



УКРАЇНА

(19) UA (11) 94021 (13) C2
(51) МПК (2011.01)
C12N 15/24 (2006.01)
A61K 38/20
A61P 11/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) МОДИФІКОВАНІ АНТАГОНІСТИ (МУТЕЇНИ) РЕЦЕПТОРА IL-4

1

2

(21) a200603391
(22) 20.07.2004
(24) 11.04.2011
(86) PCT/US2004/023310, 20.07.2004
(31) 10/820,559
(32) 08.04.2004
(33) US
(31) 60/498,906
(32) 29.08.2003
(33) US
(31) 60/528,228
(32) 09.12.2003
(33) US
(31) 60/530,182
(32) 17.12.2003
(33) US
(46) 11.04.2011, Бюл.№ 7, 2011 р.
(72) ПЕН КЛАРК, US, РОЖНЯК СТІВ, US, ГРЕВ
ДЖЕРІ МАЙКЛ, US, ЮНГ СТЕФАНІ Л., US, ЛОНГ-
ФРЕ МАЛІНДА, US, ВОНГ ТЕРЕЗА МО-ФАН, US,
ТОМКІНСОН АДРІАН, US
(73) БАЙСР ФАРМАСЬЮТІКЕЛЗ КОРПОРЕЙШН,
US
(56) KREITMAN, R. J., ET AL.: "Site-Specific
Conjugation to Interleukin 4 Containing Mutated
Cysteine Residues Produces Interleukin 4-Toxin
Conjugates with improved Binding and Activity."
BIOCHEMISTRY, vol. 33, 1994, pages 11637-11644,
XP001206219.
US A 6130318, 10.10.2000.
US A 5986059, 16.11.1999.
WO A 9803654, 29.01.1998.
(57) 1. Очищений полінуклеотид, який включає:
(а) нуклеотидну послідовність, наведену в SEQ ID
NO: 6; або
(б) нуклеотидну послідовність, яка кодує поліпеп-
тид, що має амінокислотну послідовність, наведе-
ну в SEQ ID NO: 14.
2. Експресуючий вектор, який включає полінуклео-
тид за п. 1.
3. Клітина-хазяїн, яка включає експресуючий век-
тор за п. 2.
4. Спосіб одержання модифікованого антагоніста
(мутеїна) рецептора IL-4, який включає етапи:
а) культивування клітини-хазяїна за п. 3 в умовах,
при яких антагоніст експресується; і

б) очищення антагоніста від культури клітини-
хазяїна.
5. Спосіб одержання модифікованого антагоніста
(мутеїна) рецептора IL-4 в активній формі, який
включає етапи:
а) культивування клітини-хазяїна за п. 3 в умовах,
при яких антагоніст експресується;
б) рефолдингу антагоніста у присутності дитіотре-
йолу; і
с) очищення антагоніста від культури клітини-
хазяїна.
6. Спосіб за п. 5, який, крім того, включає етапи:
d) зв'язування антагоніста з полімером небілкової
природи; і
(e) очищення антагоніста, зв'язаного з полімером
небілкової природи.
7. Модифікований антагоніст (мутеїн) рецептора
IL-4, одержаний за допомогою способу за будь-
яким з пп. 4-6, який відрізняється тим, що антаго-
ніст інгібує опосередковану IL-4 і IL-13 активність, і
модифікований антагоніст рецептора містить полі-
пептид, який кодується SEQ ID NO: 6, або містить
поліпептид SEQ ID NO: 14.
8. Модифікований антагоніст (мутеїн) рецептора
IL-4, що містить полінуклеотид за п. 1, або модифі-
кований антагоніст (мутеїн) рецептора IL-4 за п. 7,
що зв'язаний з полімером небілкової природи в
амінокислотному залишку в положенні 104 IL-4,
який відрізняється тим, що полімер небілкової
природи являє собою поліетиленгліколь, поліпро-
піленгліколь або поліоксїалкілен.
9. Модифікований антагоніст (мутеїн) рецептора
IL-4 за п. 7, що зв'язаний з полімером небілкової
природи, який відрізняється тим, що полімер
небілкової природи вибраний з групи, що містить
поліетиленгліколь, поліпропіленгліколь або поліок-
сїалкілен.
10. Модифікований антагоніст (мутеїн) рецептора
IL-4 за п. 8 або 9, який відрізняється тим, що мо-
дифікований антагоніст (мутеїн) рецептора зв'язу-
ється з альфа-ланцюгом рецептора IL-4 з K_d, що
становить приблизно від 0,1 нМ до приблизно 10
мкМ, приблизно 0,5 нМ до приблизно 1 мкМ або
приблизно 1,0 нМ до приблизно 100 нМ.
11. Модифікований антагоніст (мутеїн) рецептора
IL-4 за п. 8 або п. 9, який відрізняється тим, що

(13) C2
(11) 94021
(19) UA

модифікований антагоніст (мутеїн) рецептор IL-4 інгібує проліферативну реакцію TF-1 клітин до IL-4 з IC₅₀, що становить приблизно від 0,1 нМ до приблизно 10 мкМ, приблизно 0,5 нМ до приблизно 1 мкМ або приблизно 1,0 нМ до приблизно 100 нМ.

12. Модифікований антагоніст (мутеїн) рецептора IL-4 за п. 8 або п. 9, який **відрізняється** тим, що модифікований антагоніст (мутеїн) рецептор IL-4 інгібує проліферативну реакцію TF-1 клітин до IL-13 з IC₅₀, що становить приблизно від 0,1 нМ до приблизно 10 мкМ, приблизно 0,5 нМ до приблизно 1 мкМ або приблизно 1,0 нМ до приблизно 100 нМ.

13. Модифікований антагоніст (мутеїн) рецептора IL-4 за п. 8 або п. 9, який **відрізняється** тим, що модифікований антагоніст (мутеїн) рецептор IL-4 інгібує проліферативну реакцію В-клітин людини до IL-4 з IC₅₀, що становить приблизно від 0,1 нМ до приблизно 10 мкМ, приблизно 0,5 нМ до приблизно 1 мкМ або приблизно 1,0 нМ до приблизно 100 нМ.

14. Модифікований антагоніст (мутеїн) рецептора IL-4 за п. 8 або п. 9, який **відрізняється** тим, що модифікований антагоніст (мутеїн) рецептора IL-4 інгібує проліферативну реакцію Т-клітин людини до IL-4 з IC₅₀, що становить приблизно від 0,1 нМ до приблизно 10 мкМ, приблизно 0,5 нМ до приблизно 1 мкМ або приблизно 1,0 нМ до приблизно 100 нМ.

15. Модифікований антагоніст (мутеїн) рецептора IL-4 за п. 8 або п. 9, який **відрізняється** тим, що модифікований антагоніст (мутеїн) рецептора IL-4 має період напіврозпаду в плазмі, який щонайменше приблизно у 2-10 разів більший, ніж у немодифікованого антагоніста рецептора IL-4.

16. Модифікований антагоніст (мутеїн) рецептора IL-4 за п. 9, який **відрізняється** тим, що модифікований антагоніст (мутеїн) рецептора IL-4 зв'язується з полімером небілкової природи в амінокислотному залишку в положенні 104 IL-4.

17. Модифікований антагоніст (мутеїн) рецептора IL-4 за п. 8 або п. 16, який **відрізняється** тим, що амінокислотний залишок в положенні 104 являє собою цистеїн.

18. Модифікований антагоніст (мутеїн) рецептора IL-4 за п. 8 або п. 9, який містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 14.

19. Фармацевтична композиція, яка містить:

а) модифікований антагоніст (мутеїн) рецептора IL-4 за будь-яким з пп. 7-9; і

б) фармацевтично прийнятий носій.

20. Модифікований антагоніст (мутеїн) рецептора IL-4 за п. 9 для лікування розладів у людини, пов'язаних з підвищеною активністю IL-4 і IL-13.

21. Фармацевтична композиція за п. 19 для лікування розладів у людини, пов'язаних з підвищеною активністю IL-4 і IL-13.

22. Модифікований антагоніст (мутеїн) рецептора IL-4 за п. 20 або фармацевтична композиція за п. 21, які **відрізняються** тим, що розладом є астма, хронічне обструктивне захворювання легень або подібні захворювання легень.

23. Модифікований антагоніст (мутеїн) рецептора IL-4 або фармацевтична композиція за п. 22, які **відрізняються** тим, що хронічне обструктивне захворювання легень являє собою емфізему або хронічний бронхіт.

24. Застосування модифікованого антагоніста (мутеїна) рецептора IL-4 за будь-яким з пп. 7-18 для виготовлення фармацевтичної композиції для лікування розладів у людини, пов'язаних з підвищеною активністю IL-4 і IL-13.

25. Застосування фармацевтичної композиції за п. 19 для лікування розладів у людини, пов'язаних з підвищеною активністю IL-4 і IL-13.

26. Застосування модифікованого антагоніста (мутеїна) рецептора IL-4 за будь-яким з пп. 7-19 для лікування розладів у людини, пов'язаних з підвищеною активністю IL-4 і IL-13.

27. Застосування за будь-яким з пп. 24-26, яке **відрізняється** тим, що розладом є астма або хронічне обструктивне захворювання легень.

28. Застосування за п. 27, яке **відрізняється** тим, що хронічне обструктивне захворювання легень являє собою емфізему або хронічний бронхіт.

Ця заявка подається на основі пріоритетних Попередніх Заявок США №№ 60/498,906, подана 29 серпня, 2003; 60/528,228, подана 9 грудня, 2003; і 60/530,182, подана 17 грудня, 2003, зміст яких розкритий тут детально у вигляді довідкової інформації.

Галузь винаходу

Цей винахід стосується антагоністів IL-4 мутеїнового рецептора, зв'язаного з полімером небілкової природи, таким як поліетиленгліколь. Крім того, надаються споріднені композиції, режими дозування та способи їх застосування з терапевтичною метою. Ці антагоністи модифікованого IL-4 мутеїнового рецептора і пов'язані з ними композиції, а також способи допомагають забезпечити один з варіантів лікування осіб, що потерпають від

тяжкої астми, хронічного обструктивного захворювання легень і подібних станів легень.

Передумови винаходу

Астма характеризується мінливими, зворотніми порушеннями дихання і гіперреактивністю дихальних шляхів (ДШГР), пов'язаними з інфільтрацією слизової оболонки бронхів активованими Т-лімфоцитами (Т-клітинами) і еозинофілами. Ці клітини, разом з резидентними мастоцитами (опасистими клітинами) дихальних шляхів, секретують різноманітні цитокіни і медіатори, що відіграють основну роль у патогенезі цієї хвороби. Вважають, що CD4⁺ Th2 клітини, завдяки вивільненню специфічних цитокінів (IL-4, IL-5, IL-9, і IL-13), супроводжують процес захворювання (1,2). Зокрема, вважають, що Th2 цитокіни IL-4 і IL-13, відіграють

основну роль у розвитку і підтриманні запалення і гіперреактивності дихальних шляхів.

Низка досліджень, проведених *in vivo*, також підтримує визначальну роль IL-4 і IL-13 в патогенезі астми. За допомогою тварин, у яких спостерігалась недостатність цитокіну, або реактиву, що нейтралізує функцію IL-4 або IL-13, було з'ясовано важливу роль цих цитокінів у регулюванні первинної або вторинної імунної реакції, що призводить до запалення і гіперреактивності дихальних шляхів (3,4). Узагальнюючи, можна сказати, що ці дані свідчать про те, що IL-4 і IL-13 можуть діяти сумісно або відігравати незалежну роль у виникненні алергічної реакції дихальних шляхів, і що, впливаючи на обидва цитокіни, можна отримати істотну додаткову користь у порівнянні з тим, ніж коли впливають на кожен з цих цитокінів поодиночі.

Дані про антагоністи IL-4 відомі з літератури. Мутантні форми IL-4, що функціонують як антагоністи, включають IL-4 антагоніст мутеїну IL-4/Y124D [Kruse, N., Tony, H. P., Sebald, W., Conversion of human interleukin-4 into a high affinity antagonist by a single amino acid replacement, *Embo J.* 11:3237-44, 1992] і подвійного мутеїну IL-4[R121D/Y124D] [Tony, H., et al, Design of Human Interleukin-4 Antagonists in Inhibiting Interleukin-4-dependent and Interleukin-13-dependent responses in T-cells and B-cells with high efficiency, *Eur. J. Biochem.* 225:659-664 (1994)]. Моносайтовий мутеїн являє собою заміщення тирозину на аспарагінову кислоту в положенні 124 в D-спіралі. Двохсайтовий мутеїн являє собою заміщення аргініну на аспарагінову кислоту в положенні 121, і тирозину на аспарагінову кислоту в положенні 124 в D-спіралі. Варіації в цій частині D-спіралі позитивно корелюють зі змінами у взаємодії з іншою областю зв'язування.

Мутантні варіанти IL-4, що виявляють агонізм або антагонізм стосовно природного типу IL-4, можуть бути використані для лікування станів, пов'язаних з одним з плейотропних впливів IL-4. Наприклад, антагоністи IL-4 могли б бути корисними при лікуванні станів, загострених продукуванням IL-4, таких як астма, алергія, або інших запальних станів, викликаних реакцією. Агоністи IL-4 можуть використовуватись для лікування станів, при яких наявність IL-4 пов'язана з покращенням або ослабленням проявів хвороби, наприклад, аутоімунного захворювання, такого як ревматоїдний артрит, розсіяний склероз, інсулін-залежний цукровий діабет тощо. Ці аутоімунні захворювання характеризуються поляризацією при утворенні популяцій клітин Т-хелперів, типів 1 і 2 (Th1, Th2). CD4+ Т клітини, що ще не зазнали жодного впливу, диференціюються в ТМ або Тп2 підмножини, залежно від типу цитокіну, що присутній протягом періоду стимуляції. Агоніст IL-4 ідеально зміщував би продукування в бік бажаних Т-клітин-хелперів, тобто, в напрямку Th2, виявляючи у такий спосіб терапевтичний ефект.

PCT/US93/03613 розкриває IL-4 варіант, що має послідовності Phe-Leu або Tyr-Leu в домені альфа-спіралі і негативно заряджену амінокислоту в межах двох амінокислот безпосередньо зліва і справа від Phe-Leu або Tyr-Leu послідовності, ва-

ріант, що має підвищену спорідненість до IL-4 рецептора завдяки заміні нейтральної амінокислоти на негативно заряджену амінокислоту. Вона також розкриває, що специфічна заміна Trp-Leu або Phe-Leu в межах α -спіралі IL-4 в межах 2-залишків негативно зарядженого залишка призводить до підвищення афінності. Цей варіант являє собою IL-4 гібридний білок (з дифтерійним токсином).

Про рекомбінантний мутеїновий білок (IL-4RA), що походить від IL-4 людини, у якому відбулись мутації в двох положеннях його амінокислотної послідовності, було раніше повідомлено в Патентах США 6,028,176 і 6,313,272. IL-4RA зв'язується з високою афінністю з альфа ланцюгом рецептора IL-4 людини, важливою функціональною сигнальною складовою як IL-4, так і IL-13 рецепторних комплексів. Цей мутеїн не має активності агоніста і діє як сильний конкуруючий антагоніст IL-4 і IL-13 рецепторів *in vitro* [Див. Патенти США 6,028,176 і 6,313,272]. Істотною перешкодою для застосування IL-4RA є його відносно короткий період напіввиведення *in vivo* (приблизно 3-6 год). Фармакокінетичне/фармакодинамічне моделювання IL-4RA на моделі астми у приматів показало, що ефективна середня стала концентрація для виявлення оптимального терапевтичного ефекту становить приблизно 60 нг/мл.

Одним із способів подолання короткого часу напіввиведення є часте введення IL-4RA мутеїну пацієнтові, однак часте введення (як правило, шляхом ін'єкції або трахеальної інтубації) спричиняє дуже серйозні перешкоди для пацієнта щодо сприйняття лікування і терапевтичного застосування в клініці.

Короткий опис винаходу

Винахід надає IL-4RA мутеїни з більшим періодом напіврозпаду, ніж мутеїни, про які було повідомлено раніше. Винахід також надає реактиви і способи для інгібування імунних реакцій, опосередкованих IL-4 і IL-13. Цей та інші аспекти винаходу надані одним або кількома варіантами здійснення винаходу, що перелічені нижче.

В одному варіанті здійснення, винахід надає очищений препарат антагоніста модифікованого IL-4 мутеїнового рецептора, що містить антагоніст IL-4 мутеїнового рецептора, зв'язаний з полімером непротиінової природи, відібраним з групи, що складається з поліетиленгліколю, поліпропіленгліколю і поліоксикалінів. В іншому аспекті цього варіанту, очищений препарат містить поліпептидний антагоніст модифікованого IL-4 мутеїнового рецептора, який кодується за допомогою нуклеотидної послідовності, що наведена в SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, або SEQ ID NO: 8. В іншому аспекті, поліпептид містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, або SEQ ID NO: 16.

В іншому варіанті, поліпептидний антагоніст модифікованого IL-4 мутеїнового рецептора може бути зв'язаний з полімером небілкової природи в амінокислотному залишку в положенні 28, 36, 37, 38, 104, 105 або 106 IL-4. Відлік цих положень здійснюють відповідно до амінокислотної послідо-

вності природного типу IL-4 (тобто, інтерлейкіну-4 людини). В одному з аспектів цього варіанту, амінокислотний залишок в положеннях 28, 36, 37, 38, 104, 105 або 106 - цистеїн.

В іншому варіанті, антагоніст модифікованого мутейнового рецептора за цим винаходом зв'язується з альфа-ланцюгом IL-4 рецептора з K_d , що становить, приблизно, від 0.1 нМ до, приблизно, 10 мкМ, приблизно, від 0.5 нМ до, приблизно, 1 мкМ, або, приблизно, від 1.0 нМ до, приблизно, 100 нМ.

В іншому варіанті, антагоніст модифікованого IL-4 мутейнового рецептора інгібує проліферативну реакцію TF-1 клітин до IL-4 з IC_{50} , що становить, приблизно, від 0.1 нМ до, приблизно, 10 мкМ, приблизно, від 0.5 нМ до, приблизно, 1 мкМ, або, приблизно, від 1.0 нМ до, приблизно, 100 нМ.

В ще іншому варіанті, антагоніст модифікованого IL-4 мутейнового рецептора інгібує проліферативну реакцію TF-1 клітин до IL-13 з IC_{50} , яке обрано серед значень від, приблизно, 0.1 нМ до, приблизно, 10 мкМ, від, приблизно 0.5 нМ до, приблизно, 1 мкМ, або, від приблизно, 1.0 нМ до, приблизно, 100 нМ.

В ще одному варіанті, антагоніст модифікованого IL-4 мутейнового рецептора інгібує проліферативну реакцію В-клітин людини до IL-4 з IC_{50} , яке обрано серед значень від, приблизно, 0.1 нМ до, приблизно, 10 мкМ, від, приблизно 0.5 нМ до, приблизно, 1 мкМ, або, від, приблизно, 1.0 нМ до, приблизно, 100 нМ.

В іншому варіанті, антагоніст модифікованого IL-4 мутейнового рецептора інгібує проліферативну реакцію Т-клітин людини до IL-4 з IC_{50} , обраним з групи, що складається із значень від, приблизно, 0.1 нМ до, приблизно, 10 мкМ, від, приблизно 0.5 нМ до, приблизно, 1 мкМ, або, від, приблизно, 1.0 нМ до, приблизно, 100 нМ.

В ще одному варіанті, антагоніст модифікованого IL-4 мутейнового рецептора за цим винаходом має період напіввиведення з плазми, який, щонайменше, приблизно, у 2-10 разів більший, ніж у антагоніста немодифікованого IL-4 рецептора.

Винахід також надає фармацевтичні композиції, які містять: (а) антагоніст модифікованого EL-4 мутейнового рецептора, який зв'язується з IL-4 рецептором ; і (b) фармацевтично прийнятний носій.

Винахід також надає очищений полінуклеотид, який містить (а) нуклеотидну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, or SEQ ID NO: 8; або (b) нуклеотидну послідовність, що кодує поліпептид, який має амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, або SEQ ID NO: 16.

Винахід також надає експресуючі вектори, які містять полінуклеотид відповідно винаходу і клітинно-господаря, яка містить експресуючий вектор за цим винаходом.

Крім того, винахід надає способи отримання антагоніста модифікованого EL-4 мутейнового рецептора, які включають такі етапи: (а) культивування клітини-господаря, описаної вище, за умов,

при яких експресується антагоніст; і (b) очищення антагоніста від культури клітин-господаря. В окремому аспекті, антагоніст, отриманий за допомогою способу винаходу, може інгібувати опосередковану IL-4 і IL-13 активність і зв'язується з полімером небілкової природи, обраним з групи, що містить поліетиленгліколь, поліпропіленгліколь і поліоксиполіетилени.

Винахід також надає способи для лікування розладів у людини, пов'язаних з підвищеною активністю IL-4 і IL-13, що включають такі етапи: (а) наявність людини, яка має стан, що характеризується підвищеною активністю IL-4 і IL-13; і (b) введення вказаній людині ефективної кількості антагоніста модифікованого IL-4 мутейнового рецептора винаходу або фармацевтичної композиції цього винаходу. В одному з варіантів, захворювання - це астма, хронічне обструктивне захворювання легень (таке як емфізема або хронічний бронхіт), або споріднені легеневі захворювання.

Винахід також надає спосіб отримання антагоніста модифікованого IL-4 мутейнового рецептора в активній формі, антагоністів, отриманих за допомогою цього способу, композицій, які містять такі антагоністи, і спосіб лікування розладів у людини, що полягає у введенні таких антагоністів, і фармацевтичних композицій, що містять такі антагоністи. Спосіб включає такі етапи: (а) культивування клітини-господаря, описаної вище за умов, при яких експресується антагоніст; (b) утворення вторинної структури антагоніста за присутності дитіотреїтолу; і (c) очищення антагоніста від культури клітинно-господаря. В одному варіанті, спосіб, крім того, включає такі етапи: (d) зв'язування антагоніста з полімером небілкової природи; і (e) очищення антагоніста, зв'язаного з полімером небілкової природи.

Конкретні кращі варіанти здійснення даного винаходу стануть очевидними з наступних детальніших описів певних кращих варіантів і формули винаходу.

Короткий опис фігур

Фігура 1 представляє схематичне зображення хімічної реакції ПЕГілювання.

Докладний опис винаходу

Винахід пов'язаний з антагоністами модифікованого IL-4 мутейнового рецептора, зв'язаними з полімером небілкової природи, переважно молекулою поліетиленгліколю.

Якщо не обумовлено щось інше, виходячи з контексту, терміни, що використовуються в однині, можуть мати різні значення, а терміни, що використовуються у множині, можуть мати одне значення.

Назви розділів, що використовуються тут, призначені лише для організаційних цілей, а не для того, щоб обмежити предмет обговорення. Всі процитовані посилання у цій заявці спеціально включені тут за вимогою.

Визначення

Термін "полінуклеотид" або "послідовність нуклеїнової кислоти" або "молекула нуклеїнової кислоти" стосується послідовності ДНК або РНК. Термін охоплює молекули, утворені будь-якими відомими основними аналогами ДНК і РНК, такими

як, але не обмежені ними, 4-ацетилцитозин, 8-гідрокси-N6-метиладенозин, азиридиніл-цитозин, псевдоізоцитозин, 5-(карбоксигідроксилметил)урацил, 5-фторурацил, 5-бром урацил, 5-карбоксиметиламінометил-2-тіоурацил, 5-карбокси-метиламінометилурацил, дигідроурацил, інозин, N6-ізо-пентеніладенін, 1-метиладенін, 1-метилпсевдоурацил, 1-метилгуанін, 1-метилінозин, 2,2-диметил-гуанін, 2-метиладенін, 2-метилгуанін, 3-метилцитозин, 5-метилцитозин, N6-метиладенін, 7-метилгуанін, 5-метиламінометилурацил, 5-метоксиаміно-метил-2-тіоурацил, бета-Р-маннозилквеозин, 5'-метоксикарбоніл-метилурацил, 5-метоксиурацил, 2-метилтіо-N6-ізопентеніладенін, урацил-5-оксиоцтової кислоти метиловий естер, урацил-5-оксиоцтова кислота, оксibuтоксозин, псевдоурацил, квеозин, 2-тіоцитозин, 5-метил-2-тіоурацил, 2-тіоурацил, 4-тіоурацил, 5-метилурацил, N-урацил-5-оксиоцтової кислоти метиловий естер, урацил-5-оксиоцтова кислота, псевдоурацил, квеозин, 2-тіоцитозин, і 2,6-діамінопурин.

Термін "очищений" або "ізолюваний" полінуклеотид стосується молекули нуклеїнової кислоти винаходу, яка (1) була відокремлена від, щонайменше, приблизно, 50 відсотків білків, ліпідів, вуглеводнів, або інших речовин, з якими вона в природі виявляється, якщо сукупна нуклеїнова кислота ізолюється з природного джерела, (2) не зв'язується з цілим або частиною полінуклеотиду, з яким "ізолювана молекула нуклеїнової кислоти" зв'язується в природі, (3) операбельно зв'язана з полінуклеотидом, який не зв'язується у природному стані, або (4) не зустрічається в природі як частина довшої полінуклеотидної послідовності. Переважно, ізолювана молекула нуклеїнової кислоти даного винаходу є, головним чином, вільною від будь-яких інших забруднюючих молекул нуклеїнової кислоти(т) або інших контамінантів, які виявляються в її природному середовищі, що можуть впливати на її використання при отриманні поліпептиду або при використанні її з терапевтичною, діагностичною, профілактичною або дослідною метою.

Під "пронумеровані відповідно до природного типу IL-4" ми маємо на увазі визначення місця обраної амінокислоти стосовно положення, в якому ця амінокислота зазвичай зустрічається у природного типу IL-4.

Термін "вектор" використовується стосовно будь-якої молекули (напр., нуклеїнової кислоти, плазміди або віруса), що використовуються для перенесення кодуєчої інформації в клітину-господаря.

Термін "експресуючий вектор" стосується вектора, який придатний для трансформації клітини-господаря і містить послідовності нуклеїнової кислоти, які спрямовують і/або контролюють експресію інсерта гетерологічних послідовностей нуклеїнової кислоти. Експресія включає, але не обмежена цим, такі процеси, як транскрипція, трансляція і сплайсування РНК, якщо мають місце інтрони.

Термін "клітина-господар" використовується тут для посилання на клітину, що була трансфор-

мована, або здатна до трансформації за допомогою послідовності нуклеїнової кислоти, а після цього здатна експресувати певний ген, який становить інтерес. Цей термін включає потомство материнської клітини, незалежно від того, ідентичне потомство чи ні щодо морфології або організації геному вихідній батьківській формі, за умови, що відібраний ген зберігається.

Термін "трансдукція" використовується тут при посиланні на перенесення генів від однієї бактерії до іншої, як правило, за допомогою фага. "Трансдукція" також стосується отримання і перенесення послідовностей клітин еукаріотів за допомогою ретровірусів.

Термін "трансфекція" використовується тут при посиланні на поглинання чужорідної або екзогенної ДНК клітиною, а клітина є "трансфектованою", якщо екзогенна ДНК введена через клітинну мембрану. Ціла низка методик трансфекції є добре відомою з рівня техніки і розкрита тут. Див., напр., Graham et al, 1973, Virology 52:456; Sambrook et al, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratories, 1989); Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology (Elsevier, 1986); and Chu et al., 1981, Gene 13:197. Такі методики застосовуються, для того щоб ввести одну або більше екзогенних молекул ДНК в прийнятні клітини-господарі.

Термін "трансформація", як тут використовується, стосується змін генетичних властивостей клітини, а клітина є трансформованою, якщо вона модифікована і містить нову ДНК. Наприклад, клітина трансформується, якщо вона генетично модифікується стосовно її нативного стану. Після трансфекції або трансдукції, ДНК, яка трансформується, може разом з тим рекомбінувати клітину шляхом фізичного інтегрування в хромосому клітини, може тимчасово підтримуватись як епісомний елемент без реплікації, або може реплікуватись незалежно у вигляді плазміди. Клітину вважають стабільно трансформованою, якщо ДНК реплікується з поділом клітини.

Термін "ідентичність", як відомо з рівня техніки, стосується взаємозв'язку між послідовностями двох або більше молекул поліпептидів або двох чи більше молекул нуклеїнової кислоти, що визначається шляхом порівняння послідовностей. В галузі, "ідентичність" також означає ступінь зв'язку послідовності між молекулами нуклеїнової кислоти або поліпептидів, що визначається шляхом співпадин між ланцюгами двох або більше нуклеотидів або двох чи більше амінокислотних послідовностей. "Ідентичність" визначає відсоток ідентичних співпадин між меншою серед двох або кількох послідовностей з вирівнюваннями розриву (якщо такі існують), встановлений за допомогою спеціального математичного моделювання або комп'ютерного програмування (тобто, "алгоритмів").

Термін "подібність" є споріднене поняття, однак, на відміну від "ідентичності", "подібність" стосується міри зв'язку, яка включає як ідентичні відповідності, так і відповідності консервативних замінів. Якщо дві поліпептидні послідовності мають, наприклад, 10/20 ідентичних амінокислот, а решту являють собою неконсервативні заміни, тоді відсо-

ток ідентичності і подібності становитиме в обох випадках 50%. Якщо в тому ж прикладі, існує більше п'яти положень, в яких існують консервативні заміни, тоді відсоток ідентичності залишається 50%, однак відсоток подібності становитиме 75% (15/20). Відповідно, у випадках, коли існують консервативні заміни, відсоток подібності між двома поліпептидами буде вищим, ніж у відсоток ідентичності між цими двома поліпептидами.

Ідентичність та подібність споріднених нуклеїнових кислот і поліпептидів може бути легко визначена за допомогою відомих методів. Такі методи включають, але не обмежені ними, ті, що описані в COMPUTATIONAL MOLECULAR BIOLOGY, (Lesk, A.M., ed.), 1988, Oxford University Press, New York; BIOCUMPING: INFORMATICS AND GENOME PROJECTS, (Smith, D.W., ed.), 1993, Academic Press, New York; COMPUTER ANALYSIS OF SEQUENCE DATA, Part 1, (Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds.), 1994, Humana Press, New Jersey, von Heinje, G., SEQUENCE ANALYSIS IN MOLECULAR BIOLOGY, 1987, Academic Press; SEQUENCE ANALYSIS PRIMER, (Gribskov, M. and Devereux, J., eds.), 1991, M. Stockton Press, New York; Carillo et al, 1988, SIAM J. Applied Math., 48:1073; and Durbin et al, 1998, BIOLOGICAL SEQUENCE ANALYSIS, Cambridge University Press.

Кращі методи для визначення ідентичності створені для того, щоб дати найбільшу відповідність між досліджуваними послідовностями. Методи для визначення ідентичності описано в комп'ютерних програмах, що є загальнодоступними. Кращі методи комп'ютерного програмування для визначення ідентичності між двома послідовностями включають, але не обмежені ними, програмний пакет GCG, включаючи GAP (Devereux et al., 1984, Nucl. Acid. Res., 12:387; Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI), BLASTP, BLASTN, and FASTA (Altschul et al, 1990, J. Mol Biol, 215:403-410). Програма BLASTX є загально доступною з Національного центру біотехнологічної інформації (NCBI) та інших джерел (BLAST Manual, Altschul et al NCB/NLM/NIH Bethesda, MD 20894; Altschul et al., 1990, supra). Загальновідомий алгоритм Smith Waterman також може бути використаний для визначення ідентичності.

Певні схеми для вирівнювання двох амінокислотних послідовностей можуть призвести до співпадіння лише короткої ділянки двох послідовностей, і ця коротка вирівняна ділянка може мати дуже високу ідентичність послідовності навіть якщо не існує істотного взаємозв'язку між двома не-процесованими послідовностями. Відповідно, в деяких варіантах винаходу, обраний метод вирівнювання (GAP програма) призводить до вирівнювання, яке охоплює, щонайменше, 50 сусідніх амінокислот поліпептиду-мішені.

Наприклад, за допомогою комп'ютерного алгоритму GAP (Генетична комп'ютерна група, Вісконсінський університет, Медісон, штат Вісконсін), для того щоб встановити відсоток ідентичності послідовності двох поліпептидів, вони вирівнюються для оптимального співпадіння їх відповідних амі-

нокислот ("проміжок співпадіння", як визначається за допомогою алгоритму). В певних варіантах, використовуються "штраф початку розриву" (gap opening penalty) (який вираховується як 3-кратне середнє діагональне; де "середнє діагональне" являє собою середнє діагоналі матриці порівняння; "діагональ" являє собою бал або число, присвоєне кожній парі амінокислот, що ідеально співпадають, з використанням відповідної матриці порівняння), і "штраф межі поширення розриву" (gap extension penalty) (що, як правило, становить 1/10 "штрафу початку розриву"), а також матриці порівняння, такої як PAM250 або BLOSUM 62 використовуються у поєднанні з алгоритмом. В деяких варіантах, стандартна матриця порівняння (див. Dayhoff et al, 1978, Atlas of Protein Sequence and Structure, 5:345-352 для PAM 250 порівняльної матриці; Henikoff et al, 1992, Proc. Natl Acad. Sci USA, 89:10915-10919 для BLOSUM 62 порівняльної матриці) також використовується у алгоритмі.

В деяких варіантах здійснення винаходу, параметри для порівняння поліпептидної послідовності включають наступне:

Алгоритм: Needleman et al, 1970, J. Mol. Biol, 48:443-453;

Матриця порівняння: BLOSUM 62 з Henikoff et al, 1992, supra;

Штраф розриву: 12

Штраф довжини розриву: 4

Межа подібності: 0

GAP-програма може бути використана з вказаними вище параметрами. В деяких варіантах, вищезазначені параметри є параметрами "по умовчання" для порівняння поліпептидів (разом з відсутністю "штрафів" за кінцеві розриви) за допомогою GAP-алгоритму.

Тут використовуються двадцять традиційних амінокислот і їх умовні позначення, що традиційно використовуються. Див. IMMUNOLOGY-A SYNTHESIS, 2nd Edition, (E. S. Golub and D. R. Gren, Eds.), Sinauer Associates: Sunderland, MA, 1991, включені тут для посилання з будь-якою метою. Стереїзомери (наприклад, D-амінокислоти) двадцяти традиційних амінокислот; неприродні амінокислоти, такі як α -, α -двозаміщені амінокислоти, N-ілкільні амінокислоти, молочна кислота та інші нетрадиційні амінокислоти можуть також бути прийнятними складовими для поліпептидів цього винаходу. Приклади нетрадиційних амінокислот включають: 4-гідроксипролін, γ -карбоксиглутамат, ϵ -N,N,N-триметиллізін, ϵ -N-ацетиллізін, О-фосфосерин, N-ацетилсерин, N-формілметіонін, 3-метилгістидин, 5-гідроксилізін, σ -N-метиларгінін, та інші подібні амінокислоти та імінокислоти (напр., 4-гідроксипролін). У системі зображення поліпептиду, що тут використовується, лівосторонній напрямок - це амінокінцевий напрямок, а правосторонній напрямок - це карбоксильно-термінальний напрямок, відповідно до загальноприйнятого використання і домовленості.

Залишки, які зустрічаються у природі, можуть бути розділені на класи, ґрунтуючись на загальних властивостях бічного ланцюга:

1) гідрофобні: норлейцин (Nor), Met, Ala, Val, Leu, Ile;

2) нейтральні гідрофільні: Cys, Ser, Thr, Asn, Gin;

3) кислі: Asp, Glu;

4) основні: His, Lys, Arg;

5) залишки, що впливають на орієнтацію ланцюга: Gly, Pro; i

6) ароматичні: Trp, Tyr, Phe.

Заміни консервативних амінокислот можуть включати заміну члена одного з цих класів іншим членом того ж класу. Консервативні амінокислотні заміни можуть охоплювати амінокислотні залишки, що не зустрічаються в природі, які, як правило, включаються за допомогою хімічного синтезу пептиду, а не в біологічних системах. Вони включають пептидоміметики та інші реверсовані або інвертовані форми частин молекул амінокислот.

Неконсервативні заміни можуть включати заміни члена одного з цих класів на члена іншого класу. Такі заміщені залишки можуть бути введені в ділянки білка людини, що є гомологічними білкам, які не належать людині, або в негомологічні ділянки молекули.

При виконанні цих замін, відповідно до певних варіантів винаходу, має бути врахований коефіцієнт гідрофобності. Кожній амінокислоті присвоєний коефіцієнт гідрофобності на основі її гідрофобності та зарядної характеристики. Як приклади слід навести: ізолейцин (+4.5); валін (+4.2); лейцин (+3.8); фенілаланін (+2.8); цистеїн/цистин (+2.5); метіонін (+1.9); аланін (+1.8); гліцин (-0.4); треонін (-0.7); сериї (-0.8); триптофан (-0.9); тирозин (-1.3); пролін (-1.6); гістидин (-3.2); глутамат (-3.5); глутамін (-3.5); аспартат (-3.5); аспарагін (-3.5); лізин (-3.9); і аргінін (-4.5).

Значення коефіцієнта гідрофобності амінокислоти у забезпеченні узгодженої біологічної функції білка є загальновідомою [див., наприклад, Kyte et al., 1982, J. Mol. Biol 157:105-131]. Відомо, що певні амінокислоти можуть бути заміщені іншими амінокислотами, які мають подібний коефіцієнт або бал гідрофобності і, до того ж, виявляють подібну біологічну активність. При виконанні замін, основаних на коефіцієнті гідрофобності, в деяких варіантах винаходу, розглянуто заміни амінокислот, коефіцієнт гідрофобності яких знаходиться в межах ± 2 . В деяких варіантах, розглянуто заміни тих амінокислот, що знаходяться в межах +1, і в деяких варіантах, - тих, що знаходяться в межах ± 0.5 .

Зрозуміло також, що заміни подібних амінокислот можуть бути виконані ефективно, виходячи з їх гідрофільності, особливо, у тому випадку, якщо біологічно функціональний білок або пептид, отриманий у подібний спосіб, призначений для використання в імунологічних варіантах здійснення винаходу, як тут висвітлено. В деяких варіантах винаходу, найвища локальна середня гідрофільність білка, яка регулюється гідрофільністю прилеглих амінокислот, пов'язана з їх імуногенністю і антигенністю, тобто, з біологічною активністю білка.

Наступні значення гідрофільності відповідають цим амінокислотним залишкам: аргінін (+3.0); лізин (+3.0); аспартат (+3.0 \pm 1); глутамат (+3.0 \pm 1); сериї (+0.3); аспарагін (+0.2); глутамін (+0.2); гліцин

(0); треонін (-0.4); пролін (-0.5 \pm 1); аланін (-0.5); гістидин (-0.5); цистеїн (-1.0); метіонін (-1.3); валін (-1.5); лейцин (-1.8); ізолейцин (-1.8); тирозин (-2.3); фенілаланін (-2.5) і триптофан (-3.4). При виконанні замін, що основані на подібних значеннях гідрофільності, в деяких варіантах винаходу, розглянуто заміни амінокислот, коефіцієнт гідрофобності яких знаходиться в межах ± 2 . В деяких варіантах винаходу, розглянуто заміни тих амінокислот, що знаходяться в межах ± 1 , і в деяких варіантах, тих, що знаходяться в межах ± 0.5 . В деяких варіантах мають також бути ідентифіковані епітопи первинних послідовностей амінокислот, на основі їх гідрофільності. Ці ділянки називаються також як "епітопні каркасні ділянки".

Типові амінокислотні заміни наведено в Таблиці 1.

Таблиця 1

Амінокислотні заміни

Вихідні залишки	Типові заміни	Кращі заміни
Ala	Val, Leu, He	Val
Arg	Lys, Gin, Asn	Lys
Asn	Gin	Gin
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gin	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Glv	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gin, Lys, Arg	Arg
lie	Leu, Val, Met, Ala, Phe, норлейцин	Leu
Leu	Норлейцин, lie, Val, Met, Ala, Phe	lie
Lys	Arg, 1,4діаміно-масляна кислота, Gin, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, lie	Leu
Phe	Leu, Val, He, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Tro	Tvr, Phe	Tvr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	lie, Met, Leu, Phe, Ala, норлейцин	Leu

Досвідчений фахівець здатний визначити прийнятні варіанти поліпептиду, наведені тут, за допомогою загальновідомих методик. В деяких варіантах винаходу, кожен, хто має досвід роботи в галузі, може ідентифікувати прийнятні ділянки молекули, які можуть бути замінені без порушення активності, визначаючи ділянки, що не є важливими для активності. В інших варіантах винаходу, досвідчений фахівець може ідентифікувати залишки і частини молекули, які збереглись серед подібних поліпептидів. В інших варіантах винаходу, навіть області, що можуть бути важливими для біологічної активності або для структури, можуть бути об'єктом для консервативних амінокислотних замін без порушення біологічної активності або

без несприятливого впливу на структуру поліпептиду.

Крім того, кожен, хто має досвід роботи в галузі, може здійснити огляд структурно-функціональних досліджень, спрямованих на ідентифікацію залишків у подібних поліпептидах, що є важливими для активності або структури. З огляду таких порівнянь, досвідчений фахівець може зробити припущення щодо значення амінокислотних залишків у білку, який відповідає амінокислотним залишкам для активності або структури у подібних білках. Будь-хто з досвідом роботи в галузі може обрати серед хімічно подібних амінокислотних замін такі важливі амінокислотні залишки.

Будь-хто з досвідом роботи в галузі може також проаналізувати тривимірну структуру і амінокислотну послідовність у зв'язку із структурою подібних поліпептидів. Беручи до уваги таку інформацію, кожен з досвідом роботи в галузі може зробити припущення щодо розташування амінокислотних залишків поліпептиду, що стосується її тривимірної структури. В деяких варіантах винаходу, кожен з досвідом роботи в галузі може не робити радикальних замін амінокислотних залишків, що, як того очікують, знаходяться на поверхні білка, оскільки такі залишки можуть бути включені у важливі взаємодії з іншими молекулами. Однак, кожен з досвідом роботи в галузі може створити тестові варіанти, що включають поодинокі амінокислотні заміни на місцем положення кожного бажаного амінокислотного залишка. Після цього може бути здійснений скринінг цих варіантів з використанням методів кількісного визначення активності, що відомі пересічному фахівцю з досвідом роботи в галузі. Такі варіанти можуть бути використані для накопичення інформації про прийнятні варіанти. Наприклад, якщо буде встановлено, що заміна певного амінокислотного залишка призводить до нейтралізації, небажаного зменшення або неприйнятної активності, варіантів з такими замінами можна уникнути. Іншими словами, ґрунтуючись на інформації, що отримана з таких рутинних досліджень, будь-хто з досвідом роботи в галузі може легко визначити амінокислоти, подальшої заміни яких слід уникати або окремо або в комбінації з іншими мутаціями.

Ціла низка наукових публікацій присвячена передбаченню вторинної структури. Див. Moulton, 1996, *Curr. Opin. in Biotech.* 7:422-427; Chou et al., 1974, *Biochemistry* 13:222-245; Chou et al., 1974, *Biochemistry* 113:211-222; Chou et al., 1978, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 47:45-148; Chou et al., 1979, *Ann. Rev. Biochem.* 47:251-276; and Chou et al., 1979, *Biophys. J.* 26:367-384. До того ж, наразі є комп'ютерні програми, які призначені для того, щоб допомогти передбачити вторинну структуру. Один з методів передбачення вторинної структури ґрунтується на моделюванні гомології. Наприклад, два поліпептиди або білки, що мають ідентичність послідовності, більше, ніж 30%, або подібність, більше, ніж 40%, часто мають подібну структурну топологію. Нещодавнє зростання бази даних про структуру білка (PDB) істотно розширило можливість передбачення вторинної структури, включаючи потенційну кількість складок в конформації

поліпептидів або білків. Див. Holm et al., 1999, *Nucl. Acid. Res.* 27:244-247. Було зроблено припущення (Brenner et al., 1997, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7:369-376), що існує обмежена кількість складок у даного поліпептиду або білка і якщо визначена критична кількість складок структури, можливості щодо точного передбачення вторинної структури різко зростають.

Додаткові методи передбачення вторинної структури включають "витягування в нитку" ("threading"), (Jones, 1997, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7:377-87; Sippl et al., 1996, *Structure* 4:15-19), "профільний аналіз" (Bowie et al., 1991, *Science* 253:164-170; Gribskov et al., 1990, *Meth. Enzym.* 183:146-159; Gribskov et al., 1987, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 84:4355-4358), і "еволюційне зчеплення" (див. Holm, 1999, *supra*; and Brenner, 1997, *supra*).

В деяких варіантах здійснення винаходу, варіанти білка включають варіанти глікозилювання, в яких число і/або тип центрів глікозилювання змінені у порівнянні з амінокислотними послідовностями вихідного поліпептиду. В деяких варіантах здійснення винаходу, варіанти білка включають більшу або меншу кількість N-зв'язаних центрів глікозилювання, ніж нативний білок. N-зв'язаний центр глікозилювання характеризується такою послідовністю: Asn-X-Ser або Asn-X-Thr, в якій амінокислотним залишком, позначеним як X, може бути будь-який амінокислотний залишок, крім проліну. Заміна амінокислотних залишків, що призводить до створення такої послідовності, забезпечує потенційний новий центр для приєднання N-зв'язаного вуглеводневого ланцюга. Альтернативно, заміщення, які елімінують цю послідовність, будуть призводити до вилучення наявних N-зв'язаних вуглеводневих ланцюгів, при якому один або більше N-зв'язаних центрів глікозилювання (як правило, тих, що зустрічаються в природі) елімінуються і один або кілька нових N-зв'язаних центрів створюються. Додаткові варіанти, яким слід надати перевагу, включають цистеїнові варіанти, в яких один або більше цистеїнових залишків вилучаються або заміщуються іншою амінокислотою (наприклад, серином) у порівнянні з вихідною амінокислотою послідовністю. Цистеїнові варіанти можуть використовуватись, якщо білки повинні бути упаковані в біологічно активну конформацію, такі як після виділення нерозчинних тілець включення. Цистеїнові варіанти, як правило, мають меншу кількість цистеїнових залишків, ніж нативний білок, і, як правило, мають парну кількість, для того щоб мінімізувати взаємодію, що призводить до виникнення цистеїнових залишків, які не мають пари.

В додаткових варіантах здійснення винаходу, варіанти білків можуть включати мутації, такі як заміни, приєднання, делеції, або будь-які їх комбінації, і, як правило, утворюються шляхом сайт-специфічного мутагенезу з використанням одного або кількох мутагенних олігонуклеотидів (дів) відповідно до описаних тут методів, а також методів, що відомі в цій галузі (див., наприклад, Sambrook et al., *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL*, 3rd Ed., 2001, Cold Spring Harbor, N.Y. and Berger and Kimmel, *METHODS IN ENZYMOLOGY*, Volume 152, Guide to Molecular

Cloning Techniques, 1987, Academic Press, Inc., San Diego, CA., кожен з яких включений тут у вигляді посилання).

Відповідно до певних варіантів здійснення винаходу, амінокислотні заміни - це ті заміни, що: (1) зменшують чутливість до протеолізу, (2) зменшують чутливість до окиснення, (3) змінюють зв'язуючу афінність для утворення білкових комплексів, (4) змінюють зв'язуючі афінності, і/або (5) надає або модифікує інші фізико-хімічні або функціональні властивості таких поліпептидів. Відповідно до певних варіантів здійснення винаходу, поодинокі або численні амінокислотні заміни (в деяких втіленнях, консервативні амінокислотні заміни) можуть бути здійснені в послідовностях, що зустрічаються в природі (в деяких втіленнях, в ділянці поліпептиду, яка розташована поза доменом(ами), утворюючи міжмолекулярні контакти). В кращих варіантах здійснення винаходу, консервативна амінокислотна заміна, як правило, істотно не змінює структурних особливостей вихідної послідовності (наприклад, заміщення амінокислоти не повинно призводити до порушення спіралі, яка зустрічається у вихідній послідовності, або до розриву інших типів вторинної структури, яка притаманна вихідній послідовності). Приклади розшифрованої вторинної і третинної структури поліпептидів наведено в PROTEINS, STRUCTURES AND MOLECULAR PRINCIPLES, (Creighton, Ed.), 1984, W. H. Freeman and Company, New York; INTRODUCTION TO PROTEIN STRUCTURE (C. Branden and J. Tooze, eds.), 1991, Garland Publishing, New York, N.Y.; and Thornton et al., 1991, Nature 354:105, кожен з яких включений тут як посилання.

Аналоги пептидів, як правило, використовуються у фармацевтичній промисловості як непептидні ліки з властивостями, аналогічними тим, що мають пептиди-матриці. Ці приклади непептидних сполук називаються "міметики пептидів" або "пептидоміметики". Див. Fauchere, Adv. Drug Res. 15:29; Veber & Freidinger, 1985, TINS p.392; and Evans et al., J. Med. Chem. 30:1229, кожен з яких включений тут як посилання для використання з будь-якою метою. Такі сполуки часто розробляються за допомогою комп'ютерного молекулярного моделювання. Пептидні міметики, що структурно подібні до пептидів, які використовуються з терапевтичною метою, можуть бути використані для отримання аналогічного терапевтичного або профілактичного ефекту. Як правило, пептидоміметики структурно подібні до типового поліпептиду (тобто, поліпептиду, який має біохімічні властивості або фармакологічну активність), такого як антитіло людини, але має один або більше пептидних зв'язків, необов'язково заміщених зв'язком, що обраний з: $-\text{CH}_2-\text{NH}-$, $-\text{CH}_2-\text{S}-$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}=\text{CH}-$ (cis і trans), $-\text{COCH}_2-$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$, і $\text{CH}_2\text{SO}-$, за допомогою методів, добре відомих в галузі. Систематична заміна однієї або більшої кількості амінокислот у консенсусній послідовності D-амінокислою того ж самого типу (наприклад, D-лізином замість L-лізину) може бути використана в деяких варіантах здійснення винаходу, для того щоб отримати стійкіші пептиди. Крім того, непри-

родні пептиди, які несуть консенсусну послідовність або варіацію, що значною мірою ідентична консенсусній послідовності, можуть бути створені за допомогою загальновідомих методів (Rizo & Gierasch, 1992, Ann. Rev. Biocliem. 61:387, включених тут у вигляді посилань для використання з будь-якою метою); наприклад, шляхом додавання внутрішніх цистеїнових залишків, здатних утворювати внутрішньомолекулярні дисульфідні зв'язки, що циклізують пептид.

(а) Властивості антагоністів модифікованого IL-4 мутеїнового рецептора

"Антагоністи модифікованого IL-4 мутеїнового рецептора", як тут використовується, включають IL-4RA мутеїн, описаний в патентах США 6,028,176 & 6,313,272 (включені тут як посилання у повному обсязі) з додатковими амінокислотними замінами, при яких вказані заміни роблять можливим сайт-специфічне приєднання, щонайменше, одного полімера небілкової природи, такого як поліпропіленгліколь, поліоксикалілен, або молекули поліетиленгліколю (ПЕГ) до мутеїну. Сайт-специфічне зв'язування ПЕГ, наприклад, дозволяє отримати модифікований мутеїн, що має переваги поліетиленгліколь-глікозильованої (ПЕГільованої) молекули, а саме, підвищує час напіввиведення з плазми і зменшує імуногенність, в той же час підтримуючи вищу активність, ніж стратегії неспецифічного ПЕГ-ілювання, такого як ПЕГ-ілювання N-термінальних ланцюгів у бічних ланцюгах лізину. Також цьому винаходу є притаманним добір специфічного центра заміни амінокислоти, який робить можливим утворення відповідної конформації молекули після експресії. Антагоністи модифікованого IL-4 мутеїнового рецептора зв'язуються з BL-4 і IL-13 з втратою афінності не більшою, ніж в 10 разів у порівнянні з афінністю до IL-4RA. Антагоністи модифікованого IL-4 мутеїнового рецептора інгібують активність, опосередковану IL-4 і IL-13, з втратою активності не більше, ніж в 10 разів у порівнянні з активністю IL-4RA. Крім того, антагоністи модифікованого IL-4 мутеїнового рецептора мають період напіввиведення з плазми, який, щонайменше, від 2 до 10 разів більший, ніж антагоністи немодифікованого IL-4RA.

Для IL-4 мутеїнів цього винаходу можуть також бути притаманні амінокислотні інсерції, делеції, заміни або модифікації в одному або кількох сайтах або в інших залишках ланцюга нативного IL-4 поліпептиду. Відповідно до цього винаходу будь-які такі інсерції, делеції, заміни або модифікації повинні призвести до утворення IL-4 мутеїну, який зберігає IL-4-споріднену активність.

В додатковому аспекті цього винаходу забезпечується спосіб, за допомогою якого білок експресується і упаковується, як зображено в Прикладі 2. IL-4 мутеїн повинен бути належним чином очищений, для того щоб забезпечити ефективне ПЕГілювання. Спосіб очистки описується, наприклад, в Прикладі 2 нижче. Якщо "пакування" мутеїну відбувається у присутності речовини, що захищає сульфгідрильні групи, такої як бета-меркаптоетанол, глутатіон або цистеїн, очищений мутеїн може не бути ПЕГільований, тому що активна сульфгідрильна група у введеному цистеїні в

IL-4 інактивується окисленою захисною речовиною. Ковалентний дисульфідний зв'язок утворюється між вільним цистеїном IL-4 мутеїну і захисним агентом. І, навпаки, використання як агента, що захищає сульфгідрильну групу, дитіотреїтолу (ДТТ), який окиснюється, утворюючи стійкий дисульфідний зв'язок, не утворюватиме ковалентного зв'язку з вільним цистеїном IL-4 мутеїну, внаслідок чого сульфгідрильна група залишається вільною і реагує з реактивом ПЕГ-імідом малеїнової кислоти. IL-4 мутеїни, очищені після упаковування в присутності бета-меркаптоетанолу, глутатіону або цистеїну, можуть реагувати з ПЕГ реактивом, якщо на них подіяти ДТТ, однак утворюється суміш моноПЕГільованих і мультиПЕГільованих продуктів, що дає підставу зробити припущення, що існуючі IL-4 цистеїни також ПЕГільовані. ПЕГільовання існуючих цистеїнів призвело б до утворення продуктів з неправильною конформацією, які є неактивними.

K_d антагоністів модифікованого IL-4 мутеїнового рецептора до IL-4 рецептора може бути визначено кількісно за допомогою будь-яких загальновідомих методів, включаючи технології, такі як аналіз взаємодії біологічних молекул в масштабі реального часу (Biomolecular Interaction Analysis - BIA), описаний в Прикладі 4. BIA - це технологія дослідження біоспецифічної взаємодії в реальному часі, без мічення будь-якої з речовин, що взаємодіють (наприклад, BIAcore™). Зміни оптичного явища поверхневого плазмонного резонансу (surface plasmon resonance - SPR) можуть бути використані як показник взаємодії в реальному часі між біологічними молекулами.

Здатність антагоністів модифікованого IL-4 мутеїнового рецептора інгібувати реакцію проліферації імунних клітин можна оцінити за допомогою проліферативних тестів, охоплених в Прикладі 5, і ця здатність виражається як концентрація інгібування 50% (IC₅₀).

В BIAcore™ аналізі, антагоністи модифікованого IL-4 мутеїнового рецептора даного винаходу специфічно зв'язуються з IL-4 рецептором людини з кращою K_d в межах від, приблизно, 1.0 нМ до, приблизно, 100 нМ. Ще кращі варіанти здійснення даного винаходу зв'язують IL-4 рецептор людини з K_d приблизно, від 0.5 нМ до, приблизно, 1.0 мкМ. Ще більш покращені варіанти здійснення цього винаходу зв'язують IL-4 рецептор людини з K_d , приблизно, від 0.1 нМ до, приблизно, 10 мкМ. Крім того, антагоністи модифікованого IL-4 мутеїнового рецептора даного винаходу, як того слід очікувати, будуть зв'язуватись з IL-4 рецептором людини і нейтралізувати його здатність викликати реакцію проліферації імунних клітин з кращим IC₅₀, що знаходиться в межах від, приблизно, 1.0 нМ до, приблизно, 100 нМ. Ще кращі антагоністи людини зв'язують IL-4 рецептор і нейтралізують його здатність до проліферації імунних клітин з IC₅₀, що знаходиться в межах від, приблизно, 0.5 нМ до 1 мкМ; причому найкращі антагоністи цього винаходу зв'язують та інгібують IL-4 рецептор з IC₅₀, що становить, приблизно, від 0.1 нМ до, приблизно, 10 нМ.

Дійсні варіанти антагоністів IL-4 мутеїнового рецептора даного винаходу також виявляють період напіввиведення з плазми, який переважно, принаймні, в 2-10 разів більший, ніж період напіввиведення немодифікованого IL4RA, причому найкращі варіанти здійснення даного винаходу виявляють період напіввиведення з плазми, який в 10-100-разів перевищує період напіввиведення з плазми немодифікованого IL-4RA (див. Приклад 7).

Кількість антагоністів IL-4 мутеїнового рецептора, що мають особливості, описані вище, було ідентифіковано шляхом скринінгу кандидатів за допомогою наведених вище методів кількісного аналізу. Варіанти здійснення даного винаходу мають поліпептидні послідовності, представлені в Таблиці 2 (SEQ ID NOS: 10-16).

Таблиця 2

Поліпептидні послідовності

SEQ ID No.	Назва	Послідовність
9	IL4RA	MHKCDITLQEIITLNSLTEQKTLCTELTVTDIFAA SKNTTEKETFCRAATVLRQFYSHHEKDRCLGAT AQGFHRHKQLIRFLKRLDRNLWGLAGLNSCPVKE ANQSTLENFLERLKTIMDEKDSKCSS
10	IL4-RE-T28C	MHKCDITLQENKTLNSLTEQKTLCTELCVTDIFA ASKNTTEKETFCRAATVLRQFYSHHEKDRCLG ATAQQFHRHKQLIRFLKRLDRNLWGLAGLNSCP VKEANQSTLENFLERLKTIMDEKDSKCSS
11	IL4-RE-S36C	MHKCDITLQENKTLNSLTEQKTLCTELTVTDIFA ACKNTTEKETFCRAATVLRQFYSHHEKDRCLG ATAQQFHRHKQLIRFLKEJLDRNLWGLAGLNSCP VKEANQSTLENFLERLKTIMDEKDSKCSS
12	IL4-RE-K37C	MHKCDITLQEIITLNSLTEQKTLCTELTVTDIFA ASCNTTEKETFCRAATVLRQFYSHHEKDRCLG ATAQQFHRHKQLIRFLKRLDRNLWGLAGLNSCP VKEANQSTLENFLERLKTIMDEKDSKCSS
13	IL4-RE-N38C	MHKCDITLQEIITLNSLTEQKTLCTELTVTDIFA ASKCTTEKETFCRAATVLRQFYSHHEKDRCLG ATAQQFHRHKQLIRFLKRLDRNLWGLAGLNSCP VKEANQSTLENFLERLKTIMDEKDSKCSS
14	IL4-RE-A104C	MHKCDITLQEIITLNSLTEQKTLCTELTVTDIFA ASKNTTEKETFCRAATVLRQFYSHHEKDRCLG ATAQQFHRHKQLIRFLKRLDRNLWGLAGLNSCP VKECNQSTLENFLERLKTIMDEKDSKCSS

15	IL4-RE-N105C	MHKCDITLQEIITLNSLTEQKTLCTELTVTDIFA ASKNTTEKETFCRAATVLRQFYSHHEKDTRCLG ATAQQFHRHKQLIRFLKRLDRNLWGLAGLNSCP VKEACQSTLENFLERLKTIMDEKDSKCSS
16	IL4-RE-Q106C	MHKCDITLQEIITLNSLTEQKTLCTELTVTDIFA ASKNTTEKETFCRAATVLRQFYSHHEKDTRCLG ATAQQFHRHKQLIRFLKRLDRNLWGLAGLNSCP VKEANCSTLENFLERLKTIMDEKDSKCSS

(b) Полінуклеотиди, які кодують антагоністи модифікованого IL-4 мутейнового рецептора

Винахід також надає полінуклеотиди, що кодують антагоністи модифікованого IL-4 мутейнового рецептора. Ці полінуклеотиди можуть бути використані, наприклад, для того щоб, продукувати кількості антагоністів, необхідні для терапевтичного використання.

Полінуклеотид винаходу легко можна отримати за допомогою цілої низки способів, включаючи без обмеження, хімічний синтез, скринінг кДНК або геномних бібліотек, скринінг бібліотеки експресії, і/або полімеразної ланцюгової реакції ампліфікації кДНК.

Методики рекомбінантних ДНК, описані тут, як правило, ті, що наведені в Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) і/або Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds., Green Publishers Inc. and Wiley and Sons 1994). Цей винахід передбачає молекули нуклеїнової кислоти, що тут описані, а також способи отримання таких молекул.

Одним із методів отримання прийнятної послідовності нуклеїнової кислоти є полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР). В цьому методі, кДНК тримають з полі(А)+РНК або з цілої РНК за допомогою фермента зворотньої транскриптази. Два прайме-

ри, як правило, комплементарні до двох окремих ділянок кДНК антагоніста модифікованого IL-4 мутейнового рецептора, додають потім до кДНК разом з полімеразою, такою як Taq полімераза, і полімераза ампліфікує ділянку кДНК між двома праймерами.

Іншими засобами отримання молекули нуклеїнової кислоти винаходу є хімічний синтез з використанням методів, добре відомих досвідченому фахівцю, описаних Engels et al., 1989, Angew. Chem. Intl. Ed. 28:716-34. Ці методи включають, inter alia, фосфортриестерний, фосфорамідитний, Н-фосфонатний методи синтезу нуклеїнової кислоти. Кращим способом такого хімічного синтезу є полімеризуючий синтез з використанням стандартних методик фосфорамідитної хімії. Як правило, ДНК матиме кілька сотень нуклеотидів у довжину. Нуклеїнові кислоти, довжина яких перевищує, приблизно, 100 нуклеотидів, можуть бути синтезовані у вигляді кількох фрагментів з допомогою цих методик. Потім ці фрагменти можуть бути зшиті разом. Також можуть бути використані інші методи, відомі досвідченому фахівцеві в цій галузі.

Полінуклеотиди винаходу, які можуть бути використані, для того щоб кодувати антагоністи модифікованого IL-4 мутейнового рецептора, наведено в Таблиці 3 (SEQ ID NOS: 2-8).

Таблиця 3

Полінуклеотидні послідовності

SEQ ED No.	Назва	Послідовність
1	IL4RA	ATGCACAAGTGCATATCACCTTACAGGAGATC ATCAAAACTTTGAACAGCCTCACAGAGCAGAA GACTCTGTGCACCGAGTTGACCGTAACAGACAT CTTTGCTGCCTCCAAGAACAACACTGAGAAGGA AACCTTCTGCAGGGCTGCGACTGTGCTCCGGCA GTTTACAGCCACCATGAGAAGGACACTCGCTG CCTGGGTGCGACTGCACAGCAGTTCCACAGGCA CAAGCAGCTGATCCGATTCTGAAACGGCTCGA CAGGAACCTCTGGGGCTGGCGGGCTTGAATTCT CTGCTCTGTGAAGGAAGCCAACCAAGTACGTT GGAAAACCTCTTGGAAAGGCTAAAGACGATCAT GGACGAGAAAGACTCAAAGTGTTCGAGCTAAT AA
2	IL4-RE-T28C	ATGCACAAGTGCATATCACCTTACAGGAGAT CATCAAAACTTTGAACAGCCTCACAGAGCAGAA AGACTCTGTGCACCGAGTTGTGCGTAACAGAC ATCTTTGCTGCCTCCAAGAACAACACTGAGAA GGAAACCTTCTGCAGGGCTGCGACTGTGCTCC GGCAGTTCTACAGCCACCATGAGAAGGACACT CGCTGCCTGGGTGCGACTGCACAGCAGTTCCA CAGGCACAAGCAGCTGATCCGATTCTGAAAC GGCTCGACAGGAACCTCTGGGGCTGGCGGGC TTGAATTCTGTCTGTGAAGGAAGCCAACCA GAGTACGTTGGAAAACCTTCTTGGAAAGGCTAA AGACGATCATGGACGAGAAAGACTCAAAGTGT TCGAGCTAATAA

3	IL4-RE-S36C	ATGCACAAGTGCGATATCACCTTACAGGAGAT CATCAAACTTTGAACAGCCTCACAGAGCAGA AGACTCTGTGCACCGAGTTGACCGTAACAGAC ATCTTTGCTGCCTGCAAGAACAACACTGAGAA GGAAACCTTCTGCAGGGCTGCGACTGTGCTCC GGCAGTTCTACAGCCACCATGAGAAGGACACT CGCTGCCTGGGTGCGACTGCACAGCAGTTCCA CAGGCACAAGCAGCTGATCCGATTCTGAAAC GGCTCGACAGGAACCTCTGGGGCCTGGCGGGC TTGAATTCCTGTCTGTGAAGGAAGCCAACCA GAGTACGTTGAAAACCTCTTGGAAAGGCTAA AGACGATCATGGACGAGAAAGACTCAAAGTGT TCGAGCTAATAA
4	IL4-RE-K37C	ATGCACAAGTGCGATATCACCTTACAGGAGAT CATCAAACTTTGAACAGCCTCACAGAGCAGA AGACTCTGTGCACCGAGTTGACCGTAACAGAC ATCTTTGCTGCCTCCTGCAACAACAAGTGAAGAA GGAAACCTTCTGCAGGGCTGCGACTGTGCTCC GGCAGTTCTACAGCCACCATGAGAAGGACACT CGCTGCCTGGGTGCGACTGCACAGCAGTTCCA CAGGCACAAGCAGCTGATCCGATTCTGAAAC GGCTCGACAGGAACCTCTGGGGCCTGGCGGGC TTGAATTCCTGTCTGTGAAGGAAGCCAACCA GAGTACGTTGAAAACCTCTTGGAAAGGCTAA AGACGATCATGGACGAGAAAGACTCAAAGTGT TCGAGCTAATAA
5	IL4-RE-N38C	ATGCACAAGTGCGATATCACCTTACAGGAGAT CATCAAACTTTGAACAGCCTCACAGAGCAGA AGACTCTGTGCACCGAGTTGACCGTAACAGAC ATCTTTGCTGCCTCCAAGTGCAACAAGTGAAGAA GGAAACCTTCTGCAGGGCTGCGACTGTGCTCC GGCAGTTCTACAGCCACCATGAGAAGGACACT CGCTGCCTGGGTGCGACTGCACAGCAGTTCCA CAGGCACAAGCAGCTGATCCGATTCTGAAAC GGCTCGACAGGAACCTCTGGGGCCTGGCGGGC TTGAATTCCTGTCTGTGAAGGAAGCCAACCA GAGTACGTTGAAAACCTCTTGGAAAGGCTAA AGACGATCATGGACGAGAAAGACTCAAAGTGT TCGAGCTAATAA
6	IL4-RE-A104C	ATGCACAAGTGCGATATCACCTTACAGGAGAT CATCAAACTTTGAACAGCCTCACAGAGCAGA AGACTCTGTGCACCGAGTTGACCGTAACAGAC ATCTTTGCTGCCTCCAAGAACAACAAGTGAAGAA GGAAACCTTCTGCAGGGCTGCGACTGTGCTCC GGCAGTTCTACAGCCACCATGAGAAGGACACT CGCTGCCTGGGTGCGACTGCACAGCAGTTCCA CAGGCACAAGCAGCTGATCCGATTCTGAAAC GGCTCGACAGGAACCTCTGGGGCCTGGCGGGC TTGAATTCCTGTCTGTGAAGGAAGCTCAACCA GAGTACGTTGAAAACCTCTTGGAAAGGCTAA AGACGATCATGGACGAGAAAGACTCAAAGTGT TCGAGCTAATAA
7	IL4-RE-N105C	ATGCACAAGTGCGATATCACCTTACAGGAGAT CATCAAACTTTGAACAGCCTCACAGAGCAGA AGACTCTGTGCACCGAGTTGACCGTAACAGAC ATCTTTGCTGCCTCCAAGAACAACAAGTGAAGAA GGAAACCTTCTGCAGGGCTGCGACTGTGCTCC GGCAGTTCTACAGCCACCATGAGAAGGACACT CGCTGCCTGGGTGCGACTGCACAGCAGTTCCA CAGGCACAAGCAGCTGATCCGATTCTGAAAC GGCTCGACAGGAACCTCTGGGGCCTGGCGGGC TTGAATTCCTGTCTGTGAAGGAAGCCTGCCA GAGTACGTTGAAAACCTCTTGGAAAGGCTAA AGACGATCATGGACGAGAAAGACTCAAAGTGT TCGAGCTAATAA
8	IL4-RE-Q106C	ATGCACAAGTGCGATATCACCTTACAGGAGAT CATCAAACTTTGAACAGCCTCACAGAGCAGA AGACTCTGTGCACCGAGTTGACCGTAACAGAC ATCTTTGCTGCCTCCAAGAACAACAAGTGAAGAA GGAAACCTTCTGCAGGGCTGCGACTGTGCTCC GGCAGTTCTACAGCCACCATGAGAAGGACACT CGCTGCCTGGGTGCGACTGCACAGCAGTTCCA CAGGCACAAGCAGCTGATCCGATTCTGAAAC GGCTCGACAGGAACCTCTGGGGCCTGGCGGGC TTGAATTCCTGTCTGTGAAGGAAGCCAACCTG CAGTACGTTGAAAACCTCTTGGAAAGGCTAA AGACGATCATGGACGAGAAAGACTCAAAGTGT TCGAGCTAATAA

Винахід також надає експресуючі вектори, що включають полінуклеотид винаходу і клітину-

господаря, яка містить експресуючий вектор винаходу.

Полінуклеотид винаходу може бути вмонтований у прийнятний експресуючий вектор за допомогою стандартної методики зшивання. Обирається вектор, що, як правило, повинен бути функціональним в певній клітині-господарі, який використовується (тобто, вектор є сумісним з біомеханікою клітини-господаря, так що може відбуватись ампліфікація гена і/або експресія гена). Полінуклеотид винаходу може бути експресований в клітинах прокариотів, дріжджів, комах (системи бакуловірусів) і/або еукаріотичні клітини-господарі. Вибір клітини-господаря буде залежати від різних факторів, таких як бажаний рівень експресії. Для огляду експресуючих векторів, див. Meth. Em., vol. 185 (D.V. Goeddel, ed., Academic Press 1990).

Як правило, експресуючі вектори, що використовуються в клітинах-господарях, будуть нести послідовності для підтримання плазмід і для клонування і експресії екзогенних нуклеотидних послідовностей. Такі послідовності, що разом називаються як "фланківні послідовності", в деяких втіленнях будуть, як правило, включати одну або більше наступних нуклеотидних послідовностей: промотор, одну або більше енхансерних послідовностей, послідовності ініціації реплікації і термінації транскрипції, послідовність повного інтрона, що включає донорний і акцепторний сайт сплайсингу, послідовність, яка кодує лідерну послідовність для секреції поліпептиду, зв'язуючий центр рибосоми, послідовність поліаденілювання, полілінкерну ділянку для вставки нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид, який буде експресуватись, і маркерний елемент, який селектується. Кожна з цих послідовностей обговорюється нижче.

Фланківні послідовності можуть бути гомологічними (тобто, походити від одного й того ж виду і/або штаму клітини-господаря), гетерологічними (тобто, від інших видів, ніж вид клітини-господаря або штама), гібридними (тобто, комбінування фланківних послідовностей, що походять з кількох джерел), або синтетичними, або фланківні послідовності можуть бути природними послідовностями, функція яких, як правило, полягає в тому, щоб регулювати експресію антагоніста рецептора IL-4 мутеїну. По суті, джерелом фланківної послідовності може бути будь-який прокариотичний або еукаріотичний організм, організм будь-якого виду хребетної або безхребетної тварини, або будь-яка рослина, за умови, що фланківна послідовність є функціональною, і може бути активізована за допомогою біомеханіки клітини-господаря.

Фланківні послідовності, які використовуються у векторах цього винаходу, можуть бути отримані за допомогою будь-якого з кількох методів, що є загальновідомими в галузі. Як правило, фланківні послідовності, що тут використовуються, - інші ніж фланківні послідовності гена антагоніста IL-4 мутеїнового рецептора - повинні попередньо бути ідентифіковані за допомогою картування і/або шляхом розщеплення за допомогою рестриційних ендонуклеаз і можуть, таким чином, бути ізольовані з відповідної тканини за допомогою відповідних рестриційних ендонуклеаз. В деяких випадках, повна нуклеотидна послідовність фланківної послідовності може бути відома. Тут, фланківна послідовність

може бути синтезована за допомогою методів, що описані тут для синтезу нуклеїнової кислоти або для клонування.

Якщо всі або лише одна частина фланківної послідовності відомі, її можна отримати за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) і/або шляхом скринінгу геномної бібліотеки з прийнятної олігонуклеотиду і/або фрагменту фланківної послідовності від одного й того ж або іншого виду. Якщо фланківна послідовність невідома, фрагмент ДНК, що включає фланківну послідовність, може бути ізольований з більшого фрагмента ДНК, який може включати, наприклад, кодуєчу послідовність або навіть інший ген або гени. Виділення можна провести за допомогою розщеплення рестрикційними ендонуклеазами, для того щоб отримати відповідний фрагмент ДНК, після чого йде виділення з використанням очищення на агарозному гелі, Qiagen® колонкова хроматографія (Chatsworth, CA), або інших методів, відомих досвідченому фахівцю у цій галузі. Відбір прийнятних ферментів для досягнення цієї мети є цілком очевидним для пересічного фахівця з досвідом роботи у цій галузі.

Сайт ініціації реплікації, як правило, є частиною експресуючих прокариотичних векторів, які є комерційно доступними, і реплікатор сприяє ампліфікації вектора в клітині-господарі. Якщо обраний вектор не містить сайту ініціації реплікації, він може бути хімічно синтезований, ґрунтуючись на відомій послідовності, і вшитий у вектор. Наприклад, сайт ініціації реплікації від плазміди pBR322 (New England Biolabs, Beverly, MA) прийнятий для більшості грам-негативних бактерій і різних реплікаторів (наприклад, SV40, вірусу поліоми, аденовірусу, вірусу везикулярного стоматиту (VSV), або папіломавірусів, таких як HPV або BPV), використовується для клонуючих векторів у клітинах ссавців. Як правило, складова частина ініціації реплікації не потрібна для експресуючих векторів ссавців (наприклад, SV40 реплікатор часто використовується лише тому, що він містить головний промотор).

Послідовність термінації транскрипції, як правило, розташована на 3'-кінці ділянки кодуєчого поліпептиду і слугує для термінації транскрипції. Як правило, послідовність термінації транскрипції у клітинах прокариотів являє собою багатий на G-C фрагмент, після якого йде poly-T-послідовність. Незважаючи на те що послідовність легко клонується з бібліотеки або навіть є комерційно доступною як частина вектора, її можна також легко синтезувати за допомогою методів синтезу нуклеїнової кислоти, що тут описані.

Елемент маркерного гена, що селектується, який кодує білок, необхідний для виживання і росту клітини на селективному культуральному середовищі. Типові маркерні гени, що селектуються, кодуєть білки, що (а) визначають резистентність до антибіотиків або інших токсинів, наприклад, ампіциліну, тетрацикліну, або канаміцину прокариотичних клітин-господарів; (б) компенсують аутокотрофну недостатність клітини; або (с) забезпечують необхідні поживні речовини, недоступні зі складних середовищ. Кращими маркерами, що селек-

туються, є ген резистентності до канаміцину, ген резистентності до ампіциліну, ген резистентності до тетрацикліну. Ген резистентності до неоміцину може також бути використаний для відбору в еукаріотичних і прокаріотичних клітинах-господарях.

Інші селективні гени можуть бути застосовані для ампліфікації гена, який буде експресуватись. Ампліфікація - це процес, протягом якого гени, що мають більшу потребу у продукуванні білка, необхідного для росту, реітеруються разом в хромосомах послідовних генерацій рекомбінантних клітин. Приклади прийнятних селективних маркерів для клітин ссавців включають дигідрофолатредуктазу (ДГФР) і тимідинкіназу. Трансформанти клітин ссавців розміщуються при тиску селективного добору, при якому лише трансформанти, надзвичайно адаптовані до виживання завдяки селективному гену, присутні у векторі. Тиск добору, що створюється шляхом культивування трансформованих клітин за умов, при яких концентрація селектувальної речовини в середовищі послідовно змінюється, призводячи у такий спосіб до ампліфікації як селективного гена, так і ДНК, що кодує антагоніста модифікованого IL-4 мутеїнового рецептора. Внаслідок цього, синтезуються антагоністи модифікованого IL-4 мутеїнового рецептора на ампліфікованій ДНК.

Сайт зв'язування рибосоми, як правило, необхідний для ініціації трансляції мРНК і характеризується послідовністю Шайна-Дальгарно (прокаріоти) або послідовністю Козак (еукаріоти). Цей елемент, як правило, розташований в положенні 3' щодо промотора і 5' - щодо кодувальної послідовності антагоніста модифікованого IL-4 мутеїнового рецептора. Послідовність Шайна-Дальгарно змінюється, але у типовому випадку вона являє собою поліпурин (тобто, має високий вміст А-Г). Багато послідовностей Шайна-Дальгарно були ідентифіковані, кожну з них легко можна синтезувати за допомогою методів, наведених тут, і використати у прокаріотичному векторі.

Лідерна, або сигнальна, послідовність може бути використана, для того щоб спрямувати антагоніст модифікованого IL-4 мутеїнового рецептора назовні з клітини-господаря. Як правило, нуклеотидна послідовність, яка кодує сигнальну послідовність, являє собою кодувальну ділянку молекули нуклеїнової кислоти антагоніста модифікованого IL-4 мутеїнового рецептора, або знаходиться безпосередньо в 5'-кінці кодувальної ділянки антагоніста модифікованого IL-4 мутеїнового рецептора. Було ідентифіковано багато сигнальних послідовностей, і будь-яка з них, що є функціональною у відібраній клітині-господарі, може бути використана у поєднанні з молекулою нуклеїнової кислоти антагоніста модифікованого IL-4 мутеїнового рецептора. Відповідно, сигнальна послідовність може бути гомологічна (зустрічається у природі) або гетерологічна щодо молекули нуклеїнової кислоти антагоніста модифікованого IL-4 мутеїнового рецептора. Крім того, сигнальна послідовність може бути хімічно синтезована за допомогою методів, які тут описані. У більшості випадків, секреція антагоніста модифікованого IL-4 мутеїнового рецептора з клітини-господаря за допомогою сигнального пептиду при-

зведе до видалення сигнального пептиду з секретованого антагоніста модифікованого IL-4 мутеїнового рецептора. Сигнальна послідовність може бути складовою частиною вектора або вона може бути частиною молекули нуклеїнової кислоти антагоніста модифікованого IL-4 мутеїнового рецептора, який вставлений у вектор.

У багатьох випадках, транскрипція молекули нуклеїнової кислоти підвищується за присутності одного або кількох інтронів у векторі; це особливо справедливо, якщо поліпептид продукується в клітинах-господарях еукаріотів, особливо у клітинах-господарях ссавців. Інтрони, які використовуються, можуть природньо зустрічатись в гені антагоніста модифікованого IL-4 мутеїнового рецептора, особливо якщо ген, що використовується, являє собою повну геномну послідовність або її фрагмент. Якщо інтрон природньо не зустрічається в межах цього гена, інтрон можна отримати з іншого джерела. Положення інтрона щодо фланківної послідовності і гена антагоніста модифікованого IL-4 мутеїнового рецептора, як правило, є важливим, оскільки інтрон повинен транскрибуватись, для того щоб бути ефективним. Таким чином, якщо молекула нуклеїнової кислоти винаходу транскрибується, таким положенням для інтрона є 3'-положення щодо сайту ініціації транскрипції і 5'-положення - щодо послідовності полі-А термінації транскрипції. Переважно, інтрон або інтрони можуть бути розташовані з одного боку або з різних боків (тобто, 5'- або 3'-) кДНК, так щоб не була перервана кодувальна послідовність. Будь-який інтрон з будь-якого джерела, включаючи віруси, прокаріотичні і еукаріотичні (рослина або тварина) організми, можуть бути використані при втіленні цього винаходу, за умови, що він сумісний з клітиною-господарем, в яку він інсертується. Також включені тут синтетичні інтрони. Необов'язково, у векторі може бути використано, більше, ніж один інтрон.

Експресуючі і клонуючі вектори даного винаходу, як правило, міститимуть промотор, який розпізнається організмом-господарем, який операбельно зшитий з молекулою нуклеїнової кислоти цього винаходу. Промотори являють собою нетранскрибовані послідовності, розташовані ліворуч (тобто, 5') від старт-кодону структурного гена (як правило, в межах, приблизно, від 100 до 1000 пар нуклеотидів), які контролюють транскрипцію структурного гена. Традиційно промотори групують в один з двох класів: керовані промотори і конститутивні промотори. Керовані промотори ініціюють зростання рівнів транскрипції з ДНК під їх контролем у відповідь на деякі зміни у культуральному середовищі, такі як наявність або відсутність поживної речовини або зміна температури. Конститутивні промотори, з іншого боку, ініціюють неперервне продукування продукту гена; тобто, контроль над експресією гена незначний або зовсім відсутній. Відома велика кількість промоторів, які розпізнаються різноманітними потенційними клітинами-господарями. Прийнятний промотор може бути функціонально зв'язаний з молекулою нуклеїнової кислоти винаходу шляхом видалення промотора з джерела ДНК за допомогою розщеп-

лення рестриктазою і інсерції потрібної промоторної послідовності у вектор. Нативна промоторна послідовність антагоніста IL-4 мутейнового рецептора може бути використана, для того щоб спрямувати ампліфікацію і/або експресію молекули нуклеїнової кислоти винаходу. Кращим є гетерологічний промотор, однак, якщо він забезпечує більшу транскрипцію і вищий вихід експресованого білка у порівнянні з нативним промотором, і якщо він сумісний з системою клітини-господаря, яка обрана для використання.

Промотори, прийнятні для використання з прокаріотами-господарями, включають системи β -лактамазного і лактозного промоторів; лужну фосфатазу; систему промотора триптофану (trp); і гібридні промотори, такі як tac-промотор. Інші бактеріальні промотори також прийнятні. Їхні послідовності були опубліковані, таким чином дозволяючи будь-кому із досвідом роботи у галузі зшити їх з потрібною послідовністю ДНК, за допомогою лінкерів або адаптерів, які забезпечили б будь-які прийнятні сайти рестрикції.

Прийнятні промотори для використання з дріжджовими клітинами-господарями, також добре відомі в цій галузі. Енхансери дріжджів, переважно використовуються з дріжджовими промоторами. Прийнятні промотори для використання з клітинами-господарями ссавців добре відомі і включають, але не обмежені ними, промотори, що отримані з геномів вірусів, таких як вірус полііоми, вірус віспи птахів, аденовірус (такий як Аденовірус 2), вірус бичачої папіломи, вірус птишиної саркоми, цитомегаловірус, ретровіруси, вірус гепатиту-В і, найкраще, мавп'ячий вірус 40 (SV40). Інші прийнятні промотори ссавців включають гетерологічні промотори ссавців, наприклад, промотори білка теплового шоку і промотор актину.

Додакові промотори, які можуть становити інтерес з точки зору контролю генної експресії, включають, але не обмежені ними: ділянку головного промотора SV40 (Bemoist and Chambon, 1981, Nature 290:304-10); промотор CMV; промотор, що міститься в 3'-кінці довгого термінального повтору вірусу саркоми Ройса (Yamamoto, et al, 1980, Cell 22:787-97); промотор тимідинкінази вірусу герпесу (Wagner et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:1444-45); регуляторної послідовності гена металотіонеїну (Brinster et al, 1982, Nature 296:39-42); експресуючі вектори прокаріотів, такі як β -лактамазний промотор (Villa-Komaroff et al, 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 75:3727-31); або tac-промотор (DeBoer et al, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80:21-25). Також інтерес становлять наступні ділянки тваринного походження, які контролюють транскрипцію, що виявляють тканинну специфічність і використовуються у трансгенних тварин: ділянка, що контролює ген еластази I, який активний в панкреатичних ацинарних клітинах (Swift et al, 1984, Cell 38:639-46; Ornitz et al, 1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol 50:399-409 (1986); MacDonald, 1987, Hepatology 7:425-515); ділянка, що контролює ген інсуліну, який активний в панкреатичних β -клітинах (Hanahan, 1985, Nature 315:115-22); ділянка, що контролює ген імуноглобуліну, який активний в лімфоїдних клітинах

(Grosschedl et al., 1984, Cell 38:647-58; Adames et al, 1985, Nature 318:533-38; Alexander et al, 1987, Mol. Cell. Biol., 7:1436-44); ділянка, що контролює ген вірусу мишачої пухлини молочної залози, який активний в клітинах яєчників, молочної залози, лімфоїдних клітинах і мастоцитах (Leder et al., 1986, Cell 45:485-95); ділянка, що контролює ген альбуміну, який активний в печінці (Pinkert et al., 1987, Genes and Devel. 1:268-76); ділянка, що контролює ген альфа-фетопротейну, який активний в печінці (Krumlauf et al., 1985, Mol. Cell. Biol., 5:1639-48; Hammer et al, 1987, Science 235:53-58); ділянка, що контролює ген альфа 1-антитрипсину, який активний в печінці (Kelsey et al., 1987, Genes and Devel. 1:161-71); ділянка, що контролює ген бета-глобіну, який активний в мієлоїдних клітинах (Mogam et al., 1985, Nature 315:338-40; Kollias et al, 1986, Cell 46:89-94); ділянка, що контролює ген мієлінового основного білка, який активний в олігодендроцитах в мозку (Readhead et al., 1987, Cell 48:703-12); ділянка, що контролює ген легкого ланцюга-2 міозину, який активний в скелетних м'язах (Sani, 1985, Nature 314:283-86); і ділянка, що контролює ген секреції гонадотропного гормону, який активний у гіпоталамусі (Mason et al., 1986, Science 234:1372-78).

Енхансерна послідовність може бути вбудована у вектор, для того щоб збільшити транскрипцію молекули нуклеїнової кислоти винаходу з використанням вищих еукаріотів. Енхансери - це *cis*-активні елементи ДНК, як правило, близько 10-300 пар нуклеотидів завдовжки, які впливають на промотор, збільшуючи рівень транскрипції. Енхансери є відносно незалежними щодо орієнтації та положення. Вони були виявлені в 5' і 3' положеннях щодо одиниці транскрипції. Відомо кілька енхансерних послідовностей з генів ссавців (наприклад, глобіну, еластази, альбуміну, альфа-фетопротейну і інсуліну). Як правило, однак, використовується вірусний енхансер. SV40 енхансер, енхансер головного промотора цитомегаловірусу, енхансер вірусу полііоми, енхансерні послідовності аденовірусу являють собою типові елементи, які посилюють активацію промоторів еукаріотів. Незважаючи на те, що енхансер може бути сплайсований у вектор в положенні 5' або 3' молекули нуклеїнової кислоти винаходу, найчастіше він розташований в положенні 5' від промотора.

Експресуючі вектори винаходу можуть бути сконструйовані з вихідного вектора, такого як комерційно доступний вектор. Такі вектори можуть включати (або не включати) всі бажані фланківні послідовності. У тому випадку, коли одна або більше фланківних послідовностей, описаних тут, відсутні у векторі, їх можна окремо отримати і зшити з вектором. Методи, що використовуються для отримання кожної фланківної послідовності, добре відомі кожному, хто має досвід роботи у цій галузі.

Кращими векторами для втілення цього винаходу є ті вектори, що сумісні з клітинами-господарями бактерій, комах і ссавців. Такі вектори включають, *inter alia*, pCRII, pCR3, і pcDNA3.1 (Invitrogen, San Diego, CA), pBSH (Stratagene, La Jolla, CA), pET15 (Novagen, Madison, WI), pGEX (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ), ПЕГРР-N2

(Clontech, Palo Alto, CA), pETL (BlueBacE, Invitrogen), pDSR-alpha (PCT Pub. No. WO 90/14363) і pFastBacDual (Gibco-BRL, Grand Island, NY).

Додаткові прийнятні вектори включають, але не обмежені ними, косміди, плазмиди або модифіковані віруси, однак кожен досвідчений фахівець у цій галузі має розуміти, що векторна система повинна бути сумісною з обраною клітиною-господарем. Такі вектори включають, але не обмежені ними, плазмиди, такі як похідні плазмід Bluescript® (численні копії основаних на ColEI фамід, Stratagene Cloning Systems, La Jolla CA), ПЛР-клонуючі плазмиди, сконструйовані для клонування Таq-ампліфікованих ПЛР-продуктів (напр., TOPO™ TA Cloning® Kit, PCR2.1® похідні плазмід, Invitrogen, Carlsbad, CA), вектори ссавців, дріжджів або вірусів, такі як система експресії бакуловіруса (похідні плазмиди pBacPAK, Clontech, Palo Alto, CA).

Після того, як вектор сконструйовано і молекула нуклеїнової кислоти винаходу вставлена у відповідний сайт вектора, повний вектор може бути вставлений в прийнятну клітину-господаря для ампліфікації і/або експресії поліпептиду. Трансформація експресуючого вектора винаходу в обраній клітині-господарі може бути виконана за допомогою загальновідомих методів, включаючи такі методи, як трансфекція, інфекція, кальційхлоридний метод, метод електропорації, мікроін'єкцій, ліпофекції, DEAE-декстрановий метод або інші відомі методики. Відібраний метод, частково, буде функцією типу клітини-господаря, яка використовується. Ці методи та інші прийнятні методи є загальновідомими досвідченому фахівцеві, і наведені, наприклад, у Sambrook et al, supra.

Клітини-господарі можуть бути прокаріотичними клітинами-господарями (такими як *E. coli*) або еукаріотичними клітинами-господарями (такими як дріжджові клітини, клітини комах або хребетних тварин). Клітина-господар, при культивуванні за відповідних умов, синтезує антагоніст модифікованого IL-4 мутеїнового рецептора, який може після цього бути ізолюваний з культурального середовища (якщо клітина-господар виділяє його в середовище) або безпосередньо з клітини-господаря, яка його продукує (якщо вона не секритує його в середовище). Відбір прийнятної клітини-господаря залежить від різних чинників, таких як бажані рівні експресії, модифікації поліпептиду, які є бажаними або необхідними для активності (такі як глікозилювання або фосфорилування) і просто пакування в біологічно активну молекулу.

Ціла низка прийнятних клітин-господарів відома з рівня техніки і багато з них є доступними з Американської колекції типових культур (American Type Culture Collection -ATCC), Manassas, VA. Приклади включають, але не обмежені ними, клітини ссавців, такі як клітини яєчника китайського хом'ячка (CHO), CHO DHFR(-) клітини (Urlaub et al, 1980, Proc. NatlAcad. Sci. U.S.A. 97:4216-20), клітинна культура нирки ембріона людини (HEK) 293 або 293T клітини, або 3T3 клітини. Відбір прийнятних клітин-господарів, що належать ссавцям, і методів для трансформації, культивування, ампліфі-

кації, скринінгу, утворення продукту і його очищення є загальновідомими. Іншими прийнятними клітинними лініями ссавців є мавпячі клітинні лінії COS-1 і COS-7, і клітинна лінія CV-1. Наступні типові клітинні лінії ссавців включають клітинні лінії приматів і клітинні лінії гризунів, включаючи трансформовані клітинні лінії. Нормальні диплоїдні клітини, клітинні штами, що походять від культури *in vitro* первинної тканини, а також первинні експланти, також прийнятні. Клітини-кандидати можуть бути генетично дефіцитні за геном, що селектується, або можуть містити домінуючий селективний ген. Інші прийнятні клітинні лінії ссавців включають, але не обмежені цим, клітини мишачої нейробластоми N2A, HeLa, мишачі L-929 клітини, 3T3 лінії, що походять від Swiss, Balb-c або NIH мишачих, BHK або HaK клітинних ліній хом'ячка. Кожна з цих клітинних ліній є відома кожному, хто має досвід щодо експресії білка.

Аналогічно, прийнятними для використання у даному винаході як клітини-господарі, є бактеріальні клітини. Наприклад, різні штами *E. coli* (напр., HB101, DH5D, DH10, і MC1061) є загальновідомі як клітини-господарі в галузі біотехнології. Різні штами *B. subtilis*, *Pseudomonas* spp., інші *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp., тощо також можуть бути використані в цьому методі.

Багато штамів дріжджових клітин відомо тому, хто має досвід роботи в цій галузі, а також доступні як клітини-господарі для експресії поліпептидів даного винаходу. Кращі дріжджові клітини включають, наприклад, *Saccharomyces cerevisiae* і *Pichia pastoris*.

Крім того, у разі потреби, клітинні системи комах можуть бути використані в методах даного винаходу. Такі системи описано, наприклад, у Kitts et al, 1993, Biotechniques, 14:810-17; Lucklow, 1993, Curr. Opin. Biotechnol. 4:564-72; and Lucklow et al, 1993, J. Virol, 67:4566-79. Кращими клітинами комах є Sf-9 і HI5 (Invitrogen).

Полінуклеотиди цього винаходу, присутні в клітинах-господарях, можуть бути виділені у вільному вигляді від інших клітинних компонентів, таких як компоненти мембрани, білки і ліпіди. Полінуклеотиди можуть бути ізолювані за допомогою стандартних методик очистки нуклеїнової кислоти або синтезовані за використанням методики ампліфікації, такої як полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), або за допомогою автоматичного синтезатора. Методики для виділення полінуклеотидів є рутинними і відомими з рівня техніки. Будь-яка з таких методик для отримання полінуклеотиду може бути використана, для того щоб отримати полінуклеотиди, які кодують антагоністи цього винаходу. Наприклад, рестриктази і зонди можуть бути використані для виділення полінуклеотидів, що кодують антагоністи. Переважно, ізолювані полінуклеотиди є препаратами, що вільні або, принаймні, на 70, 80, або 90% вільні від інших молекул.

Кожен, хто має досвід роботи у цій галузі, має усвідомлювати, що молекули нуклеїнової кислоти і поліпептиду, що тут описані, можна отримати за допомогою методу рекомбінатних ДНК чи з використанням інших засобів. Наприклад, молекули кДНК антагоніста модифікованого IL-4 мутеїнового

рецептора винаходу можна отримати за допомогою стандартних молекулярно-біологічних методик, використовуючи мРНК як матрицю. Відповідно, молекули кДНК можуть бути репліковані за допомогою молекулярно-біологічних методик, відомих у цій галузі та описаних у Прикладі 1. Приклад 2 описує конкретні методики рекомбінантної експресії і очищення, які використовуються при отриманні антагоністів модифікованого мутеїну винаходу.

(с) Оцінка терапевтичного значення антагоністів людини

Для того щоб оцінити потенційну ефективність певного антагоніста в терапії алергічної астми, антагоніст може бути протестований *in vitro* в аналізі клітинної проліферації, як детально описано в Прикладах 5 і 6. Крім того, період напіввиведення з плазми антагоніста модифікованого IL-4 мутеїнового рецептора може бути визначений *in vivo* за допомогою фармакокінетичного дослідження на щурах, відповідно до Прикладу 6.

(d) Фармацевтичні композиції

Будь-який з антагоністів модифікованого IL-4 мутеїнового рецептора, описаних вище, можуть бути надані у вигляді фармацевтичної композиції, що містить фармацевтично прийнятний носій. Фармацевтично прийнятний носій, переважно, є непірогенним. Композиції можуть вводитись окремо або в комбінації з, щонайменше, однією іншою речовиною, такою як стабілізуюча сполука, яка може бути введена в будь-якому стерильному, біосумісному фармацевтичному носії, включаючи, але не обмежуючись, сольовий розчин, буферний фізіологічний розчин, декстрозу, і воду. Можуть бути використані різноманітні водні носії, напр., 0.4% фізіологічний розчин, 0.3% гліцин тощо. Ці розчини, як правило, є стерильними та вільними від часточок речовини. Такі розчини можуть бути стерилізовані за допомогою традиційних, загальноновідомих методик стерилізації (напр., фільтрації).

Композиції можуть містити фармацевтично прийнятні допоміжні речовини у разі потреби. Прийнятні допоміжні речовини, переважно, є нетоксичними для реципієнта при тих концентраціях та режимах дозування, що застосовуються. Фармацевтична композиція може містити допоміжні речовини для модифікації, підтримання, або збереження, наприклад, рН, осмолярності, в'язкості, чистоти, забарвлення, ізотонічності, запаху, стерильності, стійкості, швидкості розчинення або вивільнення, адсорбції або проникнення композиції. Прийнятні складові пропису фармацевтичної композиції включають, але не обмежені ними, амінокислоти (такі як гліцин, глютамін, аспарагін, аргінін або лізин), протимікробні засоби, антиоксиданти (такі як аскорбінова кислота, сульфат натрію, або гідросульфат натрію), буфери (такі як борати, бікарбонати, Tris-HCl, цитрати, фосфати або інші органічні кислоти), наповнювачі (такі як маннітол або гліцин), хелатоутворювачі (такі як етилендіамінтетраоцтова кислота (EDTA)), комплексоутворюючі агенти (такі як кофеїн, полівінілпіролідон, бета-циклодекстрин, або гідроксипропіл-бета-циклодекстрин), наповнювачі, моносахариди, дисахариди та інші вуглеводні (такі як глюкоза, ман-

ноза або декстрини), білки (такі як альбумін сироватки, желатина або імуноглобуліни), барвники, ароматизатори або розріджувачі, емульгатори, гідрофільні полімери (такі як полівінілпіролідон), низькомолекулярні поліпептиди, солеутворюючі протилежно заряджені іони (наприклад, натрій), консерванти (такі як бензальконію хлорид, бензойна кислота, саліцилова кислота, тімеразол, фенетилловий спирт, метилпарабен, пропілпарабен, хлоргексидин, сорбінова кислота, або перекис водню), розчинники (такі як гліцерин, пропіленгліколь або поліетиленгліколь), цукрові спирти (такі як маннітол або сорбітол), суспендуючі речовини, сурфактанти або змочуючі речовини (такі як плуроніки; ПЕГ; сорбітану естери; полісорбати, такі як полісорбат 20 або полісорбат 80; Тритон; трометамін; лецитин; холестерин або тилоксапол), стабілізатори (такі як сахароза або сорбітол), агенти, що посилюють тонічність (такі як галіди лужних металів — переважно, хлорид натрію або кальцію - або маннітолу сорбітол), носії, розріджувачі, наповнювачі і/або фармацевтичні ад'юванти. Див. Remington's Pharmaceutical Sciences (18th Ed., A.R. Gennaro, ed, Mack Publishing Company 1990).

Концентрація антагоніста винаходу в такій фармацевтичній композиції може варіювати значною мірою, тобто, від менше ніж, приблизно, 0.5%, як правило, або, щонайменше, приблизно, 1% до 15 або 20% від ваги і підбирається передусім, виходячи з об'ємів рідини, в'язкості, тощо, відповідно до конкретного способу введення лікарського засобу, який обирається. Якщо в цьому є потреба, більше, ніж один тип антагоніста, наприклад, з різними K_d для зв'язування IL-4 рецептора, може бути включений у фармацевтичну композицію.

Такі композиції можуть бути введені пацієнтові окремо або у поєднанні з іншими засобами, ліками або гормонами. Крім активних інгредієнтів, ці фармацевтичні композиції можуть містити прийнятні фармацевтично прийнятний носії, які включають наповнювачі і допоміжні речовини, що сприяють обробці активної сполуки в композиціях, і будуть використовуватись фармацевтично.

Прийнятні матеріали композиції переважно є нетоксичними для реципієнта при дозуванні і концентраціях, які застосовуються.

Фармацевтичні композиції можуть включати складники для модифікації, підтримання або зберігання, наприклад, рН, осмолярності, в'язкості, чистоти, забарвлення, ізотонічності, запаху, стерильності, стійкості, швидкості розчинення або вивільнення, адсорбції, або проникнення композиції. Прийнятні складові пропису фармацевтичної композиції включають, але не обмежені ними, амінокислоти (такі як гліцин, глютамін, аспарагін, аргінін або лізин), протимікробні засоби, антиоксиданти (такі як аскорбінова кислота, сульфат натрію, або гідросульфат натрію), буфери (такі як борати, бікарбонати, Tris-HCl, цитрати, фосфати, або інші органічні кислоти), наповнювачі (такі як маннітол або гліцин), хелатоутворюючі агенти (такі як етилендіамінтетраоцтова кислота (EDTA)), комплексоутворюючі агенти (такі як кофеїн, полівінілпіролідон, бета-циклодекстрин, або гідроксипропіл-бета-циклодекстрин), наповнювачі, моносахариди,

дисахариди, та інші вуглеводні (такі як глюкоза, манноза, або декстрини), білки (такі як альбумін сироватки, желатина, або імуноглобуліни), барвники, ароматизатори або розріджувачі, емульгатори, гідрофільні полімери (такі як полівінілпіролідон), низькомолекулярні поліпептиди, солеутворюючі протилежно заряджені іони (такі як натрій), консерванти (такі як бензальконію хлорид, бензойна кислота, саліцилова кислота, тімеразол, феноліловий спирт, метилпарабен, пропілпарабен, хлоргексидин, сорбінова кислота, або перекис водню), розчинники (такі як гліцерин, пропіленгліколь, або поліетиленгліколь), цукрові спирти (такі як маннітол або сорбітол), суспендуючі речовини, сурфактанти або змочуючі речовини (такі як плуроніки); ПЕГ; сорбітану естери; полісорбати, такі як полісорбат 20 або полісорбат 80; Тритон; треметамін; лецитин; холестерин або тилоксапол), стабілізатори (такі як сахароза або сорбітол), агенти, що посилюють тонічність (такі як галіди лужних металів — переважно, хлорид натрію або кальцію - або маннітолу сорбітол), носії, розріджувачі, наповнювачі і/або фармацевтичні ад'юванти. Див. Remington's Pharmaceutical Sciences (18th Ed., A.R. Gennaro, ed, Mack Publishing Company 1990.

Оптимальна фармацевтична композиція може бути визначена досвідченим фахівцем, залежно від, наприклад, способу введення, формату відпускання лікарського засобу, і потрібного дозування. Див., наприклад, Remington's Фармацевтичні Sciences, *supra*. Такі композиції можуть впливати на фізичний стан, стійкість, швидкість секреції *in vivo*, і швидкість введення *in vivo* молекули нуклеїнової кислот або модулятор щільності скелету за цим винаходом. Основний розчинник або носій у фармацевтичній композиції може бути або водний, або неводний за природою. Наприклад, прийнятним розчинником або носієм для ін'єкції може бути вода, фізіологічний сольовий розчин або штучна цереброспінальна рідина, можливо, доповнена іншими речовинами, загальноприйнятими для приготування композицій для парентерального введення. Нейтральні забуферені сольові розчини або сольові розчини, змішані з альбуміном сироватки, є ще одним прикладом типових носіїв. Інші типові фармацевтичні композиції включають Tris-буфер, із значенням pH біля 7.0-8.5, або ацетатний буфер з pH біля 4.0-5.5, який, крім того, може включати сорбітол або прийнятний замісник. В одному з варіантів здійснення винаходу, фармацевтичні композиції винаходу можуть бути виготовлені для зберігання шляхом змішування обраної композиції, що має бажаний ступінь чистоти, з неов'язковими агентами композиції (Remington's Pharmaceutical Sciences, *supra*) у вигляді ліофілізованого "осаду" або водного розчину. Крім того, композиція може бути складена як ліофілізат з використанням прийнятних наповнювачів, таких як сахароза.

Фармацевтичні композиції можуть бути обрані для парентерального введення. Альтернативно, композиції можуть бути обрані для інгаляцій або для введення через травний тракт, тобто орально. Приготування такої фармацевтично прийнятної

композиції знаходиться в межах досвіду в цій галузі.

Складові композиції присутні в концентраціях, які є прийнятні для місця застосування. Наприклад, буфери застосовуються, для того щоб підтримати композицію при фізіологічних значеннях pH або дещо нижчому pH, як правило, в межах значень pH від приблизно, 5 до, приблизно, 8.

Якщо передбачено парентеральне введення, терапевтичні композиції для використання у винаході можуть бути у вигляді апірогенного, парентерально прийнятного, водного розчину, який містить бажану молекулу винаходу у фармацевтично прийнятному носії. Особливо прийнятним носієм для парентеральної ін'єкції є стерильна дистильована вода, в якій молекула утворює стерильний ізотонічний розчин, належним чином законсервований. Ще інший склад може включати композицію бажаної молекули з агентом, таким як ін'єкційні мікрокульки, часточки, здатні до біодеградації, полімерні складові (такі як полімери молочної або гліколевої кислот), гранули або ліпосоми, що забезпечує контрольовану або тривалу секрецію продукту, який може потім надходити через ін'єкцію речовин уповільненого всмоктування. Використовується також гіалуронова кислота, яка може забезпечувати пролонговану тривалість циркуляції. Інші прийнятні засоби для введення потрібної молекули включають пристрої-імпланти для доставки ліків.

В одному з варіантів здійснення винаходу, фармацевтична композиція може бути розроблена для інгаляції. Наприклад, молекула нуклеїнової кислоти або модулятор щільності скелету за винаходом можуть бути розроблені у вигляді сухого порошку для інгаляції. Інгаляційні розчини можуть також бути розроблені з диспергатором для доставки за допомогою аерозолу. В ще одному варіанті винаходу, розчини можуть бути розпилені. Легеневе застосування описано в PCT Pub. No. WO 33 94/20069, яка описує введення хімічно модифікованих білків через дихальні шляхи.

В ще одному варіанті винаходу певні композиції можуть бути введені орально. В одному з варіантів винаходу, молекули нуклеїнової кислоти або модулятори щільності скелету за цим винаходом, які вводять у такий спосіб, можуть бути розроблені з носіями або без носіїв, і зазвичай вводяться у поєднанні з твердими фармацевтичними формами, такими як таблетки або капсули. Наприклад, капсула може бути призначена для секреції активної частини композиції в місці кишково-шлункового тракту, коли біодоступність є максимальною і передсистемна деградація є мінімальною. Додаткові агенти можуть бути включені, для того щоб забезпечити адсорбцію молекули або модулятора за винаходом. Розріджувачі, ароматизатори, воски з низькою точкою плавлення, рослинні олії, мастильні речовини, суспендуючі засоби, антиадгезивні засоби, і зв'язуючі речовини також можуть бути використані.

Інша фармацевтична композиція може містити ефективну кількість молекули нуклеїнової кислоти або модулятора щільності скелету за винаходом у суміші з нетоксичними наповнювачами, які є при-

йнятними для виготовлення таблеток. Розчиняючи таблетки у стерильній воді, або іншому прийнятному розчиннику, розчини можуть бути приготовлені у вигляді уніфікованої (стандартної) дози. Прийнятні наповнювачі включають, але не обмежені ними, інертні розріджувачі, такі як карбонат кальцію, карбонат або бікарбонат натрію, лактозу або кальцію фосфат; або зв'язуючі засоби, такі як крохмаль, желатин або аравійську камедь (акацію); або мастильні речовини, такі як стеарат магнію, стеаринову кислоту або тальк.

Додаткові фармацевтичні композиції будуть очевидними для фахівців з досвідом роботи у цій галузі, включаючи розробку композицій, що містять молекули нуклеїнової кислоти або модулятора щільності скелету за винаходом в композиціях, що забезпечують контрольовану і пролонговану доставку. Методики виготовлення цілої низки засобів, що забезпечують пролонговану або контрольовану доставку, таких як ліпосоми, здатні до біодеградації мікрочасточки або пористі гранули чи депо-ін'єкції, також відомі досвідченим фахівцям у цій галузі. Див., наприклад, PCT/US93/00829, яка описує контрольовану секрецію пористих полімерних мікрочасточок для доставки фармацевтичної композиції.

Додаткові приклади композицій, які забезпечують пролонговану секрецію, включають напівпроникні полімерні матриці у вигляді сформованих виробів, наприклад, плівки або мікрокапсули. Матриці, які забезпечують пролонговану секрецію, включають поліестери, гідрогелі, полімери молочної кислоти [Патент США No. 3,773,919 і Європейський Патент No. 058481], кополімери L-глутамінової кислоти і гама-етил-L-глутамату (Sidman et al, 1983, Biopolymers 22:547-56), полі(2-гідроксиетил-метакрилат) (Langer et al, 1981, J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277 and Langer, 1982, Chem. Tech. 12:98-105), етиленвінілацетат (Langer et al, supra) або полі-O(-)-3-гідроксимасляну кислоту (Європейський Патент No. 133988). Композиції, що забезпечують пролонговану секрецію, можуть також включати ліпосоми, які можна виготовити за допомогою будь-якого з кількох загальновідомих методів. Див., наприклад, Eppstein et al, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688-92; і Європейські патенти NOS. 036676, 088046, and 143949.

Фармацевтичні композиції, призначені для введення in vivo, як правило, мають бути стерильними. Цього можна досягти шляхом фільтрації через стерильні фільтраційні мембрани. Якщо композиція ліофілізується, стерилізація з використанням цього методу може бути проведена до або після ліофілізації і відновлення вмісту вологості. Композиція для парентерального застосування може зберігатись у ліофілізованому вигляді або у розчині. Крім того, парентеральні композиції, як правило, поміщують у контейнер, що має стерильний порт доступу, наприклад, балон або флакон з внутрішньовенним розчином, устаткований пробкою, яку можна проткнути голкою для підшкірних ін'єкцій.

Фармацевтичні композиції за цим винаходом можуть бути введені за допомогою цілої низки різних способів, як тут описано, включаючи, але не

обмежуючись цим, оральний, внутрішньовенний, внутрішньом'язовий, внутрішньоартеріальний, інтрамедулярний, інтратекальний, інтравентрикулярний, трансдермальний, підшкірний, внутрішньоочеревинний, інтраназальний, парентеральний, топічний, сублінгвальний або ректальний способи.

Після приготування фармацевтичної композиції можуть бути поміщені у прийнятний контейнер і етикетовані для лікування визначеного стану. Така етикетка має включати відомості про кількість, частоту і спосіб застосування. (d) Терапевтичні способи

Даний винахід надає способи полегшення симптомів розладу шляхом зв'язування альфа ланцюга IL-4 рецептора та інгібування активності, опосередкованої IL-4 і IL-13 рецепторами. Ці розлади включають, без обмеження, гіперчутливість дихальних шляхів і запалення дихальних шляхів, включаючи рекрутмент та активацію мастоцитів, еозинофілів і лімфоцитів, пов'язані з астмою та іншими імунологічними і алергічними розладами.

В одному з варіантів здійснення винаходу, терапевтично ефективна доза антагоніста модифікованого IL-4 мутеїнового рецептора винаходу і/або фармацевтичної композиції винаходу вводиться пацієнту, що має розлад, який характеризується зростанням активності IL-4 і IL-13, як ті розлади, що вказані вище.

(e) Визначення терапевтично ефективної дози

Визначення терапевтично ефективної дози цілком здатний виконати будь-хто з досвідом роботи в цій галузі. Терапевтично ефективна доза стосується кількості антагоніста, яка застосовується для ефективного лікування астми, у порівнянні з ефективністю, що має місце при відсутності терапевтично ефективної дози.

Терапевтично ефективна доза спочатку може бути визначена на тваринних моделях, як правило, щурах, мишах, кроликах, собаках, свинях або приматах, що не є людиною. Тваринні моделі можуть також бути використані для того, щоб визначити прийнятну амплітуду концентрацій і спосіб застосування лікарського засобу. Після цього така інформація може бути використана для визначення корисних доз та способу застосування лікарського засобу щодо людини.

Терапевтична ефективність і токсичність, наприклад, ED₅₀ (доза, терапевтично ефективна для 50% групи пацієнтів) і LD₅₀ (доза, летальна для 50% групи пацієнтів) людського антагоніста, можуть бути визначені за допомогою загальноприйнятих фармацевтичних методик в клітинних культурах або на експериментальних тваринах. Співвідношення токсичної і терапевтичної дії є терапевтичним індексом, і може бути виражене як співвідношення, LD₅₀/ED₅₀.

Кращими є фармацевтичні композиції, які виявляють високі терапевтичні індекси. Дані, отримані в дослідженнях на тваринах, використовуються при опрацюванні системи дозування для застосування щодо людини. Доза, що міститься в такій композиції, переважно знаходиться в межах циркулюючих концентрацій, що включають ED₅₀ з незначною токсичністю або без будь-якої токсичності. Режим дозування варіює в межах, що зале-

жать від форми лікарського засобу, який застосовується, чутливості пацієнта і способу застосування лікарського засобу.

Точне дозування буде визначено лікарем-практиком, з урахуванням чинників, що пов'язані з пацієнтом, який потребує лікування. Дозування та спосіб застосування лікарського засобу узгоджуються, для того щоб забезпечити достатні рівні антагоніста або для того, щоб підтримувати бажаний ефект. Чинники, що можуть бути взяті до уваги, включають ступінь тяжкості захворювання, загальний стан здоров'я суб'єкта, вік, вагу, стать суб'єкта, спосіб харчування, час та частоту введення лікарського засобу, поєднання ліків, реакції чутливості, і толерантності/сприйнятливості до лікарського засобу. Фармацевтичні композиції тривалої дії можуть бути введені через кожних 3-4 дні, щотижня, або один раз на два тижні, залежно від часу напіввиведення або швидкості виведення конкретної композиції.

Полінуклеотиди, що кодують антагоністи модифікованого IL-4 мутеїнового рецептора за цим винаходом, можуть бути сконструйовані і вмонтовані в клітину або *ex vivo*, або *in vivo* з використанням загальноприйнятих методик, включаючи, але не обмежені ними, перенесення ДНК за допомогою полікатіону трансферину, трансфекцію за допомогою "голих" або інкапсульованих нуклеїнових кислот, ліпосомну клітинну гібридизацію, внутрішньоклітинний транспорт латексних гранул, покритих ДНК, злиття протопластів, вірусну інфекцію, електропорацію, "генний дробовик" і DEAE- або трансфекцію за допомогою фосфату кальцію.

Дози антагоніста, ефективні *in vivo*, знаходяться в межах від, приблизно, 5 мкг до, приблизно, 50 мкг/кг, від, приблизно, 50 мкг до, приблизно, 5 мг/кг, від, приблизно, 100 мкг до, приблизно, 500 мкг/кг ваги тіла пацієнта, і приблизно, від 200 до, приблизно, 250 мкг/кг ваги тіла пацієнта. Для введення полінуклеотидів, що кодують антагоністи, ефективними *in vivo* є дози, які знаходяться в межах від, приблизно, 100 нг до, приблизно, 200 нг, від 500 нг до, приблизно, 50 мг, від, приблизно, 1 мкг до, приблизно, 2 мг, від, приблизно, 5 мкг до, приблизно, 500 мкг, і від, приблизно, 20 мкг до, приблизно, 100 мкг ДНК.

Способом введення фармацевтичної композиції цього винаходу, яка містить антагоніст модифікованого IL-4 мутеїнового рецептора, може бути будь-який прийнятний спосіб введення лікарського засобу, що забезпечить надходження антагоніста до господаря. Фармацевтичні композиції цього

винаходу особливо призначені для парентерального введення, тобто, підшкірно, внутрішньом'язово, внутрішньовенно, інтратрахеально або інтраназально, а також інших способів введення через дихальні шляхи.

Всі патенти і заявки на патент, процитовані у цьому розкритті, включені тут у повному обсязі у вигляді посилань. Наведене вище розкриття в загальних рисах описує даний винахід. Повніше розуміння можна отримати, звернувшись до специфічних прикладів, які наведено з метою лише проілюструвати, а не обмежити сферу застосування винаходу.

Приклади

Приклад 1

Рекомбінантне отримання IL-4-RA і IL-4-RE цистеїнових мутеїнів

pET Спрямовану експресуючу систему TOPO® (Invitrogen) було обрано для рекомбінантної експресії IL-4. Система використовує вискоєфективну одноступінчасту стратегію "TOPO® Клонування" для спрямованого клонування продукту полімеразної ланцюгової реакції з тупим кінцем і T7 Іас промотора для вискорівневої і IPTG-індукованої експресії гена, що становить інтерес, у *E.coli*. Додаткові особливості полягають в тому, що включено ген ІасI, для того щоб зменшити основну транскрипцію, рBR322 сайт ініціації реплікації для реплікації і підтримання плазміди, і селективний ген резистентності до ампіциліну.

IL-4 був клонований в pET10I/D-TOPO вектор для продукування рекомбінантного IL-4 білка. Олігонуклеотидні праймери представлені в Таблиці 4. Для того щоб забезпечити спрямоване клонування, ПЛР-праймер (вперед) був створений з 5'САСС виступаючим кінцем, з наступним унікальним NdeI сайтом рестрикції для субклонування і початковим ATG старт-кодоном. Зворотний ПЛР-праймер, який включав два стоп-кодони, відповідав за те, щоб жоден С-термінальний кінець не був включений, і унікальний BstHI-сайт рестрикції для субклонування. ПЛР-продукт IL-4 з тупим кінцем був отриманий за допомогою попереднього клонованого IL-4 як матриці. Продукт очищали в гелі і інкубували у сольовому розчині і з TOPO® вектором протягом 5 хвилин при кімнатній температурі для спрямованого клонування у pET10I/D-TOPO векторі. Рекомбінантний вектор було трансформовано в хімічно компетентний One Shot TOP10 *E.coli*. Рекомбінантна плазмідна ДНК була передана для секвенування ДНК, для того щоб підтвердити правильну послідовність.

Таблиця 4

Олігонуклеотидні праймери для генерування IL-4 RE цистеїнових мутеїнів.

SEQ ID No.	Олігонуклеотиди для IL4 RE	Послідовність
17	T28C Fwd	GAAGACTCTGTGCACCGAGTTGTGCGTAACA GACATCTTTGC
18	T28C Rev	GCAAAGATGTCTGTACGCACAACCTCGGTGC ACAGAGTCTTC
19	S36C Fwd	GTAACAGACATCTTTGCTGCCTGCAAGAACA CAACTGAG
20	S36C Rev	CTCAGTTGTGTTCTTGCAGGCAGCAAAGATGT CTGTTAC
21	K37C Fwd	CCGTAACAGACATCTTTGCTGCCTCCTGCAAC ACAACCTGAGAAGG
22	K37C Rev	CCTTCTCAGTTGTGTTGCAGGAGGCAGCAAA GATGCTGTTACGG
23	N38C Fwd	GACATCTTTGCTGCCTCCAAGTGCACTGA GAAGGAAACC
24	N38C Rev	GGTTTCCTTCTCAGTTGTGCACTTGAGGCAG CAAAGATGTC
25	A104C Fwd	GAATTCCTGCTGTGAAGGAATGCAACCAG AGTACGTTGG
26	A104C Rev	CCAACGTACTCTGGTTGCATTCTTCACAGGA CAGGAATTC
27	N105C Fwd	CCTGTGAAGGAAGCCTGCCAGAGTACGTTGG AAAACCTTC
28	N105C Rev	GAAGTTTTCCAACGTACTCTGGCAGGCTTCCT TCACAGG
29	Q106C Fwd	CCTGTCTGTGAAGGAAGCCAACCTGCAGTAC GTTGGAATACTTC
30	Q106C Rev	GAAGTTTTCCAACGTACTGCAGTTGGCTTCCT TCACAGGACAGG

IL-4/pET101/D-TOPO слугувала як матриця для отримання IL-4 RE цистеїнового мутеїну з використанням набору реактивів QuikChange® для сайт-специфічного мутагенезу від Stratagene. Кожен цистеїновий мутеїн був отриманий за допомогою двох олігонуклеотидних праймерів, кожний комплементарний до протилежного ланцюга вектора, і містить кодон TGC або GCA, що включає потрібну цистеїнову мутацію. Таблиця 4 наводить перелік праймерів, що застосовуються для отримання IL-4 RE мутеїнів. Плазміда, що зазнала мутації, і несе ступінчасті розриви, була отримана за допомогою параметрів циклізації і умов, що визначені в протоколі виробника. Продукт був оброблений DpnI ендонуклеазою протягом 1 години при 37°C, для того щоб відбулось розщеплення метильованої немутованої "материнської" матриці ДНК. ДНК, оброблена DpnI-ендонуклеазою, була трансформована в XL-IBLue надкомпетентні клітини, в яких були репаровані односторонні розриви в мутуванні плазміді. ДНК мутагенної плазміді була проаналізована відповідно до стандартних методик секвенування, для того щоб підтвердити правильність послідовності.

Приклад 2

Рекомбінантна експресія і очищення BL21 Star (DE3) One Shot клітини (Invitrogen), трансформовані за допомогою білка, що містить

плазміді, були обрані для оптимальної експресії і культивувались при 37°C, доки значення OD₆₀₀ становило, приблизно, 0.4 і обробляли 1мМ IPTG (Invitrogen) протягом 3 годин при 37°C. Один літр клітинної суспензії центрифугували при 13000 об./хв. протягом 10 хвилин, зважували і зберігали при -80°C. Заморожений клітинний осад було ресуспендовано в 8 мл буферу для розриву клітин (0.1 М фосфатний буфер pH7.3, 0.1% Triton X100, 1 мМ EDTA) на грам клітин і оброблений ультразвуком 4-кратно протягом 1 хвилини з інтервалами між ними, що становили 1 хвилину. Клітинний лізат видаляли за допомогою центрифугування при 35000д протягом 10 хвилин. Після цього клітинні осад промивали 2-3 рази в 30 мл буферу для розриву клітин, обробляли протягом 1 хвилини ультразвуком, після чого центрифугували. Остаточний клітинний осад, тількия включення, зберігали при -20°C. Тількия включення ресуспендували в 5 мл буферу для солюбілізації (0.2M Tris pH9, 7M гуанідину гідрохлорид) на грам клітин. Додавали реагенти для сульфотолізу (0.16 грамів сульфату натрію, 0.08 грамів тетратіонату калію на 1 грам клітин) і тількия включення перемішували при кімнатній температурі протягом 2 годин. Нерозчинні компоненти були після цього видалені за допомогою центрифугування при 35000д протягом 20 хвилин для розчинення тілець включення. Тількия

включення після цього пропустили через Superdex200 ексклюзійну колонку (Akta) для виділення білка. Через колонку пропустили 2 об'єми колонки (КО) 6М гуанідину гідрохлориду /PBS pH7 при швидкості потоку 1 мл/хв, і білок був елюований у 1.5 КО. Пікові фракції (1.5 мл кожна) були зібрані і розділені за допомогою 12% або 4-20% Bis-Tris-SDS гель-електрофорезу. Білкові фракції об'єднали і додали кінцеву концентрацію 7.5ММ DTT, для того щоб відновити молекули білка. Через 2 год. культивування при кімнатній температурі, суміш розбавили п'ятикратно водою і піддали діалізу в 4.5 л 3ММ NaH_2PO_4 , 7ММ Na_2HPO_4 , 2ММ KCl, 120ММ NaCl. Діаліз тривав протягом 3-4 днів, при цьому свіжий буфер замінювали, щонайменше, тричі. Діалізований матеріал після цього був профільований через 0.2 мкм фільтр, і рН було доведено до 5 за допомогою оцтової кислоти. Колонку промили 10 КО Буферу 1 (25 мМ ацетат амонію pH5), після чого з 20-хвилинним градієнтом 100% Буфером В (25 мМ ацетат амонію pH5/1М NaCl) після інжекції. Пікові фракції (0.5 мл кожна) зібрані і розділили за допомогою 12% або 4-20% Bis-Tris-SDS гель-електрофорезу. Фракції, які містили продукт, зібрані і розбавили вдвічі Буфером А (0.1% TFA/вода). Після цього білок хроматографували на C4 HPLC зі зворотною фазою (Beckman system Gold), за допомогою 5 мл петлі і швидкості потоку 1 мл/хв. за наступною програмою: 10% Буфер А для тривалості інжекції, 10-хвилинний градієнт до 40% Буферу В (0.1% TFA/ACN), 30-хвилинний градієнт до 50% Буферу В, і 5-хвилинний градієнт до 100% Буферу В. Пікові фракції (0.5 мл кожна) зібрані і розділили за допомогою 12% або 4-20% Bis-Tris-SDS гель-електрофорезу. Білкові фракції висушили і ресуспендували в 0.1 М MES pH6.1 для дослідження і кількісного аналізу.

Приклад 3

Сайт-специфічне ПЕГілювання цистеїну і очищення

Було розроблено протокол для ПЕГілювання IL4 RA мутеїнів, що містять цистеїни, шляхом стійкого тіотетерного зшивання між сульфгідрильною групою білка та імідом малеїнової кислоти похідного лінійного 22кД метокси-поліетиленгліколю іміду малеїнової кислоти (Nektar Therapeutics). 2-кратний молярний надлишок мПЕГ-МАЛ 22кД реактиву додавали до 600м білка, розчиненого в реакційному буфері, 0.1 М MES, pH6. Через 0.5 години при кімнатній температурі, реакцію було завершено за допомогою 2-кратного надлишку цистеїну над мПЕГ-МАЛ 22кД (фігура 1). ПЕГілюваний білок був очищений від мПЕГ-МАЛ 22кД, що не прореагував (погашений цистеїн), і IL4 RA цистеїнового мутеїну, що не прореагував, за допомогою іонообмінної ексклюзійної хроматографії. Неочищену реакційну суміш пропустили через іонообмінні колонки Vivapure Mini S (Vivascience), які промивали 0.4мл 0.1 М MES, pH6. Колонки промивали двічі за допомогою 0.4мл 0.1 М MES, pH6, після кожного промивання центрифугували при 2,000 x g. Зразки елюювали центрифугуванням з колонок за допомогою 0.4мл 0.6М NaCl/0.1М MES, pH6. 0.4мл елюатів були завантажені в TSK-

GEL G2000SWXL HPLC вимірювальну колонку (Tosoh Biosep) за допомогою системи Beckman HPLC system Gold. Зразки перерозчинили в рухливій фазі фосфатного буферного фізіологічного розчину (Дюльбекко PBS) при швидкості потоку 1 мл/хв. протягом 30 хв. Пікові фракції (0.5 мл) збирали і аналізували за допомогою 4-12% Bis-Tris-SDS гель-електрофорезу для виділення ПЕГілюваного білка.

Фракції, які містили продукт, об'єднували і концентрували за допомогою пристрою Ultrafree Biomax-5 (Millipore), відповідно до протоколу виробника, до, приблизно, 60 мкМ (або ~ 1 мг/мл) для аналізу та дослідження in vitro. Кінцеві концентрації ПЕГілюваних білків були визначені за допомогою амінокислотного аналізу. Остаточний вихід вказано в Таблиці 5.

Таблиця 5

Очищення виходу ПЕГілюваних IL4RA цистеїнових мутеїнів

Мутеїн	ПЕГілюваний (мг, початковий)	ПЕГілюваний (мг, кінцевий)	% регенерації
IL4RA	ND	ND	ND
T28C	0.267	0.064	24.0
S36C	0.392	0.057	14.5
K37C	0.264	0.011	4.2
N38C	0.387	0.083	21.4
A104C	0.213	0.010	4.7
N105C	0.289	0.044	15.2
Q106C	0.125	0.023	18.4
Середнє	0.176	0.042	14.6

Приклад 4

Кількісний аналіз Biacore зв'язування IL-4 рецептора

IL-4 рецептор був іммобілізований на чіп-датчику для дослідної оцінки Biacore CM5 шляхом зв'язування з аміногрупою. Поверхня датчика була активована за допомогою EDC/NHS пульсації. IL-4 розчинили у 10мМ ацетатному буфері (pH 5.0) і ввели в струмінь клітин 2 з наступною пульсацією 1.0М етаноламін-HCL для дезактивації поверхні. Рівень іммобілізації рецептора становив ~300 RU. Струмінь клітин 1 також був активований без ліганда як "сліпий" контроль. Biacore Wizard було використано для здійснення кінетичних досліджень. Кандидати IL4RE антагоністів було розчинено в HBS-EP (проточний буфер) і введено при швидкості потоку 30 мкл/хвилину протягом 3 хвилин і тривалості дисоціації, що становила 15 хвилин. Регенерацію чіпів-датчиків було здійснено за допомогою двох 30-секундних впорскувань 10 мМ Гліцину pH2.5 (швидкість потоку 100мкл/хв.) до початкового значення перед наступним впорскуванням серії концентрацій. Значення константи дисоціації (K_d) були обчислені для кожного кандидата, виходячи з кінетики прямого зв'язування (Таблиця 5). Як свідчать результати, конструкції IL4-RE-A104C IL4-RE-N105C і IL4-RE-Q106C пока-

зують константи дисоціації, значення яких нижче 0.6нМ.

Приклад 5

Аналіз проліферації TF-1 клітин

Реакція проліферації TF-1 клітин до IL-4 (0.5 нг/мл, 0.033 нМ) або IL-13 (5 нг/мл, 0.416 нМ), була використана для того щоб оцінити функціональну антагоністичну активність IL-4RE молекул. В цьому аналізі, TF-1 клітини культивували протягом 2-4 днів у 96-коміркових планшетах (1x10⁴/комірка, 100 мкл об'єм) в RPMI + 10% сироватка в присутності або без IL-4 або IL-13 і IL-4RE молекул. Обробка GM-CSF була використана як позитивний контроль. За 24 години до остаточного прочитування планшета до кожної комірки додавали 10 мкл AlamarBlue (10% об.). Інтенсивність флуоресценції визначали при 530/590 нм за допомогою лічильника WALLAC Victor 2. Концентрація інгібування 50% (IC₅₀) була вирахована, виходячи з дозового титрування кандидатів IL-4RE молекул. Резюме результатів біотестів TF-1 щодо інгібування IL-4 і IL-13 наведено в Таблиці 6. Ці результати свідчать, що конструкції IL4-RE-K37C, IL4-RE-N38C і IL4-RE-A104C виявляють порівнянні значення IC₅₀ із значеннями, які виявляє IL-4-RA у присутності IL-4 або IL-13.

Таблиця 6

BIAcore аналіз

зв'язування ПЕГ-IL4RE і оцінка біологічної активності ПЕГільзованих мутеїнів у порівнянні з IL4RA в дослідженні проліферації TF-1 клітин.

Мутеїн	BIAcore афінність, нМ	TF-I/IL-4 IC ₅₀ , нМ	TF-I/IL-13 IC ₅₀ , нМ
BAY 1 6-9996 IL-4RA	0.11	0.56+0.86 (n=17)	1.17+1.77 (n=6)
IL4-RE-T28C	0.89	2.35+0.75 (n=2)	2.87+0 (n=1)
IL4-RE-S36C	1.15	1.20+0.02	1.21+0 (n=1)
IL4-RE-K37C	0.74	0.82+0.01 (n=2)	1.22+0.58 (n=2)
IL4-RE-N38C	0.77	0.70+0.18 (n=2)	1.24+0.58 (n=2)
IL4-RE-A104C	0.56	0.55+0.10	1.34+1.21 (n=2)
IL4-RE-N105C	0.59	2.26+0.20 (n=2)	2.11+0 (n=1)
IL4-RE-Q106C	0.52	2.44+0.68 (n=2)	1.95+0 (n=1)

Приклад 6

Аналіз проліферації первинних клітин

Реакції проліферації первинних клітин людини (Т- і В-клітин) щодо IL-4 також оцінена після попередньої обробки IL-4RE молекули. Мононуклеари периферичної крові (МПК) були виділені з периферичної крові, певну їх кількість обробляли РНА протягом 4 днів, для того щоб індукувати утворення бластних Т-клітин (попередників Т-клітин). МПК були також оброблені анти-СО40, для того щоб активізувати активність В клітин, і використані не-

гайно. Клітини були висіяні в 96-коміркові планшети (10⁵ клітин на 1 комірку). Препарати РНА Т-бластних клітин і В клітин стимулювали протягом 3 днів використанням IL-4 (10 нг/мл, 0.667 нМ) в присутності різних концентрацій IL-4RE молекул. Як показник проліферації було використано включення тритованого тимідину протягом останніх 20 годин інкубування. Результати дослідження представлено в Таблиці 7. Результати свідчать, що всі ПЕГльовані конструкції виявили IC₅₀, значення якого менше, ніж в 5 разів перевищувало відповідне значення IL-4RA для обох тестів первинних клітин.

Таблиця 7

Оцінка біологічної активності ПЕГ-IL_4RE в дослідженні проліферації бластних В-клітин іТ-клітин

Мутеїн	В-клітина IC ₅₀ , нМ	Бластна Т-клітина IC ₅₀ , нМ
BAY 16-9996 IL-4RA	0.86+0.42 (n=10)	3.22+3.26 (n=16)
IL4-RE-K37C	3.73+2.15 (n=2)	13.86+12.77 (n=2)
IL4-RE-N38C	3.33+2.68 (n=2)	9.94+8.99 (n=2)
IL4-RE-A104C	3.29+1.46 (n=2)	4.67+4.65 (n=2)

Приклад 7

Фармакокінетичні дослідження на щурах

Були використані дорослі самці щурів лінії Sprague-Dawley, що важать від 250 до 300 грамів. Щурів було канюльовано через яремну вену за допомогою катетера для відбору зразків крові. Крім того, щурів з групи, що отримувала дозування внутрішньовенно (IV), було канюльовано за допомогою катетера для введення ліків через стегнову вену.

Щурам вводили або IL-4RA, або антагоніст модифікованого IL-4 мутеїнового рецептора при дозуванні 1 і 0.5 мг/кг, відповідно. Було застосовано як IV, так і ПШ (підшкірний) спосіб введення ліків. IV дозу ліків було введено за допомогою ін'єкції безпосередньо через постійний катетер у стегнову вену. Доза, призначена для підшкірного введення, була введена за допомогою ін'єкції в задню грудну ділянку. Для кожної дози в групі було використано по три щури.

Після однієї ін'єкції ударної дози (IV або ПШ), відбирали зразки крові у кількості і в терміни, які були завчасно визначені, до 168 годин після введення дози. Центрифугування зразків розпочали не пізніше, ніж через 1 годину після відбору. Плазму збирали і помістили на сухий лід для зберігання при, приблизно, -70° С

Концентрації в плазмі IL-4RA і модифікованого мутеїну визначали кількісно за допомогою твердофазного імуноферментного аналізу. Анти-IL-4антитіло було використано як реактиви для абсорбції і виявлення дослідного антитіла. Нижня межа кількісного визначення для цього аналізу становила 0.2 нг/мл. Фармакокінетичні параметри були отримані за допомогою некомпартментального

аналізу з використанням WinNonlin (Pharsight, Mountain view, CA). Особливий інтерес становить оцінка кінетики абсорбції і елімінування, об'єми розподілу, а також кількості, що була абсорбована.

Посилання

1. Ying, S., M. Humbert, J. Barkans, C.J. Corrigan, R. Pfister, G. Menz, M. Larche, D.S. Robinson, S.R. Durham and A.B. Kay. 1997. Expression of IL-4 and IL-5 mRNA and protein product by CD4+ and CD8+ T cells, eosinophils, and mast cells in bronchial biopsies obtained from atopic and nonatopic (intrinsic) asthmatics. *J. Immunol.* 158: 3539-3544.

2. Huang, S.K., H.Q. Xiao, J. Kleine-Tebbe, G. Paciotti, D.G. Marsh, L.M. Lichtenstein and M.C. Liu. 1995. IL-13 expression at the sites of allergen

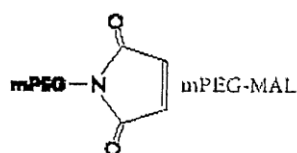
challenge in patients with asthma. *J. Immunol.* 155:2688-2694.

3. Zhu, Z., R.J. Homer, Z. Wang, Q. Chen, G.P. Geba, J. Wang, Y. Zhang and J.A. Elias. 1999. Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. *J. Clin. Invest.* 103: 779-788.

4. Henderson, W.R.J., E.Y. Chi and C.R. Maliszewski. 2000. Soluble IL-4 receptor inhibits airway inflammation following allergen challenge in a mouse model of asthma. *J. Immunol.* 164:1086-1095

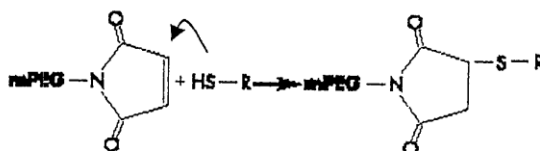
5. Sambrook (1989) *CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY*, John Wiley & Sons, New York, N.Y., 1995.

Хімія реакції ПЕГілювання



mPEG-MAL 22 kD

лінійний ПЕГ



Хімічна реакція ПЕГілювання

Фиг. 1