vastaista polyklonaalista vasta-ainetta.

Kuten kuvio 11 osoittaa, havaittiin, että sekä IL-10 että IT9302 indusoi viljeltyjen, normaalien ihmisen CD4+-T-solujen IL-4:n tuotannon.

Esimerkki 10

IT9302 inhiboi TNF-α:n tuotantoa leukosyyttien sekoitusreaktion (MLR) aikana

On osoitettu, että leukosyyttien sekoitusreaktio riippuu osittain TNF-α:n tuotannosta reaktion aikana. On osoitettu, että IT9302 ei vähennä MLR:ää merkitsevästi, mutta havaittiin, että TNF-α:n tuotannossa MLR:n aikana on merkitsevä väheneminen.

Niinpä MLR suoritettiin puhdistamalla ihmisen leukosyyttejä ja viljelemällä sitten miljoonaa solua/ml allogeenisistä luovuttajista 4 päivää. Ennen viljelmien perustamista toista soluryhmää sädetettiin 2 minuuttia beeta-

säteilyä käyttäen. Sytosolin proteiinifraktiot puhdistettiin kuten on kuvattu jaksossa "CD4+-T-lymfosyyttien IL-4:n tuotannon määrittäminen", ja Western-blottaus suoritettiin käyttäen kanissa tuotettua ihmisen TNF-α:n vastaista vasta-ainetta.

Kuten kuvio 12 osoittaa, TNF-α:n tuotannossa ihmisen leukosyyttien sekoitusreaktion aikana havaittiin merkitsevä väheneminen.

Esimerkki 11

LPS:n siassa indusoiman sokin ja leukopenian modulointi IT9302:tä käyttäen

Koska oli havaittu, että IT9302 moduloi sytokiinien tuotantoa, mukaan luettuina TNF-α ja IL-8, ja julkaistu sian IL-10:n sekvenssi (Blancho ym., 1995) tuki tätä (ks. kuvio 2 COOH-terminaalisen peptidin homologian suhteen), testattiin, pystyikö IT9302 moduloimaan LPS:n indusoiman leukopenian kulkua siassa (kuvio 13).

Alustavassa kokeessa testattiin, kuinka määrän 0,1 mg/kg IT9302:ta laskimonsisäinen injektio moduloi määrän 2 μg/kg LPS:ää laskimonsisäisen injektion vaikutusta sioissa (N = 3). IT9302 injektioitiin 30 minuuttia ennen LPS:n injektiota, ja verinäytteet otettiin kuten kuviossa 13 kuvataan. Kokonaisleukosyyttilaskenta sekä myös erittelylaskenta tehtiin, ja neutrofiilisten leukosyyttien kokonaismäärä laskettiin näiden tulosten perusteella.

Kuten esitetään, havaittiin, että LPS-injektio aiheutti ohimenevän leukopenian. IT9302:n injektio kuitenkin esti leukopenian, kuten kuviossa esitetään.

Esimerkki 12

Synteettisen polypeptidin IT9302 vastainen vasta-aine

Synteettinen polypeptidi IT9302 hankittiin yhtiöltä Kem-En-Tac A/S, Kööpenhamina, Tanska, yli 95-prosenttisen puhtaana. Valmistaja myös konjugoi tämän polypeptidin "keyhole limpet" -maljakotilon hemosyaniiniin (KLH). Liu-

koinen IT9302/KLH on immunogeenisempi kuin pelkkä polypeptidi, ja sitä voidaan myös käyttää kontrolliproteiinina ELISA:an tai Western-blottaukseen.

Kanien immunisointi

250 µg IT9302:ta KLH:hon kytkettynä ja emulsiona täydellisen Freundin adjuvantin kanssa käytetään ihonsisäisiin tai ihonalaisiin injektioihin. Injektiot uusitaan neljästi kahden viikon välein, ja kaneilta otetaan verta 8 ja 12 päivää sen jälkeen. Myöhemmät tehosteinjektiot, joissa on 250 µg IT9302/KLH:ta epätäydellisessä Freundin adjuvantissa, annetaan kuukauden välein ihonalaisia injektioita käyttäen. IT9302-vasta-aineen muodostuminen testataan immunologisella "dot-blot"-määrityksellä tai Western-blottauksella.

KIRJALLISUUSVIITTEET

1. Bendtzen K. Lymphokines in inflammation. Inflammation Basic Mechanisms Tissue Injuring Principles and Clinical Models (P Venge & A Lindbom eds) 1985; Almqvist & Wiksell International. Stockholm: 187-217.
2. Bendtzen K. Interleukin-1, Interleukin-6, and tumor necrosis factor in infection, inflammation and immunity. Immunol Lett 1988;19:183-192.
3. Larsen C.G. Leukocyte activating and chemotactic cytokines in cell-mediated immune reactions of the human skin. Acta Dermatovenerol. 1991; Suppl. 160:1-48
4. Fiorentino D. F., M. W. Bond, and T. R. Mosmann. 1989. Two types of mouse helper T cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. J. Exp. Med., 170:2081.
5. Viera P., R. de Wall-Malefyt, M.-N. Dang, K. E. Johnson, R. Kastelein, D. F. Fiorentiono, J. E. de Vries, M.-G. Roncarolo, T. R. Mosmann, and K. W. Moore. 1991. Isolation and expression of human cytokine synthesis inhibitory factor (CSIF/IL-10) cDNA clones: homology to Epstein-Barr virus open reading frame BCRFI. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 88:1172.
6. Moore, K.W., O'Garra A., de Waal Malefyt R., Vieira, Mosmann T.R. 1993. Interleukin-10, Annu Rev. Immunol, 11:165-90.
7. Kim, J.M., Brannan, C.I. Copeland N.G., Jenkins, N.A., Khan, T.A., Moore, K.W. 1992. Structure of the mouse interleukin-10 gene and chromosomal localization of the mouse and human genes. J. Immunol 148:3618-23.
8. Carter, D.B., Deibel, M.R-Jr, Dunn, C.J. et al. 1990. Purification, cloning, expression and biological characterization of an interleukin-1 receptor antagonist protein. NATURE 344:633-638.
9. Hannum, C.H., Wilcox, C.J., Arend, W.P. et al. 1990. Interleukin-1 receptor antagonist activity of a human interleukin-1 inhibitor. Nature 343:336-40.

10. Firestein, G.S., Boyle, D.L., Yu, C., et al. 1994. Synovial interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 balance in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 37:644-652.

11. Fisher, C.J.-Jr.,Slotman, G.J., Opal, S.M., Pribble, J.P. et al. 1994. Initial evaluation of recombinant interleukin-1 receptor antagonist in the treatment of sepsis syndrome: a randomized, open-label, placebo-controlled multicenter trial. The IL-1RA Sepsis Syndrome Study Group. Crit-Care-Med. 22:12-21.

12. de Waal-Malefyt, R., Haanen J., Spits, H., et al. 1991. IL-10 and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via down-regulation of class II MHC expression. J. Exp. Med. 174:915-24.

13. Gazzinelli, R.T., Oswald, I.P., James, S.L., Sher, A., 1992. IL-10 inhibits parasite killing and nitric oxide production by IFN-\-activated macrophages. J. Immunol. 148:1792-96.

14. Jinquan, T., Larsen, C.G., Gesser, B., Matsushima, K., Thestrup-Pedersen, K. 1993. Human IL-10 is a chemoattractant for CD8+ T lymphocytes and an inhibitor of IL-8- induced CD4+ T lymphocyte Migration. Journal of Immunology, 151:4545-4551.

15. Rousset F., E. Garcia, T. Defrance, C. Peronne, D.-H. Hsu, R. Kastelein, K. W. Moore, and J. Banchereau. 1992. IL-10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 175:671.

16. Howard, M., O'Garra, A., Ishida, H., de Waal Malefyt, R., de Vries, J. 1992. Biological properties of Interleukin-10. J. Clin. Immunol 12:239-47.

17. Kuhn, R., Lohler, J., Rennick, D., Rajewsky, K., Muller, W. 1993. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. Cell 75: 263-74.

18. Sher, A., Fiorentino, D.F., Caspar, P., Pearce, E., Mosmann, T. 1991. Production of IL-10 by CD4+ lymphocytes correlates with down-regulation of Th1 cytokine

synthesis in helminth infection. J. Immunol. 147:2713-16.

19. Clerici, M., Shearer, G.M. 1993 Immunology Today. 14:107-111.

20. Bry, K., Lappalainen, U. 1994. Interleukin-4 and transforming growth factor-beta 1 modulate the production of interleukin-1 receptor antagonist and prostaglandin E2 by decidual cells. Am-J-obstet-Gynecol 170 (4): 1194-1198

21. Firestein, G., S., Boyle, D. L., Yu, C., Paine, M. M., Whisenand, T. D., Zvaifler, N. J., Arend, W. P. 1994. Synovial interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 balance in rheumatoid arthritis. Arthritis-Rheum, 37/5: 644-652

22. Roberge, C. J., De-Medicis, R., Dayer, J. M., Rola-Pleszcyczynski, M., Naccahe, P. H., Poubelle, P. E. 1994. Crystal-induced neutrophil activation: V. Differential production of biologically active IL-1 receptor antagonist. J. Immunol 152/11: 5485-5494

23. McCall, R. D., Haskill, S., Zimmermann, E. M., Lund, P. K., Thompson, R. C., Sartor, R. B. 1994. Tissue interleukin 1 and interkeukin-1 receptor antagonist expression in entercolitis in resistant and susceptible rats. Gastroenterology (4): 960-72

25. Kimble, R. B., Vannice, J. L, Bloedow, D. C., Thompson, R. C., Hopfer, W., Kung, V. T., Brownfield, C., Pacifici, R. 1994. Interleukin-1 receptor antagonist decreases bone loss and bone resorption in ovariectomized rats. J. Clin Invest. 93/5: 1959-1967

26. Kline, J. N., Geist, L. J., Monick, M. M., Stinski, M. F., Hunninghake, G. W., 1994. J. Immunol. 152 (5): 2351-7

27. Tompkins, R. G. 1994. Human recombinant interleukin-1 receptor antagonist in the treatment of sepsis syndrome (editorial; comment). Crit-Care-Med. 22 (1): 3, 22 (1):12-21

28. Everaerdt, B., Brouckaert, P., Fiers, W. 1994. Recombination IL-1 receptor antagonist protects against TNF-induced lethality in mice. J. Immunol. 152/10: 5041-5049

29. Fischer, C. J. Jr., Slotman, G. J., Opal, S. M., Pribble, J. P., Bone, R. C., Emmanuel, G., Ng, D., Bloedow, D. C., Catalano, M. A. 1994. Initial evalutaion of human recombination interleukin-1 receptor antagonist in the treatment of sepsis syndrome: a randomized, open-label, placebo-controlled multicenter trial. The IL-1RA Sepsis Syndrome Study Group (see comments). Crit-Care-Med. 22(1): 12-21, 22(1): 3

30. Gomez-Reino-Carnoto, J. J. 1994. New terapies in rheumatoid arthritis. Med-Clin 543-545.

32. Nishihara, T., Ohsaki, Y., Ueda, N., Saito, N., Mundy, G. R. 1994. Mouse interleukin-1 receptor antagonist induced by actinobacillus actinomycetemcomitans lipopolysaccharide blocks the effects of interleukin-1 om bone resorption and osteoclast-like cell formation. Infect-Immun. 62(2): 390-7

33. Simon, C., Frances, A., Piquette, G. N., el-Danasouri, I., Zurawski, G., Dang, W., Polan, M. L. 1994. Embryonic implantation in mice is blocked by interleukin-1 receptor antagonist (see comments). Endocrinology. 134(2): 521-8, 134(2): 519-20

34. Baergen, R., Benirschke, K., Ulich, T. R., 1994. Cytokine expression in the placenta. The role of interleukin 1 and interleukin 1 receptor antagonist expression in chorioamnionitis and parturition. Arch-Pathol-Lab-Med. 118(1): 52-5

35. Tang, W.W., Feng, L., Vannice, J. L., Wilson, C. B. 1994. Interleukin-1 receptor antagonist ameliorates experimental antiglomerular basement membrane antibody-associated flomeulonephritis. J. Clin-Invest. 93(1): 279-9.

36. Cassatella, M. A., Meda, L., Gasperini, S., Calzetti, F., Bonara, S. 1994.

37. Interleukin 10 (IL-10) upregulates IL-1 receptor antagonist production from lipopolysaccharide-stimulated human

polymorphonuclear leukocytes by delaying mRNA degradation. J. Exp-Med. 179/5: 1695-1699

38. Mancini, R., Bendetti, A., Jezequel, A. M. 1994. An interleukin-1 receptor antagonist decreases fibrosis induced by dimethylnitrorsamine in rat liver. Virchows-Arch. 424/1: 25-31

39. Lukacs, N. W., Kunkel, S. L., Burdick, M. D., Lincoln, P. M., Strieter, R. M. 1993.

40. Interleukin-1 receptor antagonist blocks chemokine production in the mixed lymphocyte reaction. Blood. 82(12): 3668-74

41. Bandara, G., Mueller, G. M., Galea-Lauri, J., Tindal, M. H., Georgescu, H. I., Suchanek, M. K., Hung, G. L., Gloriso, J. C., Robbins, P. D., Evans, C. H. 1993.

42. Intraarticular expression of biologically active interleukin 1-receptor-antagonist protein by ex vivo transfer. Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A. 90(22): 10764-8

43. Dinarello, C. A. 1994. Anti-interleukin-1 strategies in the treatment of the septic shock syndrome. Can-J-infect-Dis. 5(suppl. A): 9A-16A

44. Oelmann, E., Topp, M. S., Reufi, B., Papadimitriiou, C., Koeningsmann, M., Oberberg, D., Thiel, E., Berdel, W. E. 1994. Int-J-Oncol. 4/3: 555-558

45. Estrov, Z. 1993. Interruption of autocrine and paracrine growth-stimolatory mechaisms: a new therapeutic stratefy for chronic myelogenous leukemia. Semin-Hematol. 30(3 suppl 3): 35-6

46. Wooley, P.H., Whalen, J.D., Chapman, D.L., Berger, A.E., Richard, K.A., Aspar, D.G., Staite, N.D. 1993. The effect of an interleukin-1 receptor antagonist protein on type II collagen-induced arthritis and antigen-induced arthritis in mice. Arthritis Rheum. 36 (9): 1305-1314

47. Peterson, C.M., Hales, H.A., Hatasaka, H.H., Mitchell, M.D., Rittenhouse, L., Jones, K.P. 1993. Interleukin-1 beta (IL-1 beta) modulates prostaglandin production and the natural IL-1 receptor antagonist inhibits ovulation

in the optimally stimulated rat ovarian perfusion model. Endocrinology 133 (5): 2301-2306

48. Estrov, Z., Kurzrock, R., Talpaz, M. 1993. Role of interleukin-1 inhibitory molecules in therapy of acute and chronic myelogenous leukemia. Leuk. Lymphoma 10 (6): 407-418

49. Chensue, S.W., Bienkowski, M., Eessalu, T.E., Warmington, K.S., Hershey, S.D., Lukacs, N.W., Kunkel, S.L. 1993. nous IL-1 receptor antagonist protein (IRAP) regulates schistosome egg granuloma formation and the regional lymphoid response. J. Immunol. 151 (7): 3654-3662

50. Bowyer, J.F., Davies, D.L., Schmued, L., Broening, H.W., Newport, G.D., Slikker, W Jr., Holson, R.R. 1994. Further studies of the role f hyperthermia in methamphetamine neurotoxicity. J. Pharmacol. Exp. Ther. 268/3: 1571-1580

51. Cole, O.F., Sullivan, M.H.F., Elder, M.G. 1993. The 'interleukin-1 receptor antagonist' is a partial agonist of prostaglandin synthesis by human decidual cells. Prostaglandins 46/6: 493-498

52. Jenkins, J.K., Arend, W.P. 1993. Interleukin 1 receptor antagonist production in human monocytes is induced by IL-1alpha, IL-3, and IL-4 and GM-CSF. Cytokine 5/5: 407-415

53. Coceani, F., Lees, J., Redford, J., Bishai, I. 1992. Interleukin-1 receptor antagonist: effectiveness against interleukin-1 fever. Can. J. Pharmacol. 70 (12): 1590-1596

54. Schiro, R., Longoni, D., Rossi, V., Maglia, O., Doni, A., Arsura, M., Carrara, G., Masera, G., Vannier, E., Dinarello, C.A., Rambaldi, A., Biondi, A. 1994. Suppression of juvenile chronic myelogenous leukemia colony growth by interleukin-1 receptor antagonist. Blood 83/2: 460-465

55. Watson, M.L., Smith, D., Bourne, A.D., Thompson, R.C., Westwick, J. 1993. Cytokines contribute to airway dysfunction hyperreactivity, pulmonary eosinophil accumula-

tion and tumor necrosis factor generation by pre-treatment with an interleukin-1 receptor antagonist. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 8 (4): 365-369

56. Abhyankar, S., Gilliland, D.G., Ferrara, J.L.M. 1993. Interleukin-1 is a critical effector molecule during cytokine dysregulation in graft-versus-host disease to minor histocompatibility antigens. Transplantation 56/6: 1518-1523

57. Lan, H.Y., Nikolic Paterson, D.J., Zarama, M., Vannice, J.L., Atkins, R.C. 1993. Suppression of experimental crescentic glomerulonephitis by the interleukin-1 receptor antagonist. Kidney Int. 43 (2): 479-485

58. Herve, P. 1993. Prevention and treatment of acute GvHD - New modalities. Nouv. Rev. Fr. Hematol. 35/3: 295-297

59. Conti, P., Panara, M.R., Barbacane, R.C., Placido, F.C., Bongrazio, M., Reale, M., Dempsey, R.A., Fiore, S. 1992. Blocking the interleukin-1 receptor inhibits leukotriene B4 and prostaglandin E2 generation in human monocyte cultures. Cell Immunol. 145 (1): 199-209

60. Kristensen, M., Deleuran, B., Eedy, D.J., Feldmann, M., Breathnach, S.M., Brennan, F.M. 1992. Distribution of interleukin-1 receptor antagonist protein (IRAP), interleukin-1 receptor, and interleukin-1 alpha in normal and psoriatic skin, Decreased expression of IRAP in psoriatic lesional epidermis. Br. J. Dermatol. 127 (4): 305-311

6.1 Romero, R., Sepulveda, W., Mazor, M., Brandt, F., Cotton, D.B., Dinarello, C.A:, Mitchell, M.D. 1992. The natural interleukin-1 receptor antagonist in term and pre-term parturition. Am. J. Obstet. Gynecol. 167 (4 Pt 1): 863-872

62. Dinarello, C.A. 1992. Reduction of inflammation by decreasing production of interleukin-1 or by specific receptor antagonism. Int. J. Tissue. React. 14 (2): 65-75

63. Conti, P., Panara, M.R., Barbacane, R.C., Bongrazio, M:, Dempsey, R.A., Reale, M. 1993. Human recombinant IL.1 receptor antagonist (IL-1Ra) inhibits leukotriene B4

generation from human monocyte suspensions stimulated by lipopolysaccharide (LPS). Clin. Exp. Immunol. 91/3: 526-531

64. DeForge, L.E., Tracey, D.E., Kenney, J.S., Remick, D.G. 1992. Interleukin-1 receptor antagonist protein inhibits interleukin-8 expression in lipopolysaccharide-stimuled human whole blood. Am. J. Pathol. 140 (5): 1045-1054

65. Porat, R., Poutsiaka, D.D., Miller, L.C., Granowitz, E.V., Dinarello, C.A. 1992. Interleukin-1 (IL-1) receptor blockade reduces endotoxin and Borrealia burgdorferi-stimulated IL-8 synthesis in human monoclear cells. Faseb. J. 6 (7): 2482-2486

66. Boermeester, M.A., van Leeuwen, P.A.M., Schneider, A.J., Houdijk, A.P.J., Ferwerda, C.C., Wesdorp, R.I.C. 1993. Interleukin-1 receptor antagonist: A new therapeutic agent in the treatment of septic syndrome. Ned. Tijdschr. Geneesks. 137/7: 337-342

67. Smith, R.J., Chin, J.E., Sam, L.M., Justen, J.M. 1991. Biologic effects of an interleukin-1 receptor antagonist protein on interleukin-1-stimulated cartilage erosion and chondrocyte responsiveness. Arthsitis Rheum. 34 (1): 78-83

68. Conti, P. Barbacane, R.C., Panara, M.R., Reale, M., Placido, F.C., Fridas, S., Bongrazio, M., Dempsey, R.A. 1992. Human recombinant interleukin-1 receptor antagonist (hrIL-1ra) enhances the stimulatory effect of interleukin-2 on natural killer cell activity against MOLT-4 target cells. Int. J. Immunopharm. 14/6: 987-993

69. Selig, W., Tocker, J. 1992. Effect of interleukin-1 receptor antagonist on antigen-induced pulmonary responses in guinea pigs. Eur. J. Pharmacol. 213/3: 331-336

70. McCarthy, P.L. Jr., Abhyankar, S., Neben, S., Newman, G., Sieff, C., Thompson, R.C., Burakoff, S.J., Ferrara, J.L.M. 1991. Inhibition of interleukin-1 by an interleukin-1 receptor antagonist prevents graft-versus-host diseases.Blood 78/8: 1915-1918

71. Estrov, Z, Kurzrock, R., Wetzler, M., Kantarjian, H., Blake, M., Harris, D., Gutterman, J.U., Talpaz, M. 1991.

Suppression of chronic myelongenous leukemia colony growth by interleukin-1 (IL-1) receptor antagonist and soluble IL-1 receptors: A novel application for inhibitors of IL-1 activity. Blood 78/6: 1476-1484

72. Thomas, T.K., Will, P.C., Srivastava, A., Wilson, C.L., Harbison, M., Little, J., Chesonis, R.S., Pignatello, M., Schmolze, D., Symington, J., Kilin, P.L., Thompson, R.C. 1991. Evaluation of an interleukin-1 receptor antagonist in the rat acetic acid-induced colitis model. Agents Actions 34/1-2: 187-190

73. Carter, D.B., Deibel, M.R. Jr., Dunn, C.J., Tomich, C.S.C., Laborde, A.L., Slightom, J.L., Berger, A.E., Bienkowski, M.J., Sun, F.F., McEwan, R.N., Harris, P.K.W., Yem, A.W., Waszak, G.A., Chosay, J.G., Sieu, L.C., Hardee, M.M., Zurcher Neely, H.A., Reardon, I.M., Heinrikson, R.L. et al. 1990. Purification, cloning expression and biological characterization of an interleukin-1 receptor antagonist protein. Nature 344/6267: 633-638

74. Larsen C.G, Anderson A.O, Apella E., Oppenheim J.J., Matsushima K., 1989. Science 243:1464;

75. Larsen C.G., Jinquan T., Deleurant B., Thestrup-Pedersen K. 1993, IL-10 is a potent regulator of the chemotactic response of mononuclear cells, but not of granulocytes. J. Invest. Dermatol. Vol 100, No 6

76. Sankoff and Kruskal in chapter 1 of "Time Warps, String Edits, and Macromolecules: The Theory and Practice of Sequence Comparison" (Addison-Wesley, Reading, Mass. 1983).

77. Berzofsky, *Science* 229, (1985) 932-940

78. Bowie et al., *Science* 247, (1990) 1306-1310

79. Wasserman et al., *J. Immunol.* 87, 1961, 290-295

80. Levine et al., *Methods in Enzymology* 11, 1967, 928-936

81. Lewis et al., *Biochemistry* 22, 1983, 948-954

82. Rene de Waal Maletyt, John Abrahams, Bruce Bennet, Carl G. Figdor and Jan E. de Vries (1991), Interleukin 10 (IL-10) Inhibits Cytokine Synthesis by Human Monocytes:

An Autoregulatory Role of IL-10 Produced by Monocytes. *J. Exp. Med.* 174, 1209-1220

83. Szoka et al., *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 9, 1980, 467
84. US Patent No. 4,235,871
85. US 4,501,728
86. US 4,837,028.
87. Walter H. Gotlieb, John S. Abrams, Joanna M. Watson, Thierry J. Velu, Jonathan S. Berek, Otoniel Martinez-Meza (1992), Presence of interleukin 10 (IL-10) in the ascites of patients with ovarian and other intra-abdominal cancers. *Cytokine* 4, No. 5, 385-390
88. Blancho G., P. Gianello, Sh. Germana, M. Baetscher, D.H. Sachs and Chr. LeGuern (1995), Molecular identification of porcine interleukin 10: Regulation of expression in kidney allograf model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 2800-2804

SEKVENSSILISTAUS

(1) YLEISET TIEDOT:

(i) HAKIJA:
(A) NIMI: Nycomed DAK A/S
(B) KATU: P.O. Box 1911, Lergraversvej 59
(C) KAUPUNKI: Copenhagen S
(E) MAA: Denmark
(F) POSTIKOODI (ZIP): 2300

(ii) KEKSINNÖN NIMITYS: Immunomodulaattoreita

(iii) SEKVENSSIEN LUKUMÄÄRÄ: 23

(iv) KONEKOODIMUOTO:
(A) VÄLINETYYPPI: Floppy disk
(B) TIETOKONE: IBM PC compatible
(C) KÄYTTÖJÄRJESTELMÄ: PC-DOS/MS-DOS
(D) OHJELMISTO: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPO)

(2) SEKVENSSIN NRO 1 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 9 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(C) JUOSTEISUUS:
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI NRO 1:

Ala Tyr Met Thr Met Lys Ile Arg Asn
1 5

(2) SEKVENSSIN NRO 2 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 9 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(C) JUOSTEISUUS:
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI NRO 2:

Ala Tyr Met Thr Ile Lys Met Arg Asn
1 5

(2) SEKVENSSIN NRO 3 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 9 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(C) JUOSTEISUUS:
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI NRO 3:

Ala Phe Met Thr Leu Lys Leu Arg Asn
1 5

(2) SEKVENSSIN NRO 4 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 9 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(C) JUOSTEISUUS:
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI NRO 4:

Ala Tyr Met Thr Met Lys Val Arg Glu
1 5

(2) SEKVENSSIN NRO 5 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 9 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(C) JUOSTEISUUS:
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI NRO 5:

Gly Tyr Met Thr Met Lys Ile Arg Asp
1 5

(2) SEKVENSSIN NRO 6 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 9 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(C) JUOSTEISUUS:
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI NRO 6:

Ala Phe Met Thr Met Lys Ile Arg Asp
1 5

(2) SEKVENSSIN NRO 7 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 9 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(C) JUOSTEISUUS:
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI NRO 7:

Ala Tyr Ile Thr Met Lys Ile Arg Asp
1 5

(2) SEKVENSSIN NRO 8 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 9 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(C) JUOSTEISUUS:
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI NRO 8:

Ala Tyr Leu Thr Met Lys Ile Arg Asp
1 5

(2) SEKVENSSIN NRO 9 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 9 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(C) JUOSTEISUUS:
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI NRO 9:

Ala Tyr Val Thr Met Lys Ile Arg Asp
1 5

(2) SEKVENSSIN NRO 10 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 9 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(C) JUOSTEISUUS:
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI NRO 10:

Ala Tyr Met Thr Ile Lys Ile Arg Asp
1 5

(2) SEKVENSSIN NRO 11 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 9 aminohapoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(C) JUOSTEISUUS:
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI NRO 11:

Ala Tyr Met Thr Leu Lys Ile Arg Asp
1 5

(2) SEKVENSSIN NRO 12 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 9 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(C) JUOSTEISUUS:
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI NRO 12:

Ala Tyr Met Thr Val Lys Ile Arg Asp
1 5

(2) SEKVENSSIN NRO 13 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 9 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(C) JUOSTEISUUS:
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI NRO 13:

Ala Tyr Met Thr Met Lys Ile Arg Asp
1 5

(2) SEKVENSSIN NRO 14 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 9 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(C) JUOSTEISUUS:
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI NRO 14:

Ala Tyr Met Thr Met Lys Met Arg Asp
1 5

(2) SEKVENSSIN NRO 15 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 9 aminohapoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(C) JUOSTEISUUS:
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI NRO 15:

Ala Tyr Met Thr Met Lys Val Arg Asp
1 5

(2) SEKVENSSIN NRO 16 TIEDOT

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 9 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(C) JUOSTEISUUS:
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI NRO 16:

Ala Tyr Met Thr Met Lys Ile Asp Gln
1 5

(2) SEKVENSSIN SEKVENSSI NRO 17 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 9 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(C) JUOSTEISUUS:
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI NRO 17:

Ala Tyr Met Thr Met Lys Ile Asp Glu
1 5

(2) SEKVENSSIN NRO 18 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 9 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(C) JUOSTEISUUS:
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI NRO 18:

Ser Pro Gly Gln Gly Thr Gln Ser Glu
1 5

(2) SEKVENSSIN NRO 19 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 6 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(C) JUOSTEISUUS:
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI NRO 19:

Thr Xaa Lys Xaa Arg Xaa
1 5

(2) SEKVENSSIN NRO 20 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 7 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(C) JUOSTEISUUS:
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI NRO 20:

Xaa Thr Xaa Lys Xaa Arg Xaa
1 5

(2) SEKVENSSIN SEKVENSSI 21 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 8 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(C) JUOSTEISUUS:
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI NRO 21:

Xaa Xaa Thr Xaa Lys Xaa Arg Xaa
1 5

(2) SEKVENSSIN SEKVENSSI NRO 22 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 9 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(C) JUOSTEISUUS:
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI NRO 22:

Xaa Xaa Xaa Thr Xaa Lys Xaa Arg Xaa
1 5

(2) SEKVENSSIN SEKVENSSI 23 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 27 base pairs
(B) TYYPPI: akinohappo
(C) JUOSTEISUUS: single
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI NRO 23:

GCCTACATGA CAATGAAGAT ACGAAAC 27

Patenttivaatimukset

1. Polpeptidi, jonka aminohappojen kokonaismäärä on 7 - 20, ja joka sisältää sekvenssin

Thr-X_4-Lys-X_5-Arg-X_6 (sekvenssi nro 19)

jossa

X_4 ja X_5 voivat olla toisistaan riippumatta Met, Ile, Leu tai Val, ja

X_6 voi olla Asn, Asp, Gln tai Glu, ja jolla on yksi tai useampi seuraavista ominaisuuksista:

a) indusoi inhibition ihmisen monosyyttien spontaanille IL-8:n tuotannolle,

b) indusoi inhibition ihmisen perifeerisen veren mononukleaaristen solujen (PBMC) IL-1β:lla indusoidulle IL-8:n tuotannolle,

c) indusoi ihmisen monosyyttien interleukiini-1-resptoriantagonistiproteiinin (IRAP) tuotannon,

d) indusoi ihmisen CD8+-T-lymfosyyttien kemotaktisen migraation *in vitro*,

e) epäherkistää ihmisen CD8+-T-soluja johtaen vasteen alenemiseen rhIL-10:lle,

f) suppressoi ihmisen CD4+-T-lymfosyyttien kemotaktista vastetta IL-8:lle,

g) suppressoi ihmisen monosyyttien kemotaktista vastetta MCAF:lle/MCP-1:lle,

h) ei inhiboi luokan II MHC-molekyylien ekspressiota ihmisen monosyytteissä, toisin kuin ihmisen IL-10,

i) indusoi viljeltyjen, normaalien ihmisen CD4+-T-solujen IL-4:n tuotannon,

j) vähentää TNFα:n tuotantoa ihmisen lymfosyyttien sekoitusreaktiossa.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen polypeptidi, t u n n e t t u siitä, että se sisältää sekvenssin

X_3-Thr-X_4-Lys-X_5-Arg-X_6 (sekvenssi nro 20)

jossa

X_3, X_4 ja X_5 voivat olla toisistaan riippumatta Met, Ile, Leu tai Val, ja

X_6 voi olla Asn, Asp, Gln tai Glu.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen polypeptidi, t u n n e t t u siitä, että se sisältää sekvenssin

X_2-X_3-Thr-X_4-Lys-X_5-Arg-X_6 (sekvenssi nro 21)

jossa

X_2 on Tyr tai Phe,

X_3, X_4 ja X_5 voivat olla toisistaan riippumatta Met, Ile, Leu tai Val, ja

X_6 voi olla Asn, Asp, Gln tai Glu.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen polypeptidi, t u n n e t t u siitä, että se sisältää sekvenssin

X_1-X_2-X_3-Thr-X_4-Lys-X_5-Arg-X_6 (sekvenssi nro 22)

jossa

X_1 on Ala tai Gly,

X_2 on Tyr tai Phe,

X_3, X_4 ja X_5 voivat olla toisistaan riippumatta Met, Ile, Leu tai Val; ja

X_6 voi olla Asn, Asp, Gln tai Glu.

5. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 1 - 4 mukainen polypeptidi, t u n n e t t u siitä, että se sisältää vähintään 12 aminohappoa.

6. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 1 - 4 mukainen polypeptidi, t u n n e t t u siitä, että se sisältää vähintään 15 aminohappoa.

7. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 1 - 4 mukainen polypeptidi, t u n n e t t u siitä, että se sisältää vähintään 11 aminohappoa.

8. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 1 - 4 mukainen polypeptidi, t u n n e t t u siitä, että se sisältää vähintään 10 aminohappoa.

9. Polpeptidi, jolla on kaava

X_1-X_2-X_3-Thr-X_4-Lys-X_5-Arg-X_6 (sekvenssi nro 22)

jossa

X_1 on Ala tai Gly,

X_2 on Tyr tai Phe,

X_3, X_4 ja X_5 voivat olla toisistaan riippumatta Met, Ile, Leu tai Val, ja

X_6 voi olla Asn, Asp, Gln tai Glu.

10. Polypeptidi, jolla on kaava

X_2-X_3-Thr-X_4-Lys-X_5-Arg-X_6 (sekvenssi nro 21)

jossa

X_2 on Tyr tai Phe,

X_3, X_4 ja X_5 voivat olla toisistaan riippumatta Met, Ile, Leu tai Val, ja

X_6 voi olla Asn, Asp, Gln tai Glu.

11. Polypeptidi, jolla on kaava

X_3-Thr-X_4-Lys-X_5-Arg-X_6 (sekvenssi nro 20)

jossa

X_3, X_4 ja X_5 voivat olla toisistaan riippumatta Met, Ile, Leu tai Val, ja

X_6 voi olla Asn, Asp, Gln tai Glu.

12. Polypeptidi, jolla on kaava

Thr-X_4-Lys-X_5-Arg-X_6 (sekvenssi nro 19)

jossa

X_4 ja X_5 voivat olla toisistaan riippumatta Met, Ile, Leu tai Val, ja

X_6 voi olla Asn, Asp, Gln tai Glu, sillä edellytyksellä, että polypeptidi ei ole Thr-Met-Lys-Ile-Arg-Asn.

13. Ala-Tyr-Met-Thr-Met-Lys-Ile-Arg-Asn.

14. Polypeptidi, joka voi olla
Ala-Tyr-Met-Thr-Ile-Lys-Met-Arg-Asn (sekvenssi nro 2),
Ala-Phe-Met-Thr-Leu-Lys-Leu-Arg-Asn (sekvenssi nro 3),
Ala-Tyr-Met-Thr-Met-Lys-Val-Arg-Glu (sekvenssi nro 4),
Gly-Tyr-Met-Thr-Met-Lys-Ile-Arg-Asp (sekvenssi nro 5),
Ala-Phe-Met-Thr-Met-Lys-Ile-Arg-Asp (sekvenssi nro 6),
Ala-Tyr-Ile-Thr-Met-Lys-Ile-Arg-Asp (sekvenssi nro 7),
Ala-Tyr-Leu-Thr-Met-Lys-Ile-Arg-Asp (sekvenssi nro 8),
Ala-Tyr-Val-Thr-Met-Lys-Ile-Arg-Asp (sekvenssi nro 9),
Ala-Tyr-Met-Thr-Ile-Lys-Ile-Arg-Asp (sekvenssi nro 10),
Ala-Tyr-Met-Thr-Leu-Lys-Ile-Arg-Asp (sekvenssi nro 11),
Ala-Tyr-Met-Thr-Val-Lys-Ile-Arg-Asp (sekvenssi nro 12),
Ala-Tyr-Met-Thr-Met-Lys-Ile-Arg-Asp (sekvenssi nro 13),
Ala-Tyr-Met-Thr-Met-Lys-Met-Arg-Asp (sekvenssi nro 14),
Ala-Tyr-Met-Thr-Met-Lys-Val-Arg-Asp (sekvenssi nro 15),
Ala-Tyr-Met-Thr-Met-Lys-Ile-Arg-Gln (sekvenssi nro 16) tai
Ala-Tyr-Met-Thr-Met-Lys-Ile-Arg-Glu (sekvenssi nro 17).

15. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 1 - 14 mukainen aine tai polypeptidi oleellisesti puhtaassa muodossa.

16. Aine tai polypeptidi, joka käsittää missä tahansa patenttivaatimuksista 1 - 14 määritellyn mukaisen aminohapposekvenssin, sillä edellytyksellä, että aine tai polypeptidi ei ole ihmisen IL-10.

17. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 1 - 14 mukaista polypeptidiä koodittava nukleotidisekvenssi.

18. Vasta-aine, joka sitoutuu spesifisesti minkä tahansa patenttivaatimuksista 1 - 14 mukaiseen aineeseen tai polypeptidiin.

19. Vasta-aine, joka sitoutuu spesifisesti polypeptidiin, jolla on aminohapposekvenssi sekvenssi nro 1.

20. Patenttivaatimuksen 18 tai 19 mukainen vasta-aine, t u n n e t t u siitä, että se on polyklonaalinen vasta-aine.

21. Patenttivaatimuksen 18 tai 19 mukainen vasta-aine, t u n n e t t u siitä, että se on monoklonaalinen vasta-aine.

22. Farmaseuttinen koostumus, t u n n e t t u siitä, että se käsittää minkä tahansa patenttivaatimuksista 1 - 16 mukaisen aineen tai polypeptidin.

23. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 1 - 16 mukaisen aineen tai polypeptidin käyttö farmaseuttisen koostumuksen valmistamiseksi yhden tai useamman sellaisen taudin hoitoa tai ennaltaehkäisyä varten, joka on jokin seuraavista: infektion tai muiden tilojen aiheuttama ennenaikainen synnytys, reumatoidiartriitti, Lymen artriitti, kihti, sepsisoireyhtymä, hypertermia, ulseratiivinen koliitti tai enterokoliitti, osteoporoosi, sytomegalovirus, periodontaalisairaudet, glomerulonefriitti, keuhkojen krooninen, ei-infektiivinen tulehdus (esim. sarkoidoosi ja tupakoijan keuhkot), granulooman muodostuminen, maksan fibroosi, keuhkojen fibroosi, siirrännäisen hyljintä, käänteishyljintä, krooninen myeloidinen leukemia, akuutti myeloidinen leukemia, muut neoplastiset taudit, keuhkoputkiastma, diabetes mellitus, tyyppi I (insuliinista riippuva), arteriosklerooosi/ateroskleroosi, psoriasis, krooninen B-lymfosyyttileukemia, CVI-tauti ("common variable immunodeficiency"), sivuvaikutukset käytettäessä muita biologisen vasteen muuttajia, disseminoitunut intravaskulaarinen koagulaatio, systeeminen skleroosi, enkefalomyeliitti, keuhkotulehdus, hyper-IgE-oireyhtymä, enterokoliitti, syövän etäpesäke ja kasvu, adoptiivinen immuuniterapia, hankittu hengitysvaikeusoireyhtymä, sepsis, reperfuusio-oireyhtymä, leikkauksen jälkeinen tulehdus, elinsiirto ja alopekia.

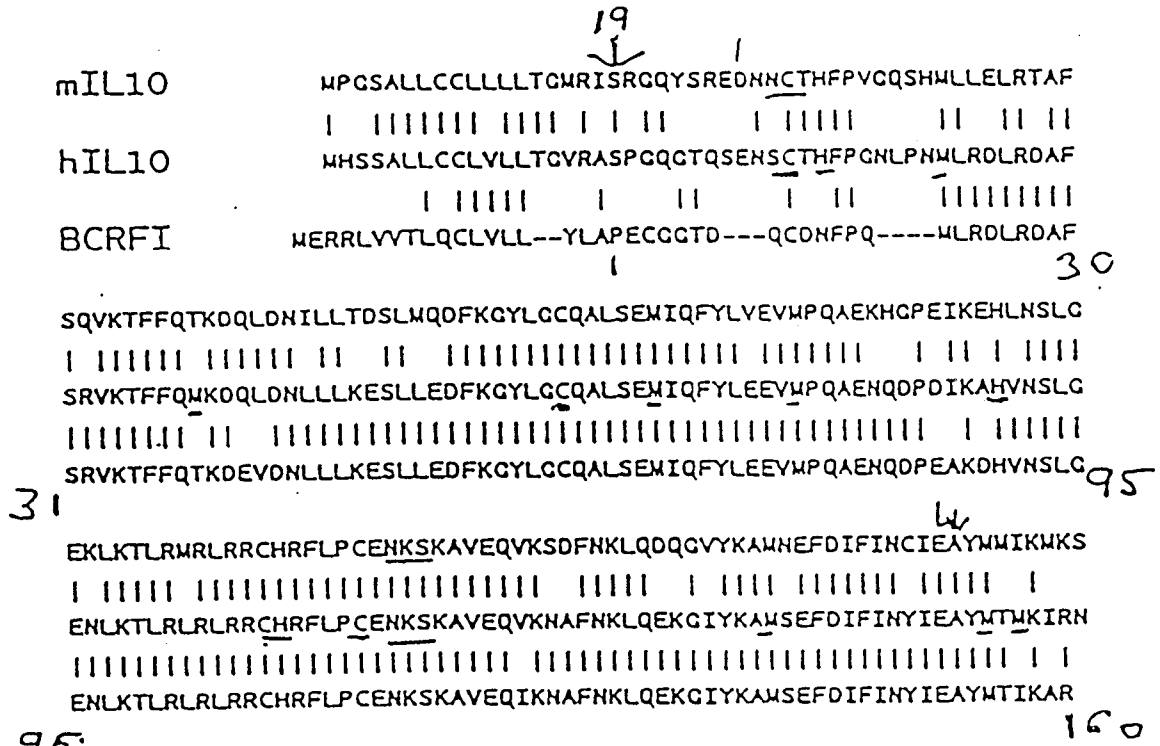


Fig. 1. mIL-10:n, hIL-10:n ja BCRFI:n ennustettujen aminohappo-sekvenssien vertailu. Aminohapposekvenssien identtisyyskohdat on ilmaistu pystyviivoin.

Fig. 1

IL-10:n COOH-terminaaliset polypeptidisekvenssit, joihin sisältyy 9 aminohappoa sian, ihmisen ja viruksen proteiineista.

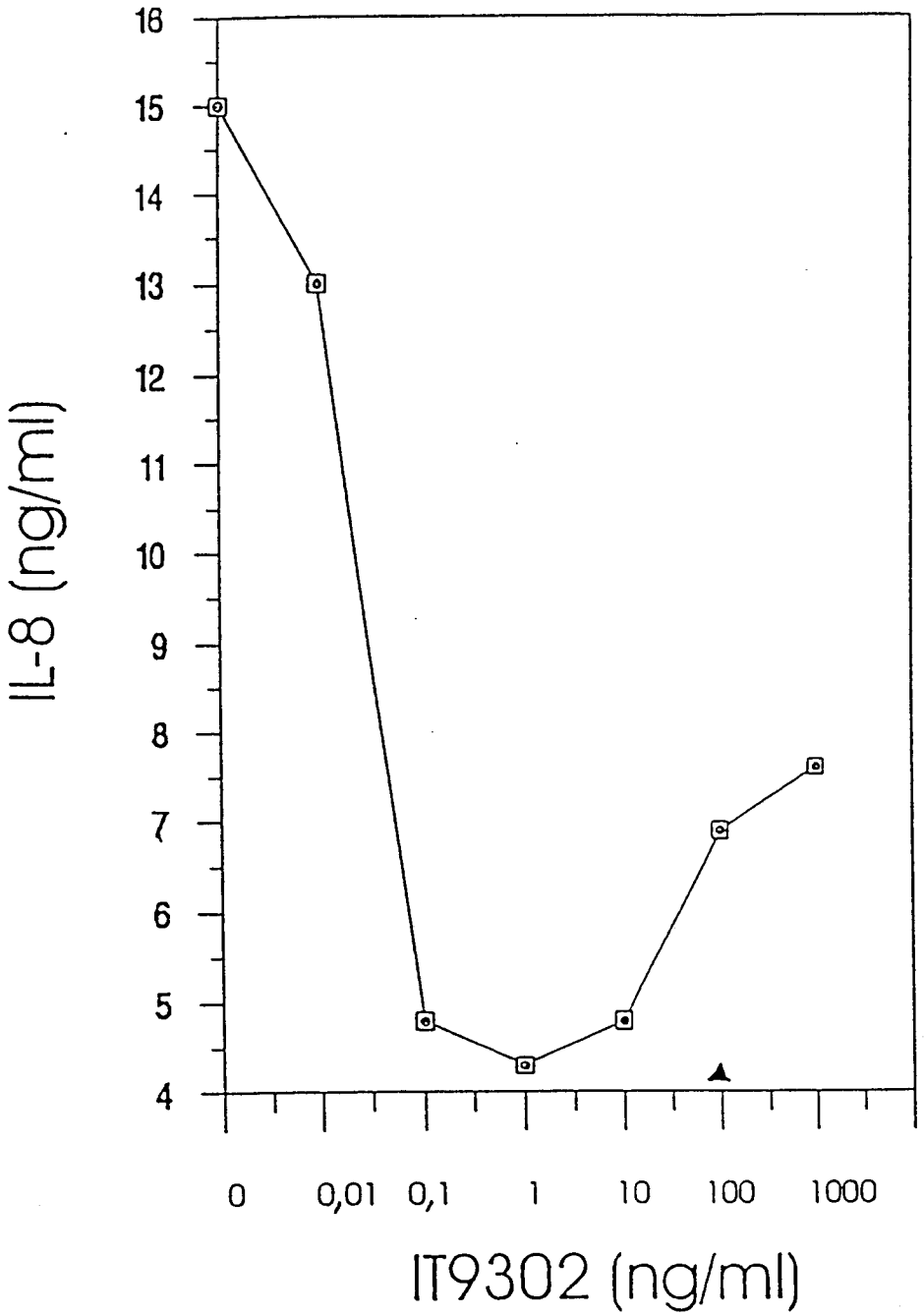
Sian IL-10 PIT	- A - Y - M -	T	- M -	K	- M -	R	- K - N			
Ihmisen IL-10 IT 9302	- A - Y - M -	T	- M -	K	- I -	R	- N			
BCRFI IL-10 VIT	- A - Y - M -	T	- I -	K	- A -	R	-			

*:llä merkityt aminohapot ovat avainasemassa reseptoriin sitoutumiselle ja ovat evoluutiossa hyvin konservoituneita. Vertaa alla olevaa hiiren IL-10:n aminohapposekvenssiä.

Hiiren IL-10	- A - Y - M -	M	- I -	K	- M -	K	- S			

Tästä sekvenssistä puuttuu homologia tärkeiden aminohappojen kanssa.

Fig. 2



IT9302 inhiboi puhdistettujen, viljeltyjen monosyyttien spontaania IL-8:n tuotantoa. (▲) osoittaa IL-8-tason, kun käytetään rhIL-10:tä (100 ng/ml).

Fig. 3

IT9302 inhiboi ihmisen perifeerisen veren mononukleaaristen solujen IL-1:llä (1 ng/ml) indusoitua IL-8:n tuotantoa

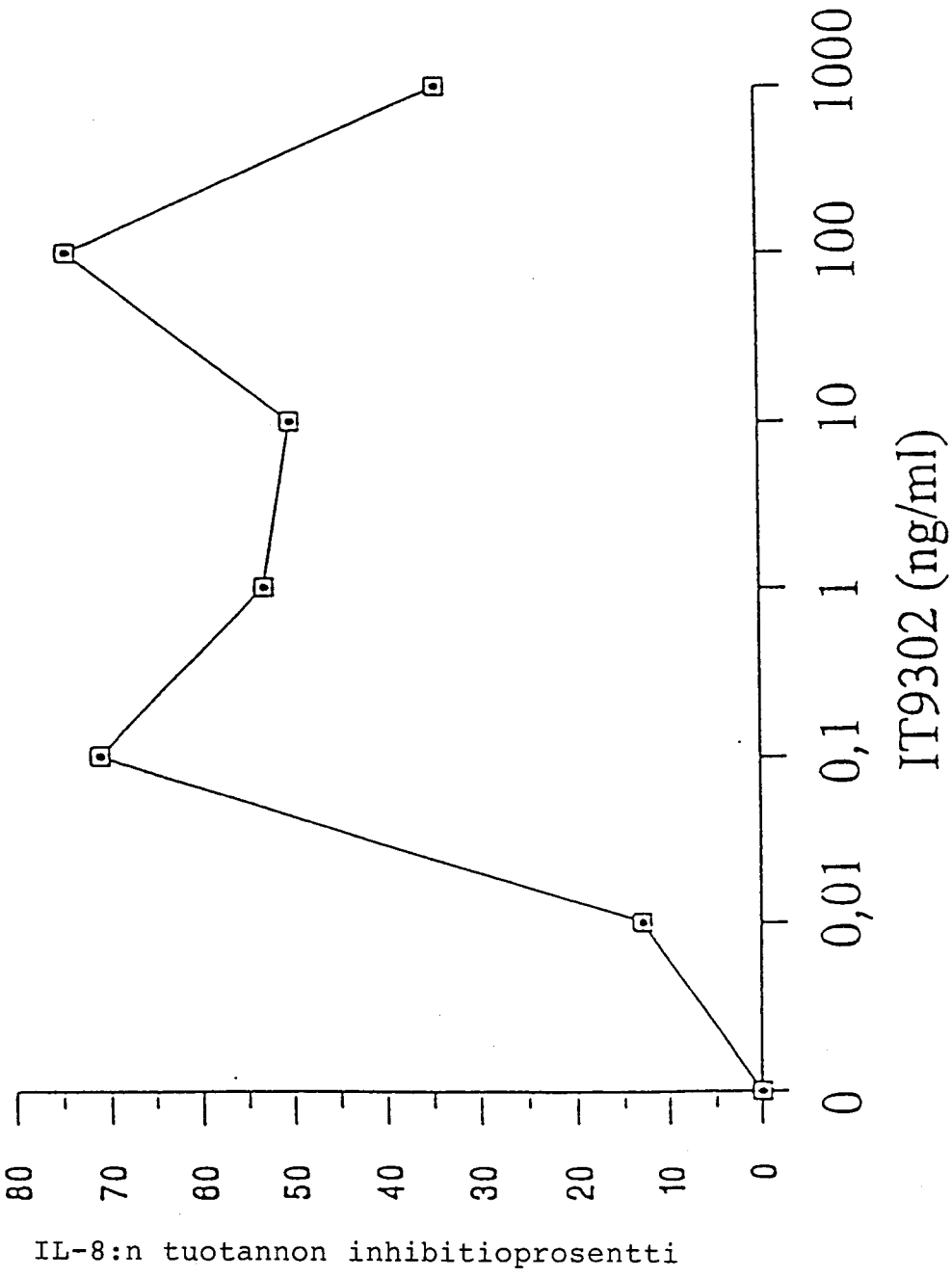


Fig. 4

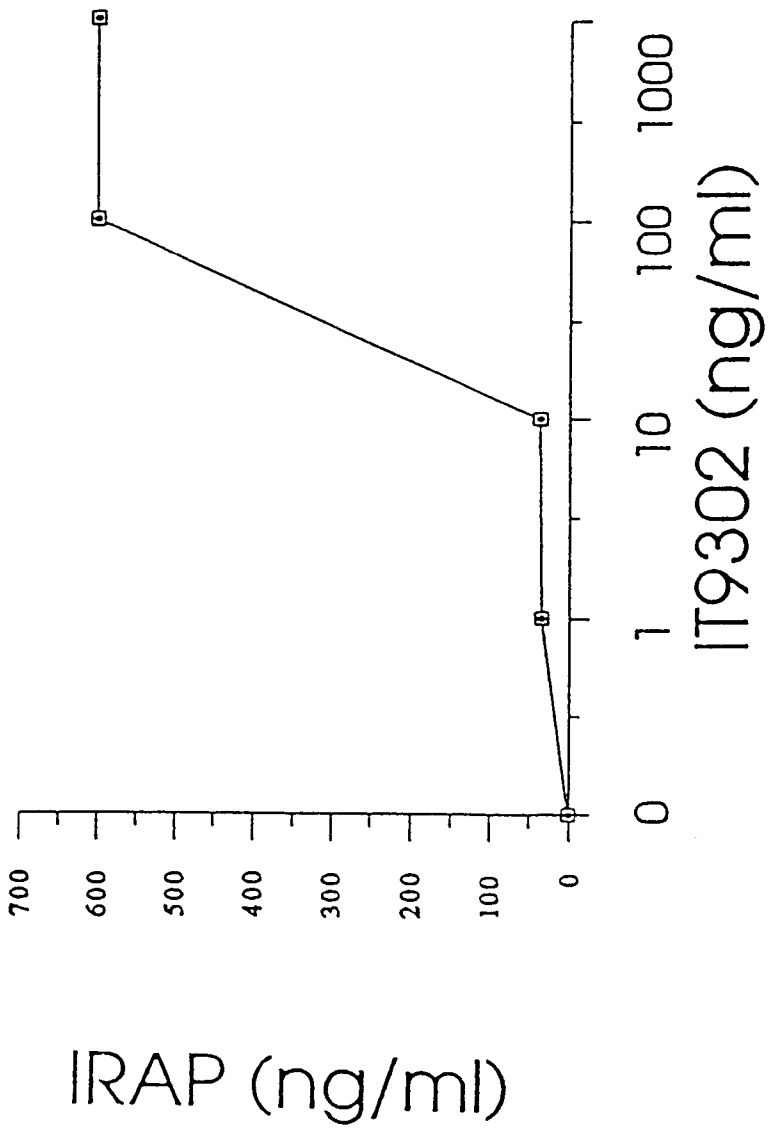

IT9302:lla stimuloidut ihmisen monosyytit
IRAP (ng/ml)
700
600
500
400
300
200
100
0
0
1
10
100
1000
IT9302 (ng/ml)

Fig. 5

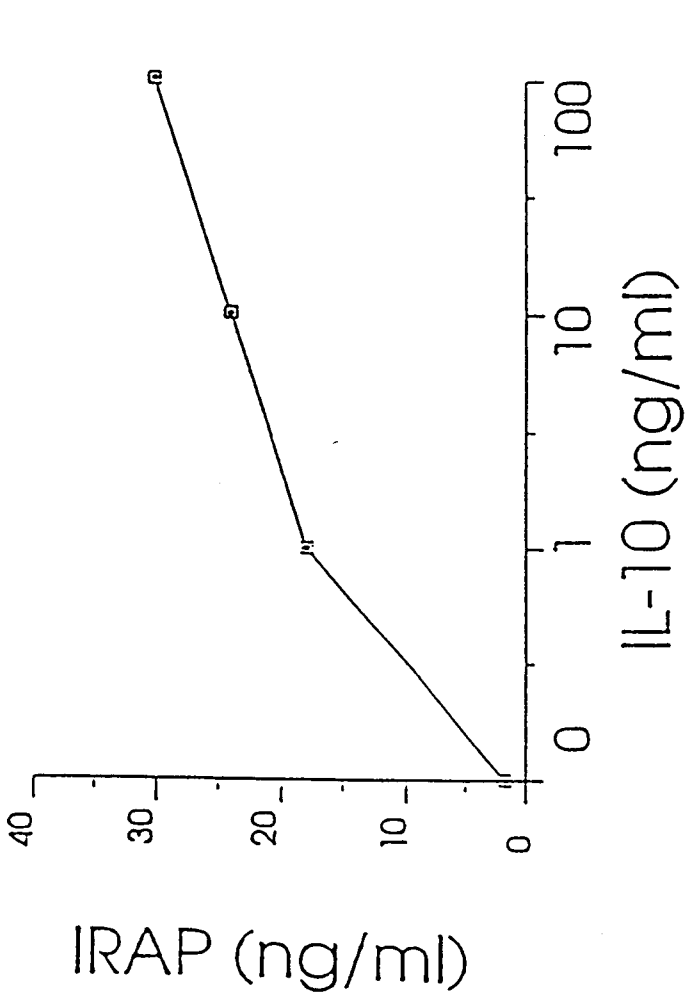

IL-10:llä stimuloidut ihmisen monosyytit
IRAP (ng/ml)
40
30
20
10
0
0
1
10
100
IL-10 (ng/ml)

Fig. 6

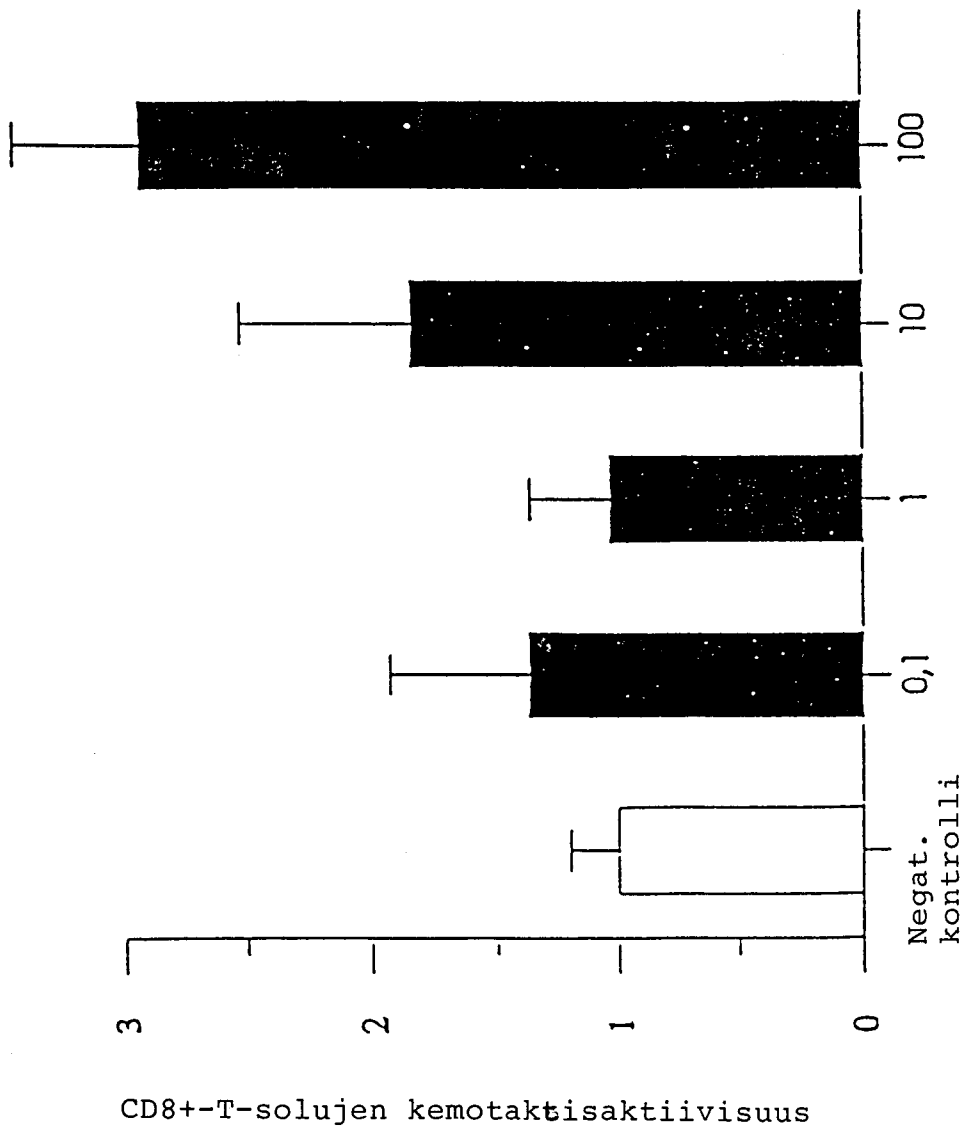

IT9302:n kemotaktinen aktiivisuus CD8+-T-soluille
CD8+-T-solujen kemotaktisaktiivisuus
0
1
2
3
Negat. kontrolli
0,1
1
10
100
IT9302 (ng/ml)

Fig. 7

CD8+-T-solujen epäherkistyminen IT9302:n vaikutuksesta, joka johtaa CD8+-T-solujen vasteen alenemiseen IL-10:llä (10 ng/ml) indusoituun kemotaksikseen

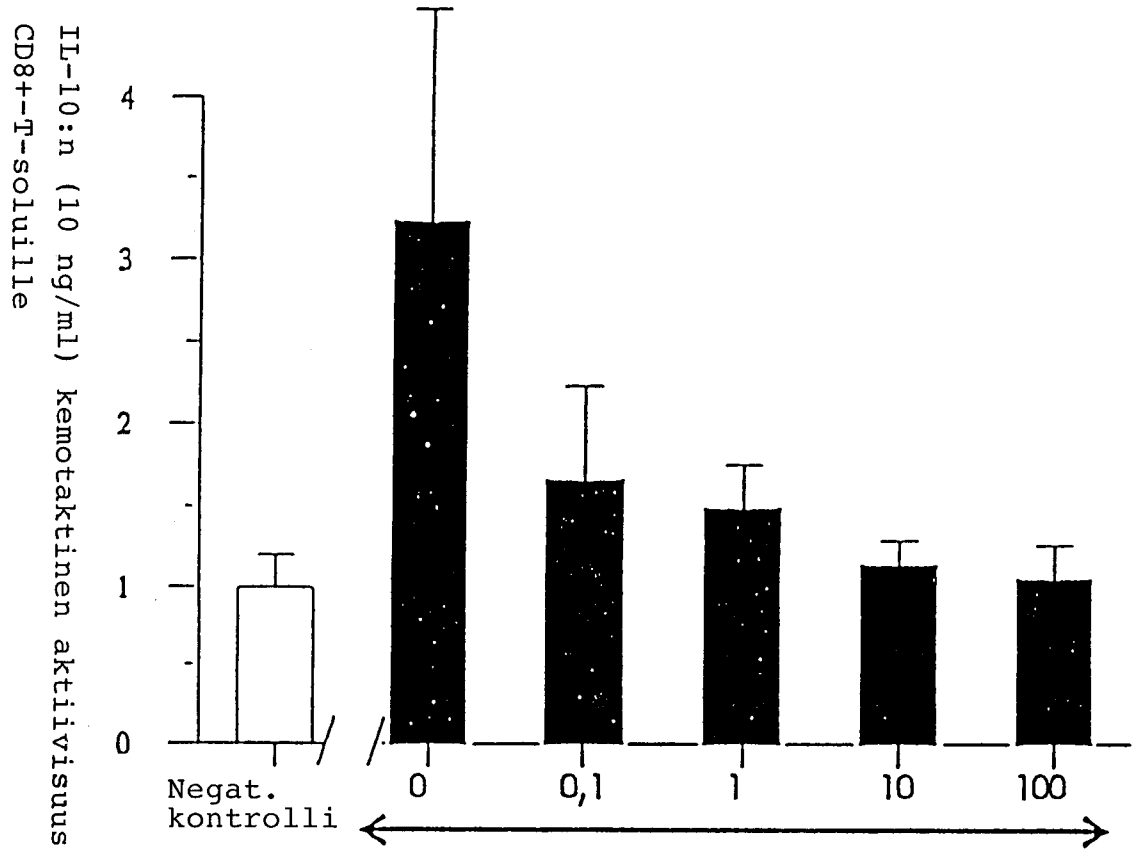


Fig. 8

IL-8-aktiivisuuden suppressio IT9302:n vaikutuksesta IT9302:n vaikutus IL-8-välitteiseen (10 ng/ml) kemotaksikseen

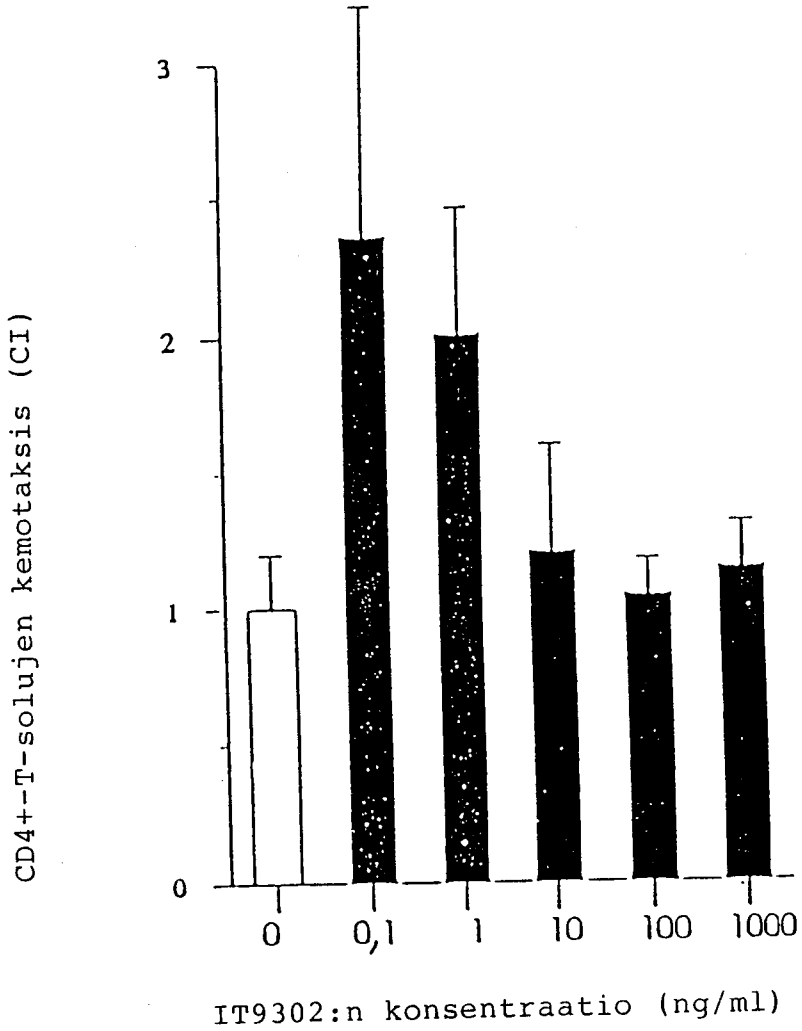


Fig. 9

IT9302 inhiboi MCAF/MCP-1-indusoitua monosyyttien kemotaksista

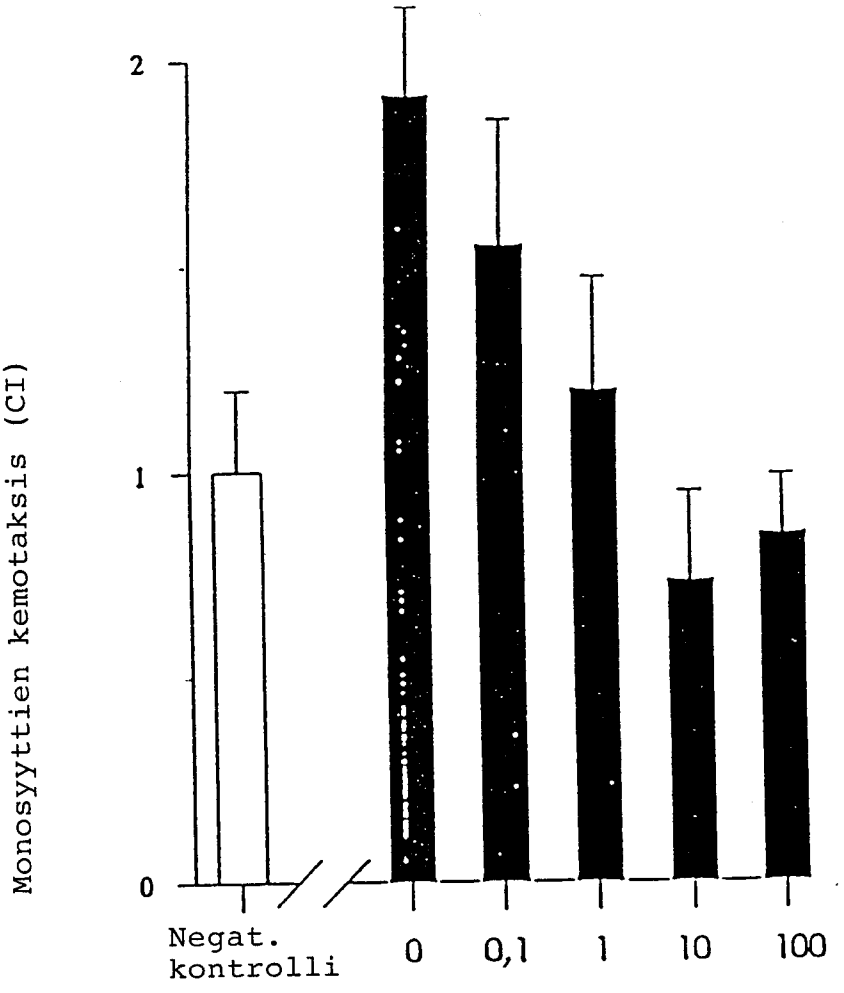
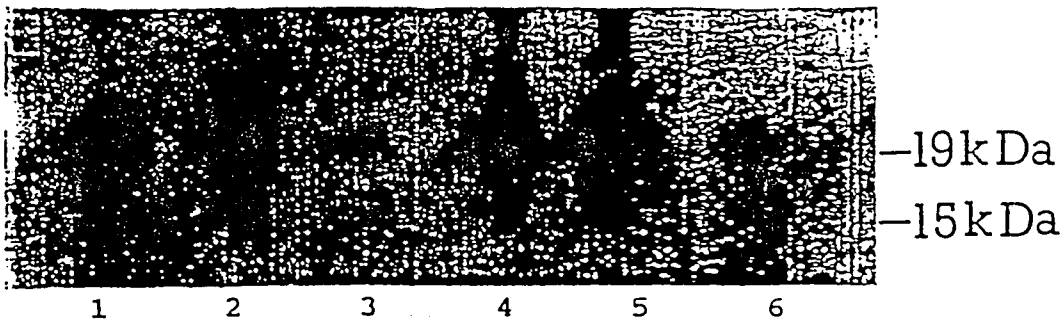


Fig. 10

CD4+-T-solujen sytosolin proteiinien ECL-Western-blottaus käyttäen vuohessa tuotettua, ihmisen IL-4:n vastaista vasta-ainetta

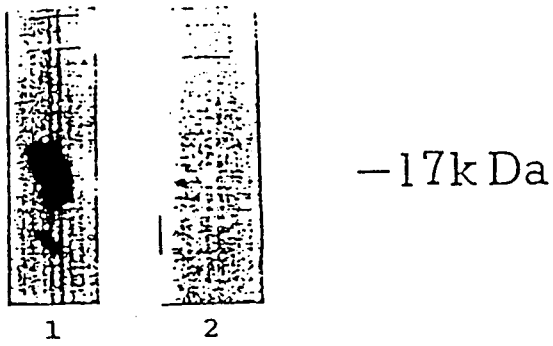


Stimulaatio 3 päivää:

1. Kontrollilla
2. Monoklonaalisella IL-8-vasta-aineella WS.4, 10 µg/ml
3. rIL-8:lla, 100 ng/ml
4. rIL-10:llä, 100 ng/ml
5. IT9302:lla, 10 ng/ml
6. rIFN-gammalla, 10 ng/ml.

Fig. 11

Ihmisen lymfosyyttien sekaviljelmän sytosolin proteiinien ECL-Western-blottaus käyttäen kanissa tuotettua ihmisen TNF-α:n vastaista vasta-ainetta



Stimulaatio 24 tuntia:
1. Kontrollilla
2. IT9302:lla, 10 ng/ml

Fig. 12

IT9302:n vaikutus LPS:n indusoimaan "septiseen" leukosytopeniaan.
IT9302 injektioitiin 30 minuuttia ennen LPS-injektiota.

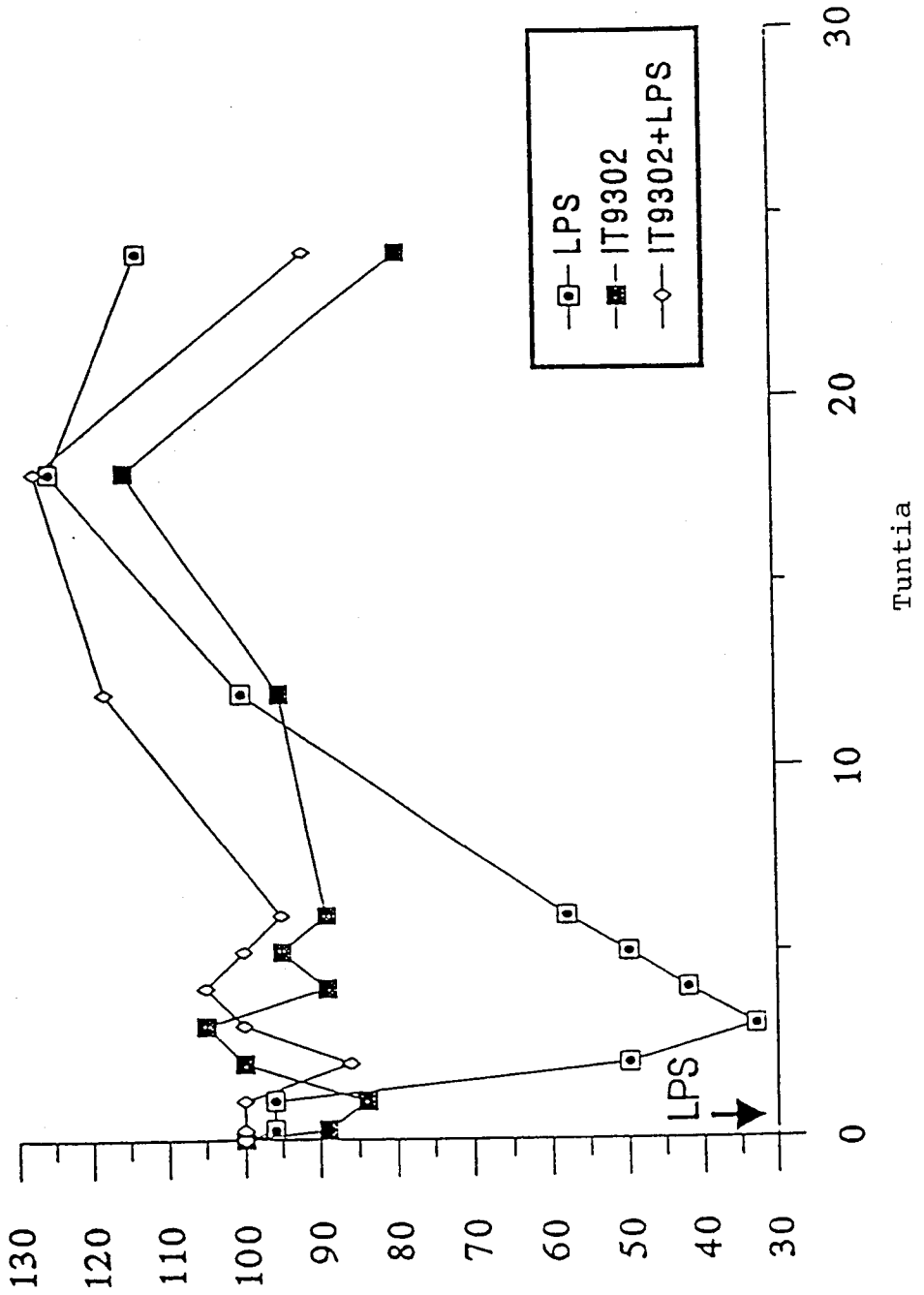


Fig. 13