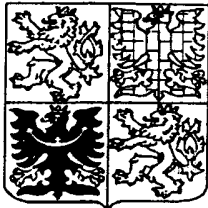


ČESKÁ
REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(21) 233-96

(13) A3

6(51)

C 12 N 15/24

C 12 N 5/10

C 07 K 14/54

A 61 K 38/20

(22) 22.07.94

(32) 26.07.93

(31) 93/098943

(33) US

(40) 15.05.96

(71) SCHERING CORPORATION, Kenilworth, NJ, US;

(72) Chou Chuan-Chu, Westfield, NJ, US;
Cai Xia-Yan, Union, NJ, US;

(54) **Antagonisté a agonisté lidského interleukinu-10**

(57) Tento vynález poskytuje prostředky a způsoby inhibování biologické aktivity lidského IL-10 a zejména poskytuje antagonisty lidského IL-10, které zahrnují maturní lidský IL-10 modifikovaný náhradou lysinového zbytku v poloze 157 zbytkem kyselé aminokyseliny (např. kyseliny glutamové) nebo delecí jednoho nebo více aminokyselinových zbytků v oblasti obsahující asi 12 karboxyterminálních zbytků. Protože leishmaniasa a jiné choroby jsou charakterizovány defektní odezvou CD4⁺ T pomocných (Th) buněk, konkrétně souboru Th1, kterou lze připsat nepatřičnému působení endogenního IL-10, nastává potřeba antagonistů IL-10 pro léčbu takovýchto chorob. Dále bylo překvapivě nalezeno, že může být deletováno až 11 aminokyselinových zbytků z N-konce maturního lidského IL-10 a že tyto zkrácené varianty, agonisté lidského IL-10, mohou mít ve srovnání s IL-10 samotným odlišné farmakokinetické vlastnosti. Protože mají biologickou aktivitu maturního lidského IL-10, mohou být užitečné v léčbě indikací vnímavých k léčbě IL-10 samotným a pro některé další účely, jako je afinitní čištění. Karboxyterminální modifikace pro antagonisty lidského IL-10 byly vytvářené PCR s použitím oligonukleotidovým primerů komplementárních k sekvenci cDNA lidského IL-10 s navrženými mutacemi předem zavedenými do primerů 3'-konce, a výsledné fragmenty byly použity k náhradě příslušné oblasti IL-10 DNA divokého typu ve vektoru pSV. Sport. K vytvoření N-koncových variant, agonistů lidského IL-10, byly potřebné modifikované DNA fragmenty syntetizovány pomocí PCR, s použitím párů primerů bez DNA templátu. Tento vynález také poskytuje způsob výroby antagonisty nebo agonisty lidského IL-10, přičemž tento způsob zahrnuje kultivaci hostitelských buněk transfekovaných vhodným rekombinantním vektorem, obsahujícím kodující nukleovou kyselinu.

Antagonisté a agonisté lidského interleukinu-10

PRÁV. VLASTNICTVÍ	PRŮMYSLOVÉHO VÝSTAVIŠTĚ	URČAD	25. 1. 96	005933	č.j.
				005933	

Oblast techniky

Tento vynález se týká antagonistů a agonistů lidského interleukinu-10, a prostředků a způsobů jejich přípravy a použití. Tito agonisté a antagonisté se tvoří zavedením aminokyselinových substitucí nebo delecí v karboxy- nebo aminokonci maturního lidského interleukinu-10.

Dosavadní stav techniky

Interleukin 10 (IL-10) je cytokin schopný zprostředkovávat řadu působení nebo účinků. IL-10 byl izolován jak z myších, tak lidských buněk, a je zapojen do řízení imunitní odezvy různých tříd nebo souborů CD4⁺ T pomocných (Th) buněk. Tyto Th buňky mohou být rozděleny na různé soubory, jež se liší svými profily tvorby cytokinů. Dva z těchto souborů se nazývají Th1 a Th2 buňky.

Klony T buněk Th1 tvoří interleukin-2 (IL-2) a gama interferon (IFN- γ), zatímco klony T buněk Th2 secernují IL-10, interleukin-4 (IL-4) a interleukin-5 (IL-5), obecně po aktivaci antigeny a mitotickými lektiny. Obě třídy Th buněčných klonů produkují cytokiny jako je faktor nekrózy nádorů- α (TNF- α), interleukin-3 (IL-3) a faktor stimulace kolonií granulocytů-makrofágů (GM-CSF). Třetí kategorie Th buněk (Th0) tvoří současně IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-5, TNF- α , IL-3 a GM-CSF.

Rozdílné typy produkce cytokinů Th1 a Th2 buňkami zčásti odrážejí jejich role v odezvě na různé patogeny. Th1 buňky jsou například zapojeny v úspěšných buněčných odezvách k řadě intracelulárních patogenů. Jsou zapojeny také v hypersenzitivitních reakcích opožděného typu. Th2 buňky jsou spojeny s humorálními odezvami, jež jsou charakterizované tvorbou protilátek. U většiny situací vyvine imunitní systém Th odezvu,

jež je k eliminaci konkrétního antigenu nebo patogenu neúčinnější, ale není tomu tak pokaždé.

Například: Leishmaniasa je charakterizována defektní odezvou Th1. Tento defekt může být demonstrován s použitím *in vitro* testů, jako je test popsáný Clericim *et al.* [*J. Clin. Invest.* 84: 1983 (1989)]. S použitím jednoho takového *in vitro* testu bylo ukázáno, že defekt Th 1 odezvy lze připsat endogenním hladinám IL-10, protože funkci Th1 lze napravit přidáním neutralizujících protilátek proti IL-10.

Protože leishmaniasa a jiné choroby jsou charakterizovány defektní odezvou Th1, kterou lze připsat nepatřičnému působení endogenního IL-10, nastává potřeba agonistů a antagonistů IL-10 pro léčbu takovýchto chorob.

Podstata vynálezu

Tento vynález naplňuje tuto potřebu tím, že poskytuje prostředky a způsoby pro poskytnutí nebo inhibování biologické aktivity lidského IL-10.

Konkrétněji tento vynález poskytuje antagonisty lidského IL-10, které zahrnují maturní lidský IL-10 modifikovaný náhradou lysinového zbytku v poloze 157 zbytkem kyselé aminokyseliny nebo delecí jednoho nebo více aminokyselinových zbytků v oblasti obsahující asi 12 karboxyterminálních zbytků.

Aminokyselinové sekvence tří takovýchto provedení jsou definovány následujícími sekvencemi I, II a III:

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

Leu Ser Glu Met Ile Gln Phe Tyr Leu Glu Glu Val Met Pro Gln Ala
65 70 75 80
Glu Asn Gln Asp Pro Asp Ile Lys Ala His Val Asn Ser Leu Gly Glu
85 90 95
Asn Leu Lys Thr Leu Arg Leu Arg Leu Arg Arg Cys His Arg Phe Leu
100 105 110
Pro Cys Glu Asn Lys Ser Lys Ala Val Glu Gln Val Lys Asn Ala Phe
115 120 125
Asn Lys Leu Gln Glu Lys Gly Ile Tyr Lys Ala Met Ser Glu Phe Asp
130 135 140
Ile Phe Ile Asn Tyr Ile Glu Ala Tyr Met Thr Met Glu Ile Arg Asn
145 150 155 160 (I)

Ser Pro Gly Gln Gly Thr Gln Ser Glu Asn Ser Cys Thr His Phe Pro
1 5 10 15
Gly Asn Leu Pro Asn Met Leu Arg Asp Leu Arg Asp Ala Phe Ser Arg
20 25 30
Val Lys Thr Phe Phe Gln Met Lys Asp Gln Leu Asp Asn Leu Leu Leu
35 40 45
Lys Glu Ser Leu Leu Glu Asp Phe Lys Gly Tyr Leu Gly Cys Gln Ala
50 55 60
Leu Ser Glu Met Ile Gln Phe Tyr Leu Glu Glu Val Met Pro Gln Ala
65 70 75 80
Glu Asn Gln Asp Pro Asp Ile Lys Ala His Val Asn Ser Leu Gly Glu
85 90 95
Asn Leu Lys Thr Leu Arg Leu Arg Leu Arg Arg Cys His Arg Phe Leu
100 105 110
Pro Cys Glu Asn Lys Ser Lys Ala Val Glu Gln Val Lys Asn Ala Phe
115 120 125
Asn Lys Leu Gln Glu Lys Gly Ile Tyr Lys Ala Met Ser Glu Phe Asp
130 135 140
Ile Phe Ile Asn Tyr Ile Glu Ala Tyr Met Thr Met Lys
145 150 155 (II)

Ser	Pro	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln	Ser	Glu	Asn	Ser	Cys	Thr	His	Phe	Pro
1			5					10						15	
Gly	Asn	Leu	Pro	Asn	Met	Leu	Arg	Asp	Leu	Arg	Asp	Ala	Phe	Ser	Arg
		20						25					30		
Val	Lys	Thr	Phe	Phe	Gln	Met	Lys	Asp	Gln	Leu	Asp	Asn	Leu	Leu	Leu
	35						40					45			
Lys	Glu	Ser	Leu	Leu	Glu	Asp	Phe	Lys	Gly	Tyr	Leu	Gly	Cys	Gln	Ala
	50					55					60				
Leu	Ser	Glu	Met	Ile	Gln	Phe	Tyr	Leu	Glu	Glu	Val	Met	Pro	Gln	Ala
65					70						75				80
Glu	Asn	Gln	Asp	Pro	Asp	Ile	Lys	Ala	His	Val	Asn	Ser	Leu	Gly	Glu
				85					90					95	
Asn	Leu	Lys	Thr	Leu	Arg	Leu	Arg	Leu	Arg	Arg	Cys	His	Arg	Phe	Leu
			100						105					110	
Pro	Cys	Glu	Asn	Lys	Ser	Lys	Ala	Val	Glu	Gln	Val	Lys	Asn	Ala	Phe
		115					120						125		
Asn	Lys	Leu	Gln	Glu	Lys	Gly	Ile	Tyr	Lys	Ala	Met	Ser	Glu	Phe	Asp
	130					135						140			
Ile	Phe	Ile	Asn	Tyr	Ile	Glu	Ala	Tyr	Met	Thr	Met				
145					150					155				(III)	

Tento vynález dále poskytuje nukleovou kyselinu kódující antagonistu lidského IL-10, zahrnujícího maturní lidský IL-10 modifikovaný náhradou lysinového zbytku v poloze 157 zbytkem kyselé aminokyseliny nebo delecí jednoho nebo více aminokyselinových zbytků v oblasti obsahující asi 12 karboxyterminálních zbytků. Rekombinantní vektory obsahující takovouto nukleovou kyselinu a hostitelské buňky obsahující takovýto rekombinantní vektor jsou tímto vynálezem také poskytnuty.

Tento vynález ještě dále poskytuje způsob výroby antagonisty lidského IL-10, zahrnujícího maturní lidský IL-10 modifikovaný náhradou lysinového zbytku v poloze 157 zbytkem kyselé aminokyseliny nebo delecí jednoho nebo více aminokyselinových zbytků v oblasti obsahující asi 12 karboxyterminálních zbytků, přičemž tento způsob zahrnuje kultivaci jedněch shora zmíněných

hostitelských buněk za podmínek, kdy je nukleová kyselina kódující tohoto antagonistu exprimována.

Tento vynález ještě dále poskytuje způsob pro inhibici biologické aktivity IL-10, jenž zahrnuje uvedení buněk nesoucích receptory pro IL-10 do kontaktu s účinným množstvím antagonisty lidského IL-10, zahrnujícího maturní lidský IL-10 modifikovaný náhradou lysinového zbytku v poloze 157 zbytkem kyselé aminokyseliny nebo delecí jednoho nebo více aminokyselinových zbytků v oblasti obsahující asi 12 karboxyterminálních zbytků.

Tento vynález ještě dále poskytuje agonistu lidského IL-10, který zahrnuje maturní lidský IL-10 modifikovaný delecí od jednoho do jedenácti aminoterminálních aminokyselinových zbytků.

Nukleové kyseliny kódující takovéto agonisty, rekombinantní vektory a transformované hostitelské buňky obsahující takovéto nukleové kyseliny, způsoby pro přípravu antagonistů a farmaceutické prostředky obsahující jeden nebo více IL-10 agonistů nebo antagonistů a farmaceuticky přijatelné nosiče jsou tímto vynálezem také poskytnuty.

Podrobný popis vynálezu

Všechny odkazy zde citované jsou sem v jejich úplnosti začleněny odkazem.

Antagonisté podle tohoto vynálezu jsou užiteční k léčbě chorob jako je leishmaniasa, jež jsou charakterizovány defektní odezvou Th1, kterou lze připsat endogennímu IL-10. Mohou být užitečné také k léčbě chorob spojených s imunosupresí zprostředkovanou IL-10 nebo s nadprodukcí IL-10, jako jsou B-buňkové lymfomy. Navíc jsou antagonisté užiteční pro studie osvětlující mechanismus působení IL-10 a pro racionální návrhy léků, protože vykazují silnou vazbu k receptoru, která je oddělena od efektorové funkce. Po imobilizaci na pevné podložce mohou být antagonisté použiti na afinitní čištění rozpustných forem IL-10 receptoru, v nichž je deletována transmembránová oblast.

Virová IL-10 bílkovina (BCRFI, nebo vIL-10) Epsteinova Barova viru (EBV) má též biologickou aktivitu IL-10 a předpokládá se váže k IL-10 receptorům. Exprese vIL-10 aktivity EBV předpokládá dávat viru určité výhody k přežití, ve smyslu jeho schopnosti infekce, replikace a udržování se v hostitelském organismu. Schopnost vIL-10 negativně regulovat tvorbu IFN- γ jak T buňkami, tak NK buňkami, spolu s jeho posilujícím účinkem na životaschopnost B-buněk, napovídá, že vIL-10 může potlačovat protivirovou imunitu a současně podporovat potenciál EBV transformovat lidské B buňky.

Antagonisté IL-10 podle tohoto vynálezu mohou proto být užiteční k účinné podpoře protivirové imunity proti EBV, a možná dalším virům. Více o potenciálním použití IL-10 antagonistů viz např. v Howard *et al. J. Clin. Immunol.* 12: 239 (1992).

Tři reprezentativní provedení antagonistů, mutantních IL-10, podle tohoto vynálezu jsou uvedeny v Příkladech níže. V jednom provedení je lysinový zbytek v poloze 157 sekvence maturního lidského IL-10 nahrazen zbytkem kyseliny glutamové (sekvence I). V jiných provedeních jsou z karboxylového konce lidského IL-10 deletovány tři (sekvence II) nebo čtyři (sekvence III) aminokyselinové zbytky. Na tyto antagonisty se níže odkazuje jako na antagonisty K157E, C Δ 3 resp. C Δ 4.

Jak se zde používá, výraz "maturní lidský IL-10" je definován jako bílkovina bez zaváděcí sekvence, která (a) má aminokyselinovou sekvenci v podstatě shodnou se sekvencí IV, definovanou zde níže

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

veškerých indikací vnímavých k léčbě IL-10 samotným. Jsou také užitečné pro některé účele popsané shora pro antagonisty podle vynálezu, jako je afinitní čištění.

Protože mají biologickou aktivitu lidského IL-10, ale mají zkrácenou aminokyselinovou sekvenci, odkazuje se zde na tyto varianty také jako na "agonisty lidského IL-10".

Má se ale za to, že cysteinový zbytek v poloze 12 je esenciální pro biologickou aktivitu. Skutečně: Deleci prvních 12 zbytků, včetně tohoto cysteinového zbytku, vznikla varianta, jež neměla žádnou biologickou aktivitu. Proto jsou delece v aminokonci omezeny na deleci jednoho nebo více z prvních 11 zbytků.

Tyto aminoterminální delece mohou být kombinovány se shora zmíněnými karboxyterminálními modifikacemi pro vytvoření antagonistů majících charakteristiky popsané níže, ale možná jiné farmakokinetické vlastnosti. Tito antagonisté jsou také součástí tohoto vynálezu.

Nukleové kyseliny kódující agonisty a antagonisty IL-10 jsou také součástí tohoto vynálezu. Ti, co jsou zbehlí v oboru, jsou si samozřejmě dobře vědomi, že v důsledku degenerace genetického kódu existuje mnoho různých nukleových kyselin, jež mohou kódovat každého z agonistů a antagonistů. Konkrétní použité kodony mohou být vybrány na základě pohodlné konstrukce a optimální exprese v prokaryotických a eukaryotických systémech.

S výhodou se nukleové kyseliny kódující agonisty a antagonisty připravují s použitím polymerasové řetězové reakce (PCR) [Saiki *et al.*, *Science* 239: 487 (1988)], jak se podává v příkladu Daughertyho *et al.* [*Nucleic Acid Res.* 19: 2471 (1991)], k modifikaci cDNA kódující lidský IL-10. Takováto cDNA je dobře známá v oboru a lze ji připravovat s použitím standardních metod, jak jsou popsány např. v publikaci mezinárodní patentové přihlášky číslo WO 91/00349. Klony obsahující sekvence kódující lidský IL-10 jsou také deponovány v American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, Maryland, pod přístupovými čísly 68191 a 68192.

Alternativně může být DNA modifikována s použitím dobře známých technik řízené mutagenese. Viz např. Gillman *et al.*,

Gene 8: 81 (1979); Roberts *et al.*, *Nature* 328: 731 (1987) nebo Innis (ed.), 1990, *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, New York, NY.

Nukleové kyseliny podle tohoto vynálezu mohou být také syntetizovány chemicky s použitím např. fosfoamiditové metody na pevné fázi podle Matteucciho *et al.* [*J. Am. Chem. Soc.* 103: 3185 (1981)], metody Yoo *et al.* [*J. Biol. Chem.* 764: 17078 (1989)] nebo jiných dobře známých metod.

Rekombinantní vektory obsahující předešlé nukleové kyseliny jsou také součástí tohoto vynálezu, jakož i hostitelské buňky transformované takovými vektory, a metody pro přípravu agonistů a antagonistů.

Inzerce DNA kódující jednoho z agonistů a antagonistů do jednoho z mnoha známých vektorů exprese se snadno provede, když konce jak této DNA, tak vektoru, obsahují kompatibilní restriční místa. Pokud toto nelze provést, může být zapotřebí modifikovat konce těchto DNA a/nebo vektoru zpětnou digescí přečnávajících úseků jednovláknové DNA, vytvořených štěpením restriční endonukleasou, k vytvoření tupého konce, nebo k dosažení téhož výsledku, zaplněním jednovláknových konců patričnou DNA polymerasou.

Alternativně, jakékoli žádoucí místo může být vytvořeno ligací nukleotidových sekvencí (spojek) k těmto koncům. Takovéto spojky mohou obsahovat specifické oligonukleotidové sekvence, jež definují žádoucí restriční místo. Štěpený vektor a fragmenty DNA mohou být, je-li to zapotřebí, také modifikovány homopolymerním prodloužením nebo PCR.

Antagonisté podle tohoto vynálezu jsou charakterizováni vazebnými afinitami k lidskému IL-10 receptoru, jež jsou podobné jako u lidského IL-10 samotného, ale jsou v podstatě zbaveni biologické aktivity. S výhodou budou mít méně než 10 % biologické aktivity lidského IL-10 ve standardním testu, výhodněji méně než 1 %.

Antagonisté typicky produkují přinejmenším asi 25 % inhibice biologické aktivity IL-10 v buňkách nesoucích IL-10 receptory. S výhodou bude stupeň inhibice přinejmenším asi 50 %, a výhodněji

přinejmenším 75 %. Skutečný stupeň inhibice se může lišit podle konkrétní měřené biologické aktivity.

Agonisté a antagonisté mohou být také chemicky syntetizováni vhodnou metodou, jako je syntéza výhradně na pevné fázi, metodami částečně na pevné fázi, kondenzací fragmentů nebo klasickou syntézou v roztoku. Chemicky syntetizované polypeptidy jsou s výhodou připravovány peptidovou syntézou na pevné fázi, jak je popsána např. Merrifieldem [*J. Am. Chem. Soc.* 85: 2149 (1963); *Science* 232: 341 (1986)] a Athertonem *et al.*, (*Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*, 1989, IRL Press, Oxford).

Ať se připraví jakkoli, agonisty a antagonisty lze čistit např. s použitím HPLC, gelové filtrace, iontoměničové a partiční chromatografie, protiproudého rozdělování nebo jiných dobře známých způsobů.

Farmaceutické prostředky mohou být připraveny smícháním jednoho nebo více agonistů nebo antagonistů IL-10, nebo jejich farmaceuticky přijatelných solí, a farmaceuticky přijatelného nosiče.

Užitečnými farmaceutickými nosiči mohou být jakékoli kompatibilní netoxické látky vhodné pro dodávání prostředků podle vynálezu pacientovi. V nosiči mohou být obsaženy voda, alkohol, tuky, vosky a inertní pevné látky. Do farmaceutického prostředku mohou být také začleněna farmaceuticky přijatelná adjuvans (pufrační činidlo, dispergační činidlo). Obecně jsou prostředky užitečné pro parentrální podávání takovýchto léků dobře známy; např. *Remington's Pharmaceutical Science*, 18. vydání (Mack Publishing Company, Easton, PA, 1990). Balení v jednotlivých dávkách je často výhodné, např. ve sterilní formě.

Podávání agonistů a antagonistů je s výhodou parenterální, pomocí intraperitoneálních, intravenózních, subkutánních nebo intramuskulárních injekcí nebo infuzí, nebo pomocí jakéhokoli jiného přijatelného systémového způsobu. Alternativně může být antagonistu podáván implantovatelným nebo injikovatelným systémem dodávání léku [viz např. Urquhart *et al.*, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 24: 199 (1984); Lewis, ed., *Controlled Release of Pesticides and Pharmaceuticals*, 1981, Plenum Press, New York,

New York; U.S. patenty číslo 3 773 991 a 3 270 960]. Lze provádět i orální podávání, s podávání dobře známých přípravků, které chrání antagonistu před gastrointestinálními proteasami. Viz též Langer, *Science* 249: 1527 (1990).

Agonisté a antagonisté mohou být podávání také standardními technikami genové terapie, včetně např. přímé injekce nukleové kyseliny do tkání, použití rekombinantních virových vektorů nebo liposomů a implantace transfekovaných buněk. Viz např. Rosenberg, *J. Clin. Oncol.* 10: 180 (1992).

Agonisté a antagonisté mohou být podávání samotní nebo v kombinaci s jedním nebo více jinými činidly běžně používanými k léčbě stavů charakterizovaných defektní Th odezvou. Například léky jako interleukin-12 (IL-12) nebo gama interferon (IFN- γ) mohou být podávány spolu s antagonistou. Insulin, cyklosporin, prednison nebo azathioprin mohou být podávány spolu s agonistou, např. když se používají náhradou za IL-10 k léčbě nebo prevenci na insulinu závislého diabetes mellitus (viz současně podanou U.S. přihlášku, číslo 07/955 523 z 1. října 1992).

Takovéto společné podávání jednoho nebo více činidel může být souběžné (spolu s) nebo posloupné (před nebo po) vzhledem k podání agonisty nebo antagonisty. Všechna podávaná činidla musí být v pacientovi přítomna v dostatečných hladinách, aby byla farmaceuticky účinná. Typicky: Pokud se druhé činidlo podá během asi polohy prvního činidla, považuje se podání těchto dvou činidel za společné.

Stanovení patřičného dávkování agonisty nebo antagonisty pro konkrétní situaci spadá pod znalosti v oboru. Obecně se léčba začíná menšími dávkami než je optimum. Potom se dávkování zvyšuje s malými inkrementy dokud se nedosáhne optimální účinek za daných podmínek. Když je to žádoucí, může být vhodné rozdělit celkovou denní dávku a podávat ji po částech.

Účinné množství bude dávka, která vede k prokazatelnému zlepšení jednoho nebo více klinických parametrů nebo ke statisticky významnému zlepšení odezvy v jedné nebo více známých Th funkcí; některé z nich, jako tvorba IL-2, jsou popsány výše. Tato odezva může být měřena *in vitro* s použitím krevních buněk odebraných pacientovi, např. jak je popsáno v Clerici *et al.*,

jako výše. Takovýto *in vitro* test lze provést před začátkem léčby k poskytnutí referenční základní hodnoty, se kterou se může zlepšená odezva porovnávat.

Skutečné množství a četnost podávání agonistů a antagonistů a jejich farmaceuticky přijatelných solí konkrétnímu pacientovi bude regulováno podle posouzení ošetřujícího lékaře, s přihlédnutím k takovým faktorům, jako jsou věk, stav a velikost pacienta a stupeň symptomu(ů), který se léčí.

Příklady provedení vynálezu

Tento vynález může být vysvětlen následujícími příklady. Pokud není specifikováno jinak, procenta udaná níže pro pevné látky v pevných látkách, kapaliny v kapalinách resp. pevné látky v kapalinách jsou založena na poměrech hmotnost/hmotnost, objem/objem resp. hmotnost/objem.

Reagencie a obecné metody

Restrikční endonukleasy byly získány od Boehringer Mannheim (Indianapolis, IN), zatímco souprava pro ligaci DNA byla pořízena od Takara Biochem., Inc. (Berkley, CA). Taq polymerasa a Pfu polymerasa byly získány ze Stratagene (La Jolla, CA). Rekombinantní lidský IL-10 (hIL-10) byl připravován standardním způsobem v buňkách vaječníků čínské křečka (CHO), v podstatě jak je popsáno v Tsujimoto *et al.* [*J. Biochem.* 106: 23 (1989)]. Médium pro tkáňové kultury, fetální bovinní sérum a glutamin byly pořízeny od Gibco-BRL (Gaithesburg, MD). Oligonukleotidové primery byly syntetizovány standardními metodami s použitím DNA syntetizátoru Applied Biosystems 380A, 380B nebo 394 (Foster City, CA).

Standardní metody rekombinantní DNA se prováděly v podstatě jak je popisuje Sambrook *et al.* v *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. vydání, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York.

Transfekce

Transientní exprese se prováděla jak následuje. Buňky COS (ATCC CRL 1651) byly udržovány v Dulbeccově modifikovaném Eaglově médiu (DMEM) doplněném 10 % fetálního bovinního séra, 6 mM glutaminem a penicilinem/streptomycinem. Transfekce se provedla elektroporací s použitím Bio-Rad GENE PULSER^R (Richmond, CA).

Buňky byly uvolněny z kultivačních misek působením trypsinu-EDTA a suspendovány v čerstvém kultivačním médiu. Asi 5×10^6 buněk v objemu 250 μ l bylo smícháno s 5 μ g plasmidové DNA a pak elektroporováno s napětím a kapacitou nastavenými na 0,2 voltu resp. 960 mFD.

Po elektroporaci byly buňky přeneseny do 10 cm kultivačních misek a kultivovány v 5 % CO₂ při 37°C po 6 hodin v 10 ml sérum obsahujícího DMEM. Když se buňky přichytily k miskám, médium bylo odstraněno odsátím a nahrazeno bezsérovým médiem. Po 72 hodinách bylo kondicionované médium sebráno k analýze.

Příprava antagonistů

Rekonstrukce cDNA lidského IL-10 divokého typu, a vektorů exprese

K umožnění exprese a manipulace, byla kódující oblast hIL-10 cDNA generována PCR s použitím hIL-10 vektoru založeného na pCDSR α [Viera *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 1172 (1991); sekvence deponovaná GenBank pod přístupovým číslem M57627] jako templátu, i když by bylo možné použít jiných známých zdrojů této cDNA.

Kozakové konsentní obratlovčí iniciátor translace [Kozak, *Nucleic Acid Res.* 20: 8125 (1987)] byl zaveden do 5' primeru

nazvaného B1789CC (sekvence V):

GTCGACTGCA GCCGCCACCA TGCACAGCTC AGCACTGCTC TGTTGCCTGG TCCTCCTGAC 60

(V).

*Pst*I místo resp. *Eco*RI místo byly přidány k 5' primeru B1789CC resp. 3' primeru nazvanému A1715CC (sekvence VI):

ACGTCGAATT CTCAGTTTCG TATCTTCATT GTCATGTAGG C 41

(VI).

S použitím shora zmíněných primerů byla hIL-10 cDNA podrobena PCR v reakční směsi objemu 50 μ l, s převrstvením 50 μ l parafínového oleje, v 0,5 ml Eppendorfové zkumavce. Reakční směs typicky obsahovala 26,5 μ l H₂O, 5 μ l DNA polymerasového pufru [finální koncentrace v reakci: 10 mM Tris-HCl, pH 8,8, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,001 % želatina], 200 μ M dNTP, 60 ng templátové DNA, po 10 pmol 5' primeru B1789CC a 3' primeru nazvanému A1715CC, a 0,5 μ l Taq polymerasy (2 jednotky).

Reakce se prováděla v termocykleru PHC-1 (Techne, Princeton, NJ) s 30 cykly 95°C, 2 minuty k denaturaci; 42°C, 2 minuty k tvorbě duplexu [*annealing*]; a 70°C, 1 minuta k syntéze. Na konci třicátého cyklu byla reakční směs inkubována dalších 9 minut při 72°C k prodloužení.

PCR směs byla podrobena elektroforéze v 1,2 % agarosovém Tris-acetátovém gelu obsahujícím 0,5 μ g/ml ethidiumbromidu. DNA fragmenty mající očekávané velikosti byly vyříznuty z gelu a purifikovány s použitím soupravy GENE CLEAN^R (La Jolla, CA). Po získání z gelu byl DNA produkt digеровán *Pst*I a *Eco*RI, izolován pomocí zpracování gelovou elektroforézou a GENE CLEAN^R, a klonován jako *Pst*I/*Eco*RI restriční fragment do vektoru exprese pDSRG (ATCC 68233) a následně přenesen do vektoru exprese pSC.Sport (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD).

Vektory obsahující hIL-10 cDNA byly namnoženy v *E. coli* kmene DH5 α (Gibco-BRL) a sekvence DNA byla ověřena sekvenováním DNA. Vektor exprese hIL-10 založený na pSC.Sport byl použit k transfekci COS buněk, jakož i ke konstrukci vektorů s mutantním hIL-10.

Resyntetizovaná hIL-10 cDNA si podržela unikátní *Bgl*III místo a unikátní *Bst*EII místo, jež jsou obě přítomna v cDNA divokého typu. Tato dvě vnitřní restriční místa, jejichž relativní pozice jsou ukázány schematicky níže, byla potom použita ke generování mutantních hIL-10 cDNA pomocí náhrady kazet.

*Pst*I ----- *Bgl*III ----- *Bst*EII ----- *Eco*RI

Karboxyterminální modifikace

K vytvoření C-koncového mutantního antagonisty hIL-10 byly pomocí PCR syntetizovány mutantní cDNA fragmenty odpovídající *Bst*EII/*Eco*RI oblasti hIL-10 cDNA divokého typu, a použity k náhradě odpovídající oblasti v pSV.Sport hIL-10 DNA popsané shora.

Mutantní K157E, C Δ 3 a C Δ 4 antagonisté lidského IL-10 byly připraveni PCR s použitím oligonukleotidových primerů komplementárních k sekvenci resyntetizované hIL-10 cDNA popsané shora, s navrženými mutacemi předem zavedenými do primerů 3'-konce.

K vytvoření tří mutantních antagonistů byl použit 5' primer nazvaný B3351CC, mající aminokyselinovou sekvenci definovanou sekvencí VII:

GGACTTTAAG GGTTACCTGG GTTGCCAAGC CTTGTCTGAG ATGATCCAGT TTTATCTAGA 60
GGAGGTGATG CCCCAAGCTG AGAAC 85

(VII).

Sekvence tohoto 5' primeru byla komplementární k interní sekvenci lidské IL-10 cDNA, zahrnující unikátní *Bst*EII restriční místo hIL-10 cDNA divokého typu. 3' primery použité k vytvoření antagonistů měly sekvence komplementární k 3'-koncové sekvenci cDNA kódující hIL-10. Tyto primery, následované číslem sekvence definujícím jejich sekvenci, byly jak následuje

<u>Mutant:</u>	<u>Primer:</u>	<u>Číslo sekvence</u>
K157E	C3481CC	VIII
C Δ 3	C3482CC	IX
C Δ 4	B3350CC	X

AGCTGAATTC AGTTTCGTAT CTCATTGTC ATGTAGGCTT CTATGTAGT 49

(VIII)

AGCTGAATTC ACTTCATTGT CATGTAGGCT TCTATGTAGT 40

(IX)

AGCTGAATTC ACATTGTCAT GTAGGCTTCT ATGTAGT 37

(X).

S použitím shora zmíněných primerů byla cDNA lidského IL-10 podrobena PCR v reakční směsi objemu 50 μ l, s převrstvením 50 μ l parafínového oleje, v 0,5 ml Eppendorfové zkumavce. Reakční směs typicky obsahovala 26,5 μ l H₂O, 5 μ l pfu DNA polymerasového pufru [finální koncentrace v reakci: 20 mM Tris-HCl, pH 8,2, 10 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 6 mM (NH₄)₂SO₄, 0,1 % Triton X-100 a 10 μ g/ml bovinního sérového albuminu (BSA) prostého nukleasy], 200 μ M dNTP, 40 ng templátové DNA, po 10 pmol 5' primeru B3351CC a jednoho z 3' primerů, a 0,5 μ l pfu polymerasy (2,5 jednotky).

Reakce se prováděla v termocykleru PHC-1 (Techne, Princeton, NJ) s 22 cykly: 94°C, 2 minuty k denaturaci; 50°C, 2 minuty k tvorbě duplexu; a 72°C, 1 minuta k syntéze. Na konci 22. cyklu byla reakční směs inkubována dalších 7,5 minuty při 72°C k prodloužení.

PCR směs byla zpracována extrakcí fenolem-CHCl₃, sražením ethanolem a pak postupně digerována *BstEII* a *EcoRI*. Produkty restriční digesce byly podrobeny elektroforéze v 1 % agarosovém/Tris-acetátovém gelu obsahujícím 0,5 μ g/ml ethidiumbromidu. DNA fragmenty mající očekávané velikosti byly vyříznuty z gelu a získány extrakcí fenolem-CHCl₃ a sražením ethanolem.

Po získání z gelu byly *BstEII/EcoRI* fragmenty hIL-10 mutantů použity k náhradě odpovídající oblasti hIL-10 DNA divokého typu v pSV.Sport vektoru. hIL-10 mutantní cDNA ve vektoru založeném na

pSV.Sport byly namnoženy v *E. coli* kmene DH5 α a ověřeny sekvenováním DNA. Tytéž vektory exprese byly použity k transfekci COS buněk, jak je popsána shora.

Aminoterminální modifikace

K vytvoření N-koncových variant lidského IL-10 byly pomocí PCR syntetizovány modifikované cDNA fragmenty odpovídající *Pst*I/*Bgl*III oblasti hIL-10 cDNA divokého typu, s použitím párů primerů bez DNA templátu. Výsledné fragmenty byly použity k náhradě odpovídající oblasti hIL-10 DNA divokého typu ve vektoru pSV.Sport. Takto byly vytvořeny varianty, v nichž bylo z N-konce hIL-10 divokého typu deletováno 7 (variant N Δ 7), 10 (variant N Δ 10), 11 (variant N Δ 11) a 12 (variant N Δ 12) aminokyselin. Páry primerů použité k vytvoření každého variantu, následované čísly sekvencí definujících jejich sekvence, byly jak následuje

<u>Mutant:</u>	<u>Primer (konec):</u>	<u>Číslo sekvence</u>
N Δ 7	C3352CC (5')	XI
	C3355CC (3')	XII
N Δ 10	C3353CC (5')	XIII
	C3354CC (3')	XIV
N Δ 11	C3483CC (5')	XV
	C3485CC (3')	XVI
N Δ 12	C3484CC (5')	XVII
	C3486CC (3')	XVIII

GACGACGGTG GCTGCAGCCG CCACCATGCA CAGCTCAGCA CTGCTCTGTT GCCTGGTCCT 60
CCTGACTGGG GTGAGGGCCT CTGAGAACAG C 91
(XI)

GGCATCTCGG AGATCTCGAA GCATGTTAGG CAGGTTGCCT GGAAGTGGG TGCAGCTGTT 60
CTCAGAGGCC CTCACCCAG TCAGGAGGAC 90
(XII)

~~GACGACGGTG GCTGCAGCCG CCACCATGCA CAGCTCAGCA CTGCTCTGTT GCCTGGTCCT 60~~

CCTGACTGGG GTGAGGGCCA GC 82

(XIII)

GGCATCTCGG AGATCTCGAA GCATGTTAGG CAGGTTGCCT GGAAGTGGG TGCAGCTGGC 60

CCTCACCCCA GTCAGGAGGA C 81

(XIV)

GACGACGGTG GCTGCAGCCG CCACCATGCA CAGCTCAGCA CTGCTCTGTT GCCTGGTCCT 60

CCTGACTGGG GTGAGGGCCT GC 82

(XV)

GGCATCTCGG AGATCTCGAA GCATGTTAGG CAGGTTGCCT GGAAGTGGG TGCAGGCCCT 60

CACCCAGTC AGGAGGAC 78

(XVI)

GACGACGGTG GCTGCAGCCG CCACCATGCA CAGCTCAGCA CTGCTCTGTT GCCTGGTCCT 60

CCTGACTGGG GTGAGGGCCA C 81

(XVII)

GGCATCTCGG AGATCTCGAA GCATGTTAGG CAGGTTGCCT GGAAGTGGG TGGCCCTCAC 60

CCCAGTCAGG AGGAC 75

(XVIII).

PCR se prováděla s použitím 10 pmol každého primeru z ukázaných primerových párů, jak je popsáno výše pro syntézu C-terminálních mutantních antagonistů. PCR směs byla zpracována extrakcí fenolem- CHCl_3 , sražením ethanolem a pak postupně digerována *Bgl*III a *Pst*I. Produkty restriční digesce byly podrobeny elektroforéze v agarosovém gelu jak je popsáno výše a DNA fragmenty mající očekávané velikosti byly vyříznuty z gelu a získány extrakcí fenolem- CHCl_3 a sražením ethanolem.

Po získání z gelu byly *Pst*I/*Bgl*III restriční fragmenty hIL-10 variantů použity k náhradě odpovídající oblasti hIL-10 DNA divokého typu v pSV.Sport vektoru, po vyštěpení této oblasti *Pst*I/*Bgl*III digescí a ligaci nahrazujícího fragmentu. hIL-10 mutantní cDNA ve vektoru založeném na pSV.Sport byly namnoženy, ověřeny a použity jak je popsáno shora.

L-methioninu a provedlo 30 minutové vyhánění značky. Značené kondicionované médium bylo sebráno a podrobeno elektroforéze na polyakrylamidovém gelu s dodecylsulfátem sodným [SDS PAGE; Laemmli, *Nature* 227: 680 (1970)] v 10 - 20 % gelech za neredukujících podmínek, a gely byly vysušeny a autoradiografovány s použitím standardních metod a filmu Kodak XAR.

Autoradiografie ukázala distinktní značené pruhy pro lidský IL-10; antagonisty K157E, C Δ 3 a C Δ 4; a pro agonisty N Δ 7 a N Δ 10, kteří všichni migrovaly se zdánlivými molekulovými hmotnostmi asi 16 až 18 kilodaltonů. Za identických podmínek transfekce a kultivování buněk byly všichni tři antagonisté, karboxyterminální mutanty lidského IL-10, exprimováni v poněkud snížené úrovni - asi 2 - 4 krát méně než IL-10. Expres aminoterminální agonistové varianty N Δ 7 byla srovnatelná s IL-10 zatímco N Δ 10 varianta byla exprimována v úrovni asi čtyřikrát nižší než IL-10. Expres variant N Δ 11 a N Δ 12 byla příliš nízká na to, aby byla detegována touto metodou.

Analýzy ELISA

K další kvantifikaci hladin mutantních antagonistů lidského IL-10 v kondicionovaných médiích COS buněk se prováděla stanovení imunisorpční analýzou spojenou s enzymem (ELISA), v podstatě jak je popsáno Abramsem *et al.* [*Immunol. Rev.* 127: 5 (1992)]. Dvě monoklonální protilátky specifické pro různé epitopy lidského IL-10, označené 9D7 a 12G8, byly připraveny standardními metodami a použity jako zachycovací resp. detekční činidlo. Seriálně ředěná kondicionovaná média byla testována v těchto stanoveních s použitím purifikovaného lidského IL-10 jako standardu. Hranice detekce v tomto stanovení byla asi 1 ng/ml, a v kultivačních médiích po 72 hodinách inkubace byly typicky měřeny hladiny IL-10 v rozmezí 100 až 300 ng/ml.

Takto bylo nalezeno, že relativní hladiny IL-10 a antagonistů dobře korelují s výsledky získanými metabolickým značením, což napovídá, že epitopy rozeznávané použitými

monoklonálními protilátkami nejsou v mutovaných oblastech. V typickém stanovení byly pro lidský IL-10, K157E, C Δ 3, C Δ 4, N Δ 7, N Δ 10, N Δ 11 resp. N Δ 12 hladiny exprese 133, 80, 63, 48, 139, 28, 23 resp. 6,5 ng/ml.

Biologické testy

Lidský IL-10 a reprezentativní IL-10 mutantní antagonisté byly zkoušeny na aktivitu s použitím myších žírných buněk a lidských periferních mononukleárních buněk (PBMC).

Test na stimulaci žírných buněk byl prováděn v podstatě jak je popsán O'Garrou *et al.* [*Int. Immunol.* 2: 821 (1990)] a Thompson-Snipesem *et al.* [*J. Exp. Med.* 173: 507 (1991)]. Ve stručnosti: Na 5×10^3 MC/9 buněk (ATCC CRL 8306) na jamku ve 100 μ l testovacího média [RPMI-1640 obsahující 10 % fetálního bovinního séra (FBS), 50 μ M β -merkapt ethanol, 2 mM glutamin a penicilin/streptomycin] v 96-jamkové mikrotitrační destičce se působilo po 48 hodin různým množstvím IL-10 nebo jednoho z IL-10 antagonistů. Pak se přidalo 25 mikrolitrů 5 mg/ml MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromidu] (Sigma, St. Louis, MO) do každé jamky a destička byla inkubována po 3 - 5 hodin. Buňky pak byly lyzovány s použitím 10 % SDS s 10 mM HCl a měřila se absorbance při 570 nm.

Lidský IL-10 a varianty N Δ 7, N Δ 10 a N Δ 11 byly aktivní v tomto testu, ale žádná aktivita nebyla pozorována pro variant N Δ 12. Žádný z karboxyterminálně mutantních antagonistů nebyl aktivní, ani když se testoval v koncentraci až do 375 ng/ml (asi 100 násobek množství IL-10, jež vykazuje silnou aktivitu).

K měření jak IL-10 antagonisté inhibují syntézu cytokinů indukovanou lipopolysacharidem (LPS) byly získány lidské periferní mononukleární buňky (PBMC) od zdravých dárců a izolovány centrifugací na gradientu FICOLLu^R [Boyum, *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* 77 (1966)]. Alikvoty PBMC byly přeneseny do jamek (10^5 buněk na jamku v 200 μ l RPMI-1640 média obsahujícího 5 % FBS, penicilin/streptomycin, neesenciální

aminokyseliny, pyruvát sodný a 2 mM glutamin) 96-jamkových mikrotitračních destiček.

Lidský IL-10 byl přidán do některých jamek v konstantní 100 pM koncentraci, s nebo bez 100-násobného molárního nadbytku (10 nM) IL-10 antagonisty (jak je změřeno pomocí ELISA). Potom okamžitě následovalo přidání LPS (Sigma) do každé jamky na finální koncentraci 80 ng/ml. Pozitivní a negativní IL-10 kontroly byly inkubovány paralelně s použitím média kondicionovaného COS buňkami transfekovanými vektorem exprimujícím IL-10 resp. plasmidem pSV.Sport. Poslední zmíněné kontrolní kondicionované médium se používalo k ředění všech vzorků. Všechna stanovení se prováděla v duplikátech a ověřovala se v následných testech, s použitím jiných šarží buněk.

Destičky byly inkubovány ve zvlhčované atmosféře 5 % CO₂ při 37°C po 24 hodin, po čemž se supernatantové kapaliny sebraly a uschovaly při -20°C k pozdější analýze. Hladiny IL-6, IL-1α a TNFα byly v sebraných vzorcích měřeny s použitím souprav ELISA (R & D Systems, Minneapolis, MN) podle instrukcí výrobce.

U všech antagonistů bylo nalezeno, že v tomto testu zvrátí inhibiční aktivitu IL-10 na syntézu cytokinů, jak ukazuje Tabulka 1.

Tabulka 1

Procento reziduální aktivity IL-10*

<u>Vzorek</u>	<u>IL-6</u>	<u>IL-1α</u>	<u>TNF-α</u>
Pufr	100	100	100
Protilátka	0	0	0
K157E	21	27	51
C△3	12	13	39
C△4	19	27	61

* Inhibiční účinek lidského IL-10 na syntézu vyznačených cytokinů byl měřen v přítomnosti kontrolního pufru, saturačního množství neutralizující anti-IL-10 monoklonální protilátky, a 100 násobného molárního přebytku tří IL-10 antagonistů.

Podobné testy provedené s různými množstvími IL-10 mutantních antagonistů v nepřítomnosti IL-10 ukázaly, že žádný z antagonistů nemá inhibiční aktivitu na syntézu cytokinů. Žádnou inhibiční aktivitu nebylo možné detegovat s žádným z antagonistů při koncentracích do 100 pM, včetně.

Ke zkoušení účinku IL-10 antagonistů na aktivitu T buněk byl prováděn test se smíšenou lymfocytovou odezvou (MLR, mixed lymphocyte response). Lidské PBMC byly izolovány jak je popsáno shora. Stimulátorové PBMC byly připraveny působením 50 mg/ml mitomycinu C (Sigma, St. Louis, MO) na tyto buňky po 20 minut při 37°C.

Po 1×10^5 odpovídajících PBMC a stimulátorových buněk bylo smícháno v každé jamce 96-jamkové mikrotitrační destičky, spolu s různými množstvími lidského IL-10 nebo jednoho z K157E, C Δ 3 nebo C Δ 4 antagonistů, v celkovém objemu 200 μ l (v triplikátech). Buňky byly inkubovány s 5 % CO₂ při 37°C po 6 dní, po čemž kultury dostaly puls 1 μ Ci triciovaného thymidinu ([³H]-TdR; 15,6 Ci/mmol, NEN, Boston, MA) na jamku po 16 hodin. Lyzáty byly sebrány na filtr s použitím zařízení pro 96 jamek (Skatron, Inc., Sterline, VA) a měřeny v β -počítači (Pharmacia LKB Nuclear Inc., Gaithersburg, MD).

Bylo nalezeno, že antagonisté nemají schopnost inhibovat MLR při koncentraci 1 ng/ml. Naproti tomu, lidský IL-10 při této koncentraci vykazoval 82 % inhibice MLR.

Testy vazby k receptoru

Čištěný lidský IL-10 (asi z 99 % čistý) byl radiojódován metodou ENZYMOBEAD^R (Bio-Rad, Richmond, CA) podle instrukcí výrobce. Přibližně 4×10^5 transfekovaných COS buněk exprimujících cDNA lidského IL-10 receptoru bylo peletováno centrifugací při 200 x g po 10 minut, promyto ve vazebném pufru (PBS, 10 % fetálního bovinního séra, 0,1 % NaN₃) a resuspendováno v 200 μ l vazebného pufru obsahujícího [¹²⁵I]-lidský IL-10 (specifická radioaktivita 225 μ Ci/ μ g) v 150 pM koncentraci, se seriálně řaděným kondicionovaným médiem z COS buněk exprimujících

cdNA kódující lidský IL-10 nebo jednoho z mutantních antagonistů podle vynálezu.

Po inkubaci při 4°C po 2 hodiny byly buňky centrifugovány při 200 x g po 10 minut, každá buněčná peleta byla resuspendována v 100 µl vazebného pufru bez značeného IL-10, navrstvena nad 200 µl 10 % glycerolu ve vazebném pufru v prodloužených centrifugačních zkumavkách, centrifugována při 200 x g po 10 minut při 4°C a zkumavky rychle zamrazeny v kapalném dusíku. Buněčné pelety pak byly odstriženy do měřicích zkumavek a měřeny v počítači CLINGAMMA^R 1272 (Pharmacia LKB). Nespecifická vazba byla stanovena provedením vazby v přítomnosti 500 až 1000 násobného molárního přebytku neznačeného lidského IL-10.

Výsledky jsou ukázány v Tabulce 2, kde lze vidět, že všichni IL-10 antagonisté byly v kompetici vazby k receptoru skoro tak účinní jako IL-10 samotný.

Tabulka 2

Inhibice vazby radioaktivně značeného IL-10*

Vzorek	IC ₅₀ (pM)
Lidský IL-10	100
K157E	136 ± 65
C△3	172 ± 28
C△4	120 ± 9

* Ukázaná data, jež jsou průměry ze 2 nezávislých testů, jsou koncentrace neznačeného lidského IL-10 nebo uvedeného IL-10 antagonisty, které produkovaly 50 % inhibici vazby radioaktivně značeného IL-10 k buněčným receptorům.

Mnohé modifikace a obměny tohoto patentu se mohou provést bez odklonu od jeho ducha a rozsahu, jak bude zřejmé těm, co jsou zvěhlí v oboru. Konkrétní provedení popsaná zde jsou poskytnuta pouze cestou příkladů a vynález je omezen pouze podmínkami připojených nároků.

Ser Pro Gly Gln Gly Thr Gln Ser Glu Asn Ser Cys Thr His Phe Pro
1 5 10 15
Gly Asn Leu Pro Asn Met Leu Arg Asp Leu Arg Asp Ala Phe Ser Arg
20 25 30
Val Lys Thr Phe Phe Gln Met Lys Asp Gln Leu Asp Asn Leu Leu Leu
35 40 45
Lys Glu Ser Leu Leu Glu Asp Phe Lys Gly Tyr Leu Gly Cys Gln Ala
50 55 60
Leu Ser Glu Met Ile Gln Phe Tyr Leu Glu Glu Val Met Pro Gln Ala
65 70 75 80
Glu Asn Gln Asp Pro Asp Ile Lys Ala His Val Asn Ser Leu Gly Glu
85 90 95
Asn Leu Lys Thr Leu Arg Leu Arg Leu Arg Arg Cys His Arg Phe Leu
100 105 110
Pro Cys Glu Asn Lys Ser Lys Ala Val Glu Gln Val Lys Asn Ala Phe
115 120 125
Asn Lys Leu Gln Glu Lys Gly Ile Tyr Lys Ala Met Ser Glu Phe Asp
130 135 140
Ile Phe Ile Asn Tyr Ile Glu Ala Tyr Met Thr Met Lys
145 150 155 (II),

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

Pro Cys Glu Asn Lys Ser Lys Ala Val Glu Gln Val Lys Asn Ala Phe
115 120 125
Asn Lys Leu Gln Glu Lys Gly Ile Tyr Lys Ala Met Ser Glu Phe Asp
130 135 140
Ile Phe Ile Asn Tyr Ile Glu Ala Tyr Met Thr Met
145 150 155 (III).

4. Nukleová kyselina kódující antagonistu lidského IL-10, který zahrnuje maturní lidský IL-10 modifikovaný náhradou lysinového zbytku v poloze 157 zbytkem kyselé aminokyseliny nebo delecí jednoho nebo více aminokyselinových zbytků v oblasti obsahující 12 karboxyterminálních zbytků.
5. Nukleová kyselina podle nároku 4, kódující antagonistu lidského IL-10, u něž bylo z aminokonce deletováno 1 až 11 aminokyselinových zbytků.
6. Nukleová kyselina podle nároku 4, kódující antagonistu lidského IL-10, který má aminokyselinovou sekvenci definovanou sekvencí I, II nebo III, uvedenou v nároku 3.
7. Rekombinantní vektor obsahující nukleovou kyselinu podle nároku 4, jenž je schopný řídit expresi této nukleové kyseliny.
8. Hostitelská buňka obsahující rekombinantní vektor podle nároku 7.
9. Způsob přípravy antagonisty lidského IL-10, zahrnujícího maturní lidský IL-10 modifikovaný náhradou lysinového zbytku v poloze 157 zbytkem kyselé aminokyseliny nebo delecí jednoho nebo více aminokyselinových zbytků v oblasti obsahující 12 karboxyterminálních zbytků, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že zahrnuje kultivaci hostitelských buněk podle nároku 8 za podmínek, kdy se nukleová kyselina exprimuje.

10. Způsob podle nároku 9, v y z n a č u j í c í s e t í m ,
že nukleová kyselina kóduje antagonistu lidského IL-10,
u nějž bylo z aminokonce deletováno 1 až 11
aminokyselinových zbytků.
11. Způsob podle nároku 9, v y z n a č u j í c í s e t í m ,
že nukleová kyselina kóduje antagonistu lidského IL-10,
který má aminokyselinovou sekvenci definovanou sekvencí I,
II nebo III, uvedenou v nároku 3.
12. Způsob inhibice biologické aktivity IL-10,
v y z n a č u j í c í s e t í m , že zahrnuje uvedení
buněk nesoucích receptory pro IL-10 do kontaktu s účinným
množstvím antagonisty lidského IL-10, zahrnujícího maturní
lidský IL-10 modifikovaný náhradou lysinového zbytku
v poloze 157 zbytkem kyselé aminokyseliny nebo delecí
jednoho nebo více aminokyselinových zbytků v oblasti
obsahující 12 karboxyterminálních zbytků.
13. Způsob podle nároku 12, v y z n a č u j í c í s e t í m ,
že u antagonisty bylo z aminokonce deletováno 1 až 11
aminokyselinových zbytků.
14. Způsob podle nároku 12, v y z n a č u j í c í s e t í m ,
že antagonistá má aminokyselinovou sekvenci definovanou
sekvencí I, II nebo III, uvedenou v nároku 3.
15. Agonista lidského IL-10, který zahrnuje maturní lidský
IL-10 modifikovaný delecí od jednoho do jedenácti
z aminoterminálních aminokyselinových zbytků.
16. Antagonista podle nároku 15, u nějž bylo deletováno 7, 10
nebo 11 aminokyselinových zbytků.

17. Nukleová kyselina kódující agonistu lidského IL-10, který zahrnuje ~~maturní lidský IL-10 modifikovaný delecí od jednoho do jedenácti z aminoterminálních aminokyselinových zbytků.~~
18. Nukleová kyselina podle nároku 17, kódující agonistu lidského IL-10, u něž bylo deletováno 7, 10 nebo 11 aminokyselinových zbytků.
19. Rekombinantní vektor obsahující nukleovou kyselinu podle nároku 17, jenž je schopný řídit expresi této nukleové kyseliny.
20. Hostitelská buňka obsahující rekombinantní vektor podle nároku 19.
21. Způsob přípravy agonisty lidského IL-10, zahrnujícího ~~maturní lidský IL-10 modifikovaný delecí od jednoho do jedenácti z aminoterminálních aminokyselinových zbytků,~~ v y z n a č u j í c í s e t í m , že zahrnuje kultivaci hostitelských buněk podle nároku 20 za podmínek, kdy se nukleová kyselina exprimuje.
22. Způsob podle nároku 21, v y z n a č u j í c í s e t í m , že nukleová kyselina kóduje agonistu lidského IL-10, u něž bylo deletováno 7, 10 nebo 11 aminokyselinových zbytků.
23. Farmaceutický prostředek v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje farmaceuticky přijatelný nosič a účinné množství (a) agonisty lidského IL-10, zahrnujícího ~~maturní lidský IL-10 modifikovaný delecí od jednoho do jedenácti z aminoterminálních aminokyselinových zbytků,~~ nebo (b) antagonisty lidského IL-10, zahrnujícího ~~maturní lidský IL-10 modifikovaný~~ náhradou lysinového zbytku v poloze 157 zbytkem kyselé aminokyseliny nebo delecí jednoho nebo více aminokyselinových zbytků v oblasti obsahující 12 karboxyterminálních zbytků.

24. Farmaceutický prostředek podle nároku 23, v y z n a č u j í c í s e t í m , že u antagonisty bylo z aminokonce deletováno 1 až 11 aminokyselinových zbytků.
25. Farmaceutický prostředek podle nároku 23, v y z n a č u j í c í s e t í m , že antagonistista má aminokyselinovou sekvenci definovanou sekvencí I, II nebo III, uvedenou v nároku 3.
26. Farmaceutický prostředek podle nároku 23, v y z n a č u j í c í s e t í m , že antagonistista má aminokyselinovou sekvenci definovanou sekvencí I, II nebo III, uvedenou v nároku 3.
27. Použití antagonisty lidského IL-10, který zahrnuje maturní lidský IL-10 modifikovaný náhradou lysinového zbytku v poloze 157 zbytkem kyselé aminokyseliny nebo delecí jednoho nebo více aminokyselinových zbytků v oblasti obsahující 12 karboxyterminálních zbytků, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se inhibuje biologická aktivita IL-10.
28. Použití antagonisty lidského IL-10, který zahrnuje maturní lidský IL-10 modifikovaný náhradou lysinového zbytku v poloze 157 zbytkem kyselé aminokyseliny nebo delecí jednoho nebo více aminokyselinových zbytků v oblasti obsahující 12 karboxyterminálních zbytků, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se vyrobí medikament pro inhibici biologické aktivity IL-10.