



EESTI VABARIIK

PATENDIAMET

(11) **EE-EP 1 641 822 B1**

(12) **EESTIS KEHTIVA EUROOPA PATENDI
PATENDIKIRJELDUSE TÕLGE**

(51)

Int. Cl.

*C07K 14/54 (2006.01)**C12N 15/24 (2006.01)**C07K 16/24 (2006.01)**A61K 38/20 (2006.01)**A61K 39/395 (2006.01)**G01N 33/53 (2006.01)*

(10) Registreeringu number:	E008285	(73) Patendiomanik:	
(11) Patendikirjelduse tõlke number:	EE-EP 1 641 822	Genentech, Inc. 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080-4990, US	
(30) Prioriteediandmed:	08.07.2003 US 485599 P	(72) Leiutise autorid:	
	11.07.2003 US 486457 P	ARNOTT, David 366 E. 40th Avenue, San Mateo, California 94403, US	
(96) Euroopa patenditaotluse esitamise kuupäev:	02.06.2004	GURNEY, Austin 1 Debbie Lane, Belmont, California 94002, US	
(96) Euroopa patendi- taotluse number:	04754234.5	HASS, Philip 558 Sierra Street, Moss Beach, California 94038, US	
(97) Euroopa patendi väljaand- misest teatamise kuupäev:	15.05.2013	LEE, James 705 Shelter Creek Lane, San Bruno, California 94066, US	
(97) Euroopa patendi number:	EP 1 641 822	WU, Yan 101 Challenge Court, Foster City, California 94404, US	
Patendikirjelduse tõlke esitamise kuupäev:	08.08.2013	(74) Patendivolinik:	
Patendikirjelduse tõlke avalikustamise kuupäev:	15.10.2013	Piret Niidas LASVET Patendibüroo OÜ Suurtüki 4a, 10133 Tallinn, EE	

(54) IL-17 A/F heteroloogsed polüpeptiidid ja nende kasutamine ravis

KIRJELDUS

LEIUTISE VALDKOND

(0001) Käesolev leiutis käsitleb üldiselt inimese uudse tsütokiini, mida siin tähistatakse kui interleukiin 17A/F (IL-17A/F), identifitseerimist ja eraldamist.

LEIUTISE EELDUS

(0002) Muude toimete hulgas on rakuvälistel valkudel tähtis roll hulkraksete organismide moodustumises, diferentseerumises ja säilitamises. Tüüpiliselt juhitakse paljude üksikute rakkude saatust, näiteks prolifererumist, migreerumist, diferentseerumist ning vastasmõju teiste rakkudega, teabega, mis pärineb teistest rakkudest ja/või vahetust keskkonnast. Seda teavet antakse tihti edasi sekreteeritavate polüpeptiididega (näiteks mitogeensete faktorite, elumusfaktorite, tsütotoksiliste faktorite, diferentseerumiskfaktorite, neuropeptiidide ja hormoonidega), mida omakorda võetakse vastu ja tõlgendatakse mitmesuguste rakuliste retseptorite või membraaniseoseliste valkudega. Harilikult läbivad need sekreteeritavad polüpeptiidid või signaalmolekulid rakulise sekretsiooniraja, et jõuda oma toimekohta rakuvälises keskkonnas.

(0003) Sekreteeritavatel valkudel on mitmesuguseid tööstuslikke rakendusi, sealhulgas ravimite, diagnostiliste agensite, biosensorite ja bioreaktoritena. Enamus käesolevalt kättesaadavatest ravimvalkudest, nagu trombolüütilised agensid, interferoonid, interleukiinid, erütropoetiinid, kolooniat stimuleerivad faktorid ja mitmesugused muud tsütokiinid, on sekreteeritavad valgud. Nende retseptoritel, milleks on membraanivalgud, on samuti potentsiaal ravimite või diagnostiliste agensitena.

(0004) Muude toimete hulgas võib rakuvälistel valkudel olla tähtis roll hulkraksete organismide moodustumises, diferentseerumises ja säilimises. Tüüpiliselt juhitakse paljude üksikute rakkude saatust, näiteks prolifererumist, migreerumist, diferentseerumist ning teiste rakkudega vastasmõju, teabega, mis pärineb teistest rakkudest ja/või vahetust keskkonnast. Seda teavet kantakse tihti üle sekreteeritavate polüpeptiididega (näiteks mitogeensete faktorite, elumusfaktorite, tsütotoksiliste faktorite, diferentseerumiskfaktorite, neuropeptiidide ja hormoonidega), mida omakorda võetakse vastu ja tõlgendatakse mitmesuguste rakuliste retseptorite või membraaniseoseliste valkude poolt. Sellised membraaniseoselised valgud ja rakulised retseptorid hõlmavad, nendega piirdumata, tsütokiinide retseptoreid, retseptorkinaase,

retseptorfosfataase, rakk-rakk vastasmõjudesse kaasatud retseptoreid ja rakulisi adhesiinimolekule, nagu selektiinid ja integriinid. Näiteks rakkude kasvu ja diferentseerumist reguleerivate signaalide transduktsiooni reguleeritakse osaliselt mitmesuguste rakuliste valkude fosforüülimisega. Valgu türosiinkinaasid, mis on seda toimingut katalüüsivad ensüümid, võivad toimida ka kasvufaktorite retseptoritena. Näited hõlmavad fibroblasti kasvufaktori retseptorit ja närvi kasvufaktori retseptorit.

(0005) Sarnaselt sekreteeritavate valkudega on membraaniseoselistel valkudel ja retseptor-molekulidel mitmesuguseid tööstuslikke rakendusi, sealhulgas ravim- ja diagnostiliste agetena. Näiteks võib retseptor-immunoadhesiine rakendada raviagensitena retseptori-ligandi vastasmõjude tõkestamiseks. Membraaniseoselisi valke võib rakendada ka asjakohase retseptori-ligandi vastasmõju võimalike peptiidsete või väikese molekuliga inhibiitorite skriinimiseks.

(0006) Tööstuses ja akadeemilises sfääris on tehtud jõupingutusi uute natiivsete sekreteeritavate valkude ja natiivsete retseptorite või membraaniseoseliste valkude identifitseerimiseks. Paljud jõupingutused keskenduvad inimese rekombinantsete DNA-kogude skriinimisele, et identifitseerida uudseid sekreteeritavaid valke kodeerivaid järjestusi. Skriinimismetodite näiteid on kirjanduses kirjeldatud (vaadake näiteks Klein *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., 93:7108-7113 (1996); US patent nr 5536637).

(0007) Sellega seoses käsitleb käesolev leiutis interleukiin-17 (IL-17) perekonda, mille puhul on näidatud seost immuunvahendatud ja põletikulise haigusega, kuuluvate uudsete sekreteeritavate polüpeptiidide identifitseerimist. Immuunseoselised ja põletikulised haigused on küllaltki keerukate, tihti mitmeti omavahel ühendatud bioloogiliste radade, mis normaalse füsioloogia puhul on üliolulised reageerimiseks vigastusele või kahjustusele, algatavad taastumise vigastusest või kahjustusest ning seadistavad kaasasündinud ja omandatud immuunsuse võõrorganismide vastu, ilming või tagajärg. Haigus või patoloogia ilmneb, kui need normaalsed füsioloogilised rajad põhjustavad lisavigastuse või –kahjustuse, mis on otseselt seotud vastuse intensiivsusega, on ebanormaalse reguleerimise või ülemäärase stimuleerimise tagajärg, reaktsioon organismi enda vastu või nende kombinatsioon.

(0008) Kuigi nende haiguste teke hõlmab tihti paljude etappidega radasid ning tihti hõlmab see paljusid erinevaid bioloogilisi süsteeme/radasid, võib kriitlises punktis, mis ühes või enamas nendest radades esineb, sekkumisel olla leevendav või ravitoime. Ravisekkumine

võib ilmnedä kahjuliku protsessi/raja antagonismina või kasuliku protsessi/raja stimuleerimisena.

(0009) Paljud immuunseoselised haigused on tuntud ja neid on ulatuslikult uuritud. Sellised haigused hõlmavad immuunvahendatud põletikulisi haigusi (nagu reumatoidartriit, immuunvahendatud neeruhaigus, maksa-sapihaigused, põletikuline soolehaigus (*inflammatory bowel disease* - IBD), proriaas ja astma), mitte-immuunvahendatud põletikulisi haigusi, nakkushaigusi, immuunpuudulikushaigusi, kasvajaid jne.

(0010) T-lümfotsüüdid (T-rakud) on imetaja immuunvastuse oluline koostisosa. T-rakud tunnevad ära antigeene, mis on seotud organismi enda molekuliga, mida kodeeritakse peamise koesobivuskompleksi (*major histocompatibility complex* - MHC) geenidega. Antigeen võib koos MHC-molekulidega olla esitletud antigeeni esitlevate rakkude pinnal, viirusega nakatunud rakkudel, vähirakkudel, siiratud rakkudel jne. T-raku süsteem kõrvaldab need muutunud rakud, mis kujutavad ohtu peremees-imetaja tervisele. T-rakud hõlmavad T-abistajarakke ja tsütotoksilisi T-rakke. Pärast antigeeni esitleval rakul oleva antigeeni-MHC-kompleksi äratundmist prolifereruvad T-abistajarakud ulatuslikult. T-abistajarakud sekreteerivad ka erinevaid tsütokiine, näiteks lümfokiine, millel on keskne roll B-rakkude, tsütotoksiliste T-rakkude ja mitmesuguste muude, immuunvastuses osalevate rakkude aktiveerimises.

(0011) Nii humoraalse kui rakuvahendatud immuunvastuste puhul on keskne sündmus T-abistajarakkude aktiveerumine ja kлонаalne ekspansioon. T-abistajaraku aktiveerumine algatatakse T-raku retseptori (*T cell receptor* - TCR) – CD3 kompleksi vastasmõjuga antigeeni-MHC kompleksiga, mis on antigeeni esitleva raku pinnal. See vastasmõju vahendab biokeemiliste sündmuste kaskaadi, mis indutseerib puhkeseisundis oleva T-abistajaraku sisenemise rakutsükklisse (ülemineku G0-st G1) ning selle tulemuseks on IL-2 ja mõnikord IL-4 kõrge afiinsusega retseptori ekspresseerumine. Aktiveeritud T-rakk areneb läbi prolifererumise ja diferentseerumise tsükli mälorakkudeks või efektorrakkudeks.

(0012) Lisaks TCR-ga vahendatud signaalidele hõlmab T-rakkude aktiveerumine ka kaasstimuleerimist, mis indutseeritakse antigeeni esitleva raku poolt vabastatavate tsütokiinide või antigeeni esitleva raku ja T-raku membraaniseoseliste molekulide vastasmõjuga. On näidatud, et tsütokiinid IL-1 ja IL-6 pakuvad kaasstimuleerimissignaali. Lisaks on antigeeni esitleva raku pinnal ekspresseeruva molekuli B7 ja T-raku pinnal ekspresseeruvate molekulide CD28 ja CTLA-4 vahelisel vastasmõjul T-rakku aktiveeriv toime. Aktiveerunud T-rakkudel

on ekspresseeritavate rakuliste adhesioonimolekulide, nagu ICAM-1, integriinid, VLA-4, LFA-1, CD56 jne, arv suurenenud.

(0013) T-raku prolifereerumine lümfotsüütide segakultuuris või lümfotsüütide segareaktsioonis (*mixed lymphocyte reaction* – MLR-is) on ühendi immuunsüsteemi stimuleeriva võime väljakujunenud ilming. Paljude immuunvastuste puhul infiltreruvad põletikuga seotud rakud kahjustuse või nakatumise kohta. Migreeruvad rakud võivad olla neutrofiilid, eosinofiilid, monotsüüdid või lümfotsüüdid, mida võib määrada haigestunud kudede histoloogilise uuringuga; Current Protocols in Immunology, toim. John E. Coligan, 1994, John Wiley & Sons, Inc.

(0014) Immuunseoselisi haigusi võib ravida, surudes maha immuunvastuse. Neutraliseerivate antikehade, mis inhibeerivad immunostimuleeriva aktiivsusega molekule, kasutamine võiks olla kasulik immuunvahendatud ja põletikuliste haiguste ravis. Molekule, mis inhibeerivad immuunvastust, võib rakendada (valke otseselt või antikeha agonistide kasutamise kaudu), et inhibeerida immuunvastust ning leevendada sellega immuunseoselist haigust.

(0015) Interleukiin-17 (IL-17) on T-rakupõhine põletikku soodustav molekul, mis stimuleerib epiteeli- ja endoteelirakke ning fibroblaste tootma muid põletikulisi tsütokiine ja kemokiine, sealhulgas IL-6, IL-8, G-CSF ja MCP-1 (vaadake Yao, Z. *et al.*, J. Immunol., 122(12):5483-5486 (1995); Yao, Z. *et al.*, Immunity, 3(6):811-821 (1995); Fossiez, F. *et al.*, J. Exp. Med., 183(6): 2593-2603 (1996); Kennedy, J. *et al.*, J. Interferon Cytokine Res., 16(8):611-7 (1996); Cai, X. Y. *et al.*, Immunol. Lett, 62(1):51-8 (1998); Jovanovic, D. V. *et al.*, J. Immunol., 160(7):3513-21 (1998); Laan, M. *et al.*, J. Immunol., 162(4):2347-52 (1999); Linden, A. *et al.*, Eur. Respir. J., 15(5):973-7 (2000) ja Aggarwal, S., Gurney, A. L., J. Leukoc. Biol., 71(1):1-8 (2002)). IL-17 on samuti sünergiline teiste tsütokiinidega, mille hulgas on TNF- α ja IL-1 β , et edasi indutseerida kemokiinide ekspresseerimist (Chabaud, M. *et al.*, J. Immunol., 161(1):409-14 (1998)). Interleukiin-17 (IL-17) on pleiotroopsed bioloogilised aktiivsused erinevatele rakutüüpidele. IL-17-el on ka võime indutseerida ICAM-1 ekspressiooni pinnal, T-rakkude prolifereerumist ning inimese CD34⁺-eellasrakkude kasvu ja diferentseerumist neutrofiilideks. IL-17 on seostatud ka luu metabolismiga ning on pakutud, et sellel on oluline roll patoloogilistes seisundites, nagu reumatoidartriit ja luuimplantaatide lõdvenemine, mida iseloomustab aktiveeritud T-rakkude esinemine ja TNF- α tootmine (Van Bezooijen *et al.*, J. Bone Miner. Res., 14:1513-1521 (1999)). Leiti, et reumatoidartriidiga patsientide sünoviaalkoest pärinevad aktiveeritud T-rakud sekreteerisid suuremas koguses

IL-17 kui rakud, mis pärinesid tervetest indiviididest või osteoartriidiga patsientidest (Chabaud *et al.*, *Arthritis Rheum.*, 42:963-970 (1999)). Pakuti, et see põletikku soodustav tsütokiin panustab aktiivselt sünoviaalkoe põletikku reumatoidartriidi korral. Näib, et IL-17 panustab reumatoidartriidi patoloogiasse veel ühe mehhanismiga, mis on erinev selle põletikku soodustavast rollist. Näiteks on näidatud, et IL-17 indutseerib osteoklasti diferentseerumise faktori (*osteoclast differentiation factor* – ODF-i) mRNA ekspressiooni osteoblastides (Kotake *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 103:1345-1352 (1999)). ODF stimuleerib eellasrakkude diferentseerumist osteoklastideks, mis on luustumisse kaasatud rakud. Kuna reumatoidartriidiga patsientide liigesevedelikus on IL-17 tase märkimisväärselt suurenenud, siis näib, et IL-17 poolt indutseeritava osteoklasti moodustumisel on otsustav roll luustumisel reumatoidartriidi puhul. Arvatakse ka, et IL-17-el on võtmeroll kindlate teiste autoimmuunhäirete puhul, nagu hulgiskleroos (Matusевич *et al.*, *Mult. Scler.*, 5:101-104 (1999); Kurasawa, K. *et al.*, *Arthritis Rheum.*, 43(11):2455-63 (2000)) ja psoriaas (Teunissen, M. B. *et al.*, *J. Invest. Dermatol.*, 111(4):645-9 (1998); Albanesi, C. *et al.*, *J. Invest. Dermatol.*, 115(1):81-7 (2000) ja Homey, B. *et al.*, *J. Immunol.*, 164(12):6621-32 (2000)) puhul.

(0016) Lisaks on näidatud, et rakusisese signaalimisega stimuleerib IL-17 Ca^{2+} sissevoolu ja cAMP vähenemist inimese makrofaagides (Jovanovic *et al.*, *J. Immunol.*, 160:3513 (1998)). IL-17-ga töödeldud fibroblastides indutseeritakse NF- κ B aktiveerimine (Yao *et al.*, *Immunity*, 3:811 (1995), Jovanovic *et al.*, *supra*), samas kui IL-17-ga töödeldud makrofaagides aktiveeritakse NF- κ B ja mitogeeniga aktiveeritavad valgukinaasid (Shalom-Barek *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 273:27467 (1998)). Lisaks on IL-17-e järjestusel sarnasus imetaja tsütokiinisarnase faktoriga 7, mis on hõlmatud luu ja kõhre kasvu. Muud valgud, millega IL-17-e järjestusel on sarnasus, on inimese embrüopärane interleukiinisarnane faktor (*embryo-derived interleukin-related factor* - EDIRF) ja interleukiin-20.

(0017) IL-17-e laiaulatuslike toimetega kooskõlas on leitud, et raku pinnal paiknev IL-17 retseptor on laialdaselt ekspresseeritud paljudes kudedes ja rakutüüpides (Yao *et al.*, *Cytokine*, 9:794 (1997)). Inimese IL-17 retseptori (IL-R-i) aminohapete järjestuse (866 aminohapet) põhjal on ennustav ühe membraani läbiva domeeniga ja pika, 525 aminohappe pikkuse rakusisese domeeniga valk ning see retseptori järjestus on unikaalne ega ole sarnane mistahes retseptoritega tsütokiinide/kasvufaktorite retseptorite perekonnast. See on seotud sarnansuse puudumisega IL-17 enda ja muude tuntud valkude vahel, osutades, et IL-17 ja selle retseptor võivad olla osa signaalvalkude ja –retseptorite uudest perekonnast. On näi-

datud, et IL-17 aktiivsust vahendab seondumine oma unikaalse rakupinna-retseptoriga (mida siin tähistatakse kui inimese IL-17R), kusjuures eelnevate uuringutega on näidatud, et T-rakkude ühendusse viimine IL-17 retseptorpolüpeptiidi lahustuva vormiga inhibeeris PHA, konkanavaliin A ja TCR-vastase monokloonse antikehaga indutseeritavat T-raku prolifererumist ja IL-2 tootmist (Yao *et al.*, *J. Immunol.*, 155:5483-5486 (1995)). Seetõttu on oluline huvi identifitseerida ja iseloomustada uudseid polüpeptiide, millel on homoloogia tuntud tsütokiinireseptoritega ning spetsiifiliselt IL-17-e retseptoriga.

(0018) Käesolevalt tunnustatakse interleukiin-17 tsütokiinide kujuneva perekonna prototüüp-liikmena. Inimese ja teiste imetajate genoomide suuremahuline sekveneerimine on esile toonud IL-17-ga selgelt sarnaseid valke kodeerivaid geene, määratledes sellega tsütokiinide uue perekonna. Inimestel ja hiirtel on perekonnas IL-17 vähemalt 6 liiget, sealhulgas IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E ja IL-17F ning lisaks uued retseptorid IL-17RH 1, IL-17RH2, IL-17RH3 ja IL-17RH4 (vaadale üllitist WO01/46420, mis on avaldatud 28. juunil 2001). Ühe sellise IL-17-liikme (mida tähistatakse IL-17F) puhul on näidatud seondumist inimese IL-17 retseptoriga (IL-17R-ga) (Yao *et al.*, *Cytokine*, 9(11):794-800 (1997)). Esialgne iseloomustamine viitab, et sarnaselt IL-17-ga on nendel uuena identifitseeritud molekulidest mitmel võime moduleerida immuunfunktsiooni. Mitme sellise faktori puhul identifitseeritud võimsad põletikulised toimed ning tekkivad seosed oluliste haigustega inimestel viitavad, et neil valkudel võivad olla märkimisväärsed rollid põletikulistes protsessides ja need võivad pakkuda võimalusi ravisekkumisteks.

(0019) Inimese IL-17F-i kodeeriv geen paikneb IL-17-e kõrval (Hymowitz, S. G. *et al.*, *Embo J.*, 20(19):5332-41 (2001)). IL-17 ja IL-17F on 44% aminohapete samasus, samas kui perekonna IL-17 teistel liikmetel on väiksem, 15-27% aminohapete samasus, mis viitab, et IL-17 ja IL-17F moodustavad perekonnas IL-17 eristuva alamrühma (Starnes, T. *et al.*, *J. Immunol.*, 167(8):4137-40 (2001); Aggarwal, S., Gurney, A. L., *J. Leukoc. Biol.*, 71(1):1-8 (2002)). Näib, et IL-17F-il on IL-17-ga sarnased bioloogilised toimed ning see on võimeline soodustama IL-6, IL-8 ja GM-CSF-i tootmist väga erinevatest rakkudest. Sarnaselt IL-17-ga on see võimeline indutseerima kõhremaatriksi vabastamist ja inhibeerima uue kõhremaatriksi sünteesi (vaadake üllitist US-2002-0177188-A1, mis on avaldatud 28. novembril 2002). Seega võib IL-17F sarnaselt IL-17-ga potentsiaalselt panustada põletikuliste häirete patoloogiasse. Hiljuti täheldasid need autorid, et T-rakkudes indutseeritakse interleukiin-23 (IL-23) toimel nii IL-17 kui IL-17F (Aggarwal, S. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 278(3):1910-4 (2003)).

Tähelepanek, et IL-17 ja IL-17F-il on sarnane kromosomaalne paiknemine ja märkimisväärne järjestuse sarnasus ning lisaks ka tähelepanek, et IL-17 ja IL-17F näivad olevat indutseeritavad samas rakupopulatsioonis vastusena spetsiifilisele stiimulile, on toonud kaasa inimese uue, IL-17 ja IL-17F-i kovalentselt heterodimeerist koosneva tsütokiini (mida siin tähistatakse IL-17A/F) identifitseerimise. Inimese IL-17A/F on selgelt uus tsütokiin, mis eristub inimese IL-17-st ja IL-17F-ist nii valgu struktuuri kui rakupõhistes aktiivsusanalüüsid. Kasutades standardina inimese puhastatud rekombinantset IL-17A/F-i, töötati välja inimese IL-17A/F-i spetsiifiline ELISA. Kasutades seda spetsiifilist ELISA-t tuvastati inimese IL-17A/F-i indutseeritud ekspresseerumine, mis kinnitab, et looduslikult toodetakse IL-17A/F-i kultiveeritavatest, inimese aktiveeritud T-rakkudest. Seega on IL-17A/F selgelt uus tsütokiin, mis on tuvastatav inimese eraldatud ja aktiveeritud T-rakkude loodusliku saadusena ning mille rekombinantne vorm on valgu struktuuri põhjal ja rakupõhistes analüüsid iseloomustatud kui erinev ja eristuv sarnastest tsütokiinidest. Seega pakuvad ja identifitseerivad need uuringud uudse immuunstimulaatori (st IL-17A/F-i), mis võib võimendada immuunsüsteemi toimet vastusena konkreetsele antigeenile, mis eelnevalt võib olla immunoloogiliselt inaktiivne. Sellisena on sellel uuena identifitseeritud immuunstimulaatoril olulised kliinilised rakendused. Seega võiks see uudne tsütokiin IL-17A/F või selle agonistid leida praktilist rakendust immuunstimulaatorina ning samas on eeldatav, et molekulid, mis inhibeerivad IL-17A/F-i aktiivsust (antagonistid), leiavad praktilist rakendust siis, kui on soovitud immuunvastuse inhibeerimine, nagu see on autoimmuunhaiguste puhul. Spetsiifiliselt võiks selle uue tsütokiini vastastel antikehadel, mis jäljendavad (agonist-antikehad) või inhibeerivad (antagonist-antikehad) IL-17A/F-i immunoloogilisi aktiivsusi, olla raviomadused. Samuti võiks ravirakendustes olla potentsiaal väikestel molekulidel, mis toimivad seda uutset tsütokiini inhibeerides.

LEIUTISE KOKKUVÕTE

A. Teostused

(0020) Käesolev leiutis käsitleb kompositsioone ja meetodeid, mis on kasutatavad, et diagnoosida ja ravida immuunseoselisi haigusi imetajatel, sealhulgas inimestel. Käesolev leiutis põhineb valkude (sealhulgas agonist- ja antagonist-antikehade), mis stimuleerivad või inhi-

beerivad immuunvastust imetajatel, identifitseerimisel. Immuunseoselisi haigusi võib ravida, surudes maha või võimendades immuunvastust. Molekulid, mis võimendavad immuunvastust, stimuleerivad antigeenivastast immuunvastust või suurendavad selle võimekust. Molekule, mis stimuleerivad immuunvastust, võib kasutada raviks siis, kui immuunvastuse võimendamine oleks kasulik. Alternatiivselt võib molekule, mis suruvad maha immuunvastust ning nõrgestavad või vähendavad antigeenivastast immuunvastust (näiteks neutraliseerivaid antikehasid), kasutada raviks, kui immuunvastuse nõrgendamine oleks kasulik (näiteks põletiku puhul). Vastavalt sellele on käesoleva leiutise kohased IL-17A/F-polüpeptiidid ja nende antagonistid, nagu on määratletud patendinõudluses, samuti kasutatavad arstimate ja ravimite valmistamiseks immuunseoseliste ja põletikuliste haiguste raviks. Spetsiifilise eripära kohaselt võivad need arstimid ja ravimid sisaldada IL-17A/F-polüpeptiidi või selle antagonisti, nagu on määratletud patendinõudluses, ravivalt toimivat kogust koos farmatseutiliselt vastuvõetava kandjaga. Eelistatavalt on see segu steriilne.

(0021) Lisateostuses käsitleb leiutis IL-17A/F-polüpeptiidi agonistide või antagonistide identifitseerimise meetodit, mis hõlmab IL-17A/F-polüpeptiidi ühendusse viimist kandidaatmolekuliga ning nimetatud IL-17A/F-polüpeptiidiga vahendatava bioloogilise aktiivsuse jälgimist. Eelistatavalt on IL-17A/F-polüpeptiid natiivse järjestusega IL-17A/F-polüpeptiid. Eelistatavalt on IL-17A/F-i agonist või antagonist IL-17A/F-vastane antikeha.

(0022) Veel ühes teostuses käsitleb leiutis ainekompositsiooni, mis sisaldab IL-17A/F-polüpeptiidi või selle polüpeptiidiga seonduvat antagonist-antikeha segatuna kandja või abiainega. Ühe eripära kohaselt sisaldab kompositsioon polüpeptiidi või antikeha ravivalt toimivas koguses. Kui kompositsioon sisaldab immunostimuleerivat molekuli, siis on see kompositsioon kasutatav: a) et võimendada põletikuga seotud rakkude infiltreerumist seda vajaval imetajal koesse; b) immuunvastuse stimuleerimiseks ja võimendamiseks seda vajaval imetajal; c) seda vajaval imetajal T-lümfotsüütide prolifereerumise suurendamiseks vastusena antigeenile; d) T-lümfotsüütide aktiivsuse stimuleerimiseks või e) vaskulaarse läbilaskvuse suurendamiseks. Kui kompositsioon sisaldab immunoinhibeerivat molekuli, siis on see kompositsioon kasutatav: a) et vähendada põletikuga seotud rakkude infiltreerumist seda vajaval imetajal koesse; b) immuunvastuse inhibeerimiseks ja vähendamiseks seda vajaval imetajal; c) T-lümfotsüütide aktiivsuse vähendamiseks või d) seda vajaval imetajal T-lümfotsüütide prolifereerumise vähendamiseks vastusena antigeenile. Kompositsioon võib sisaldada aktiiv-

set lisakoostisainet, mis võib olla näiteks lisaantikeha või tsütotoksiline või keemiaraviagens. Eelistatavalt on kompositsioon steriilne.

(0023) Veel ühes teostuses käsitleb leiutis seda vajaval imetajal immuunseoselise häire ravimise meetodit, mis hõlmab sellele imetajale IL-17A/F-polüpeptiidi, selle agonisti või selle antagonistiga ravivalt toimiva koguse manustamist. Eelistatava eripära kohaselt valitakse immuunseoseline häire rühmast, mis koosneb järgnevatest: süsteemne erütematoosne luupus, reumatoidartriit, osteoartriit, juveniilne krooniline artriit, spondüloartropaatiad, süsteemne sklerosis, idiopaatilised põletikulised müopaatiad, Sjörgeni sündroom, süsteemne vaskuliit, sarkoidoos, autoimmuunne hemolüütiline aneemia, autoimmuunne trombotsütopeenia, türeoidiit, diabeet, immuunvahendatud neeruhaigus, kesk- ja perifeerse närvisüsteemi demüeliniseerivad haigused, nagu hulgisklerosis, idiopaatiline demüeliniseeriv polüneuropaatia või Guillaini-Barré'i sündroom ja krooniline põletikuline demüeliniseeriv polüneuropaatia, maksa-sapihaigused, nagu nakkuslik või autoimmuunne krooniline aktiivne hepatiit, esmane sapitsirroos, granulomatoosne hepatiit ja skleroseeruv kolangiit, põletikuline soolehaigus, gluteeni tundlik enteropaatia ja Whipple tõbi, autoimmuunsed või immuunvahendatud nahahaigused, mille hulgas on naha villtõved, mitmekujuline erüteem ja kontaktdermatiit, psoriaas, allergilised haigused, nagu astma, allergilise nohu, atoopiline dermatiit, toidu suhtes ülitundlikkus ja nõgestõbi, immunoloogilised kopsuhaigused, nagu eosinofiilne kopsupõletik, idiopaatiline kopsufibroos ja ülitundlikkusega seotud kopsupõletik, siirdamisega seotud haigused, sealhulgas transplantaadi hülgamine ja transplantaadi peremehevastane haigus.

(0024) Leiutise veel ühes teostuses pakutakse eraldatud antikeha, mis spetsiifiliselt seondub mistahes eespool või allpool kirjeldatava IL-17A/F-polüpeptiidiga. Valikuliselt, nagu on määratletud patendiõudluses, on antikeha monokloonne antikeha, humaniseeritud antikeha, antikeha fragment või üheaahelaline antikeha. Antikeha inhibeerib või neutraliseerib IL-17A/F-polüpeptiidi aktiivsust (antagonist-antikeha). Eelistatavalt on antikeha monokloonne antikeha, millel eelistatavalt on komplementaarsust määrava piirkonna (*complementarity determining region* – CDR-i) jäägid, mis on inimesest erineva päritoluga, ning inimese raamistikpiirkonna (*framework region* – FR-i) jäägid. Antikeha võib olla märgistatud ning see võib olla immobiliseeritud tahkele toendile. Lisaeripära kohaselt on see antikeha antikeha fragment, monokloonne antikeha, üheaahelaline antikeha või idiotüübivastane antikeha.

(0025) Leiutisega võib pakkuda eraldatud Fab-fragmenti, mis on võimeline seonduma IL-17A/F-ga, mida kodeeritakse nukleotiidjärjestusega, mis kodeerib sellist aminohapete järjes-

tust, nagu on kirjeldatud siin eespool. Fab-fragmendi tootmist on samuti siin kirjeldatud, kusjuures need toimingud hõlmavad sobivat kodeerivat nukleiinhappemolekuli sisaldavat vektorit sisaldava peremeesraku kultiveerimist nimetatud Fab-fragmendi ekspresseerimiseks sobivates tingimustes ning nimetatud Fab-fragmendi kogumist rakukultuurist.

(0026) Veel ühes teostuses käsitleb käesolev leiutis kompositsiooni, mis sisaldab patendi- nõudluses kirjeldatud IL-17A/F-vastast antikeha segatuna farmatseutiliselt vastuvõetava kandjaga. Ühe eripära kohaselt sisaldab kompositsioon antikeha ravivaltoimivas koguses. Eelistatavalt on kompositsioon steriilne. Kompositsiooni võib manustada vedela ravimpreparaadi vormis, millele võib olla lisatud säilitusaineid, et saavutada pikendatud säilivus staabiilsena. Alternatiivselt võib antikeha olla monokloonne antikeha, antikeha fragment, humaniseeritud antikeha või üheaahelaline antikeha.

(0027) Lisateostuses käsitleb leiutis tootmisartiklit, mis hõlmab:

- (a) ainekompositsiooni, mis sisaldab IL-17A/F-polüpeptiidi või antagonist-antikeha, mis seondub spetsiifiliselt patendinõudluses määratletud nimetatud polüpeptiidiga;
- (b) nimetatud kompositsiooni sisaldavat mahutit; ning
- (c) nimetatud mahutile kinnitatud etiketti või nimetatud mahutiga kaasnevat pakendi infolehte, millel näidatakse nimetatud IL-17A/F-polüpeptiidi või selle agonisti või antagonist kasutamine immuunseoselise haiguse raviks; kompositsioon võib sisaldada IL-17A/F-polüpeptiidi või selle agonisti või antagonist ravivaltoimivas koguses.

(0028) Siin kirjeldatakse imetajal immuunseoselise haiguse diagnoosimise meetodit, mis hõlmab IL-17A/F-polüpeptiidi kodeeriva geeni ekspressioonitaseme tuvastamist (a) imetajast saadud koerakkude kontrollprooviga proovis ning (b) teadaoleva sama tüüpi normaalse koe rakkude kontrollproovist, kusjuures kontrollprooviga võrreldes kõrgem või madalam ekspressioonitase testitavas proovis näitab immuunseoselise haiguse esinemist imetajal, kellelt testitav kude saadi.

(0029) Veel ühes teostuses käsitleb leiutis imetajal immuunhaiguse diagnoosimise meetodit, mis hõlmab (a) imetajalt võetud koerakkude testitava proovi ühendusse viimist IL-17A/F-vastase antikehaga ning (b) testitavas proovis antikeha ja IL-17A/F-polüpeptiidi vahelise kompleksi moodustumise tuvastamist; kusjuures nimetatud kompleks näitab nimetatud haiguse esinemist või puudumist. Tuvastamine on kvantitatiivne ning see teostatakse võrdlevalt,

jälgides kompleksi moodustumist tuntud sama tüüpi normaalse koe rakkude kontrollproovis. Testitavas proovis moodustuvate komplekside suurem kogus näitab immuunhaiguse esinemist või puudumist imetajal, kellelt testitavad koerakud võeti. Eelistatavalt on antikehal tuvastatav märgis. Kompleksi moodustumist võib jälgida näiteks valgusmikroskoopia, voolutsütomeetria, fluorimeetria või muude tehnika tasemes tuntud meetoditega. Harilikult võetakse testitav proov individilt, kellel kahtlustatakse immuunsüsteemi puudulikkust või ebanormaalsust.

(0030) Veel ühes teostuses pakutakse leiutises IL-17A/F-polüpeptiidi proovis esinemise määramise meetodit, mis hõlmab rakkude testitava proovi, mis arvatakse sisaldavat IL-17A/F-polüpeptiidi, eksponeerimist IL-17A/F-vastasele antikehale ning nimetatud antikeha nimetatud rakuprooviga seondumise määramist. Eelistatavalt sisaldab proov rakku, mis arvatakse sisaldavat IL-17A/F-polüpeptiidi, ning antikeha seondub rakuga. Antikeha on eelistatavalt märgistatud ja/või seotud tahkele toendile.

(0031) Veel ühes teostuses võib leiutis käsitleda immuunseoselise haiguse diagnoosikomplekti, mis sisaldab sobivalt pakituna IL-17A/F-vastast antikeha ja kandjat. Eelistatavalt sisaldab komplekt juhiseid antikeha kasutamiseks IL-17A/F-polüpeptiidi esinemise tuvastamiseks. Eelistatavalt on kandja farmatseutiliselt vastuvõetav.

(0032) Veel ühes teostuses võib leiutis käsitleda diagnoosikomplekti, mis sisaldab sobivalt pakituna IL-17A/F-vastast antikeha. Eelistatavalt sisaldab komplekt juhiseid IL-17A/F-polüpeptiidi tuvastamiseks.

(0033) Veel ühes teostuses käsitleb leiutis imetajal immuunseoselise haiguse diagnoosimise meetodit, mis hõlmab IL-17A/F-polüpeptiidi esinemise või puudumise tuvastamist koerakkude testitavas proovis, mis saadakse nimetatud imetajalt, kusjuures IL-17A/F-polüpeptiidi esinemine või puudumine nimetatud testitavas proovis näitab immuunseoselise haiguse esinemist nimetatud imetajal.

(0034) Veel ühes teostuses käsitleb leiutis IL-17A/F-polüpeptiidi agonisti identifitseerimise meetodit, mis hõlmab:

- (a) rakkude ühendusse viimist skriinitava testitava ühendiga tingimustes, mis on sobiv rakulise vastuse, mis harilikult indutseeritakse IL-17A/F-polüpeptiidiga, indutseerimiseks; ning

(b) nimetatud rakulise vastuse määramist, et määrata, kas testitav ühend on tõhus agonist, kusjuures nimetatud rakulise vastuse indutseerimine näitab, et nimetatud testitav ühend on tõhus agonist.

(0035) Veel ühes teostuses käsitleb leiutis ühendi, mis on võimeline inhibeerima IL-17A/F-polüpeptiidi aktiivsust, identifitseerimise meetodit, mis hõlmab kandidaatühendi ühendusse viimist IL-17A/F-polüpeptiidiga tingimustes ja aja jooksul, mis on piisavad, et võimaldada nende kahe koostisosa vastasmõju, ning määramist, kas IL-17A/F-polüpeptiidi aktiivsust inhibeeritakse. Eelistatavalt on kandidaatühend või IL-17A/F-polüpeptiid immobiliseeritud tahkele toendile. Eelistavalt on immobiliseerimata koostisosal tuvastatav märgis. Eelistatavalt hõlmab meetod järgmisi etappe:

- (a) rakkude ja skriinitava testitava ühendi ühendusse viimine IL-17A/F-polüpeptiidi juuresolekul tingimustes, mis on sobivad rakulise vastuse indutseerimiseks, mis harilikult indutseeritakse IL-17A/F-polüpeptiidiga, ning
- (b) nimetatud rakulise vastuse indutseerimise tuvastamine, et määrata, kas testitav ühend on tõhus antagonist.

(0036) Veel ühes teostuses pakutakse leiutises ühendit, mis inhibeerib IL-17A/F-polüpeptiidi ekspressiooni rakkudes, mis tavapärastel ekspresseerivad seda polüpeptiidi, identifitseerimise meetodit, kusjuures see meetod hõlmab rakkude ühendusse viimist testitava ühendiga ning määramist, kas IL-17A/F-polüpeptiidi ekspressiooni inhibeeritakse. Eelistatavalt hõlmab meetod järgmisi etappe:

- (a) rakkude ja skriinitava testitava ühendi ühendusse viimine IL-17A/F-polüpeptiidi juuresolekul tingimustes, mis on sobivad IL-17A/F-polüpeptiidi ekspresseerumiseks, ning
- (b) nimetatud polüpeptiidi ekspressiooni inhibeerimise määramine.

(0037) Veel ühes teostuses käsitleb leiutis immuunseoselise haigusega imetajal selle immuunseoselise haiguse ravimise meetodit, mis hõlmab (a) IL-17A/F-polüpeptiidi kodeeriva või (b) IL-17A/F-polüpeptiidi antagonist-antikeha kodeeriva nukleiinhappemolekuli, nagu on määratletud patendinõudluses, manustamist imetajale. Eelistatavas teostuses on see imetaja

inimene. Veel ühes eelistatavas teostuses manustatakse nukleiinhapet *in vivo* geeniraviga. Eelistatavas lisateostuses sisaldub nukleiinhape vektoris, enam eelistatavalt adenoviirus-, adenoseoselise viiruse, lentiviirus-, või retroviirusvektoris.

(0038) Leiutises võib pakkuda rekombinantset viirusosakest, mis sisaldab olemuslikult promootorit, (a) IL-17A/F-polüpeptiidi või (b) IL-17A/F-polüpeptiidi vastast antagonist-antikeha, nagu on määratletud patendinõudluses, kodeerivat nukleiinhapet ning signaaljärjestust polüpeptiidi sekreteerimiseks rakust, kusjuures viirusvektor on seotud viiruse struktuursete valkudega. Eelistatavalt pärineb signaaljärjestus imetajalt, nagu on selline, mis pärineb naatiivsest IL-17A/F-polüpeptiidist.

(0039) Veel ühes lisateostuses võib leiutis käsitleda *ex vivo* tootmiseks mõeldud rakku, mis sisaldab retroviiruse struktuurset valke ekspresseerivat nukleiinhappekonstruktsiooni, ning mis sisaldab ka olemuslikult promootorit, (a) IL-17A/F-polüpeptiidi või (b) IL-17A/F-polüpeptiidi vastast antagonist-antikeha, nagu on määratletud patendinõudluses, kodeerivast nukleiinhapest ning polüpeptiidi rakust sekreteerimiseks signaaljärjestusest koosnevat retroviirusvektorit, kusjuures nimetatud tootev rakk pakib retroviirusvektori, seostades selle rekombinantsete retroviirusosakeste tootmiseks struktuursete valkudega.

(0040) Siin kirjeldatakse imetajas põletikuga seotud rakkude veresoonkonnast koesse infiltreerumise võimendamise meetodit, mis hõlmab (a) IL-17A/F-polüpeptiidi või (b) IL-17A/F-polüpeptiidi agonist-antikeha manustamist nimetatud imetajale, kusjuures imetajas võimendub põletikuga seotud rakkude veresoonkonnast koesse infiltreerumine.

(0041) Veel ühes lisateostuses käsitleb leiutis imetajal põletikuga seotud rakkude veresoonkonnast koesse infiltreerumise vähendamise meetodit, mis hõlmab (a) IL-17A/F-polüpeptiidi või (b) IL-17A/F-polüpeptiidi antagonist-antikeha, nagu on määratletud patendinõudluses, manustamist nimetatud imetajale, kusjuures imetajal väheneb põletikuga seotud rakkude veresoonkonnast koesse infiltreerumine.

(0042) Siin kirjeldatakse imetajal T-lümfotsüütide aktiivsuse suurendamise meetodit, mis hõlmab (a) IL-17A/F-polüpeptiidi või (b) IL-17A/F-polüpeptiidi agonisti manustamist nimetatud imetajale, kusjuures imetajal suureneb T-lümfotsüütide aktiivsus.

(0043) Veel ühes lisateostuses võib leiutis käsitleda imetajal T-lümfotsüütide aktiivsuse vähendamise meetodit, mis hõlmab (a) IL-17A/F-polüpeptiidi või (b) IL-17A/F-polüpeptiidi antagonist-antikeha, nagu on määratletud patendinõudluses, manustamist nimetatud imetajale, kusjuures imetajal väheneb T-lümfotsüütide aktiivsus.

(0044) Siin kirjeldatakse imetajal T-lümfotsüütide proliferatsioonise suurendamise meetodit, mis hõlmab (a) IL-17A/F-polüpeptiidi või (b) IL-17A/F-polüpeptiidi agonisti manustamist nimetatud imetajale, kusjuures imetajal suureneb T-lümfotsüütide proliferatsioonise.

(0045) Veel ühes lisateostuses käsitleb leiutis imetajal T-lümfotsüütide proliferatsioonise vähendamise meetodit, mis hõlmab (a) IL-17A/F-polüpeptiidi või (b) IL-17A/F-polüpeptiidi antagonist-antikeha, nagu on määratletud patendiõudluses, manustamist nimetatud imetajale, kusjuures imetajal väheneb T-lümfotsüütide proliferatsioonise.

(0046) Veel ühes lisateostuses käsitleb leiutis IL-17A/F-polüpeptiidi või selle agonist- või antagonist-antikeha, nagu on määratletud patendiõudluses, või IL-17A/F-vastase antikeha kasutamist ravimi valmistamiseks IL-17A/F-polüpeptiidile või selle antagonistile (näiteks IL-17A/F-vastasele antikehale) reageeriva seisundi ravimiseks. Leiutis võib käsitleda IL-17A/F-polüpeptiidi või selle antagonist-antikeha, nagu on määratletud patendiõudluses, kasutamist degeneratiivse kõhrehäire ravimise meetodis.

(0047) Veel ühes lisateostuses käsitleb leiutis imetajal degeneratiivse kõhrehäire ravimise meetodit, mis hõlmab IL-17A/F-polüpeptiidi või selle antagonist-antikeha, nagu on määratletud patendiõudluses, ravivalt toimiva koguse manustamist nimetatud imetajale, kellel on nimetatud häire.

(0048) Veel ühes lisateostuses käsitleb leiutis komplekti, mis sisaldab IL-17A/F-polüpeptiidi või selle antagonist-antikeha, nagu on määratletud patendiõudluses, segatuna farmatseutiliselt vastuvõetava kandjaga, nimetatud kompositsiooni sisaldavat mahutit ning nimetatud mahutile kinnitatud etiketti, millel näidatakse nimetatud kompositsiooni kasutamist degeneratiivse kõhrehäire ravis.

B. Lisanduvad teostused

(0049) Käesoleva leiutise muudes teostustes pakutakse leiutises eraldatud nukleiinhappemolekuli, mis sisaldab IL-17A/F-polüpeptiidi kodeerivat nukleiinhapet.

(0050) Ühe eripära kohaselt sisaldab eraldatud nukleiinhappemolekul nukleotiidjärjestust, millel on vähemalt umbes 80% nukleiinhappejärjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 81% nukleiinhappejärjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 82% nukleiinhappejärjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 83% nukleiinhappejärjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 84% nukleiinhappejärjestuse samasus, alternatiivselt vä-

hemalt umbes 85% nukleiinhappejärjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 86% nukleiinhappejärjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 87% nukleiinhappejärjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 88% nukleiinhappejärjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 89% nukleiinhappejärjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 90% nukleiinhappejärjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 91% nukleiinhappejärjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 92% nukleiinhappejärjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 93% nukleiinhappejärjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 94% nukleiinhappejärjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 95% nukleiinhappejärjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 96% nukleiinhappejärjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 97% nukleiinhappejärjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 98% nukleiinhappejärjestuse samasus ning alternatiivselt vähemalt umbes 99% nukleiinhappejärjestuse samasus (a) IL-17A/F-polüpeptiidi kodeeriva DNA-molekuliga, nagu on määratletud patendinõudluses.

(0051) Siin kirjeldatakse eraldatud nukleiinhappemolekuli, mis sisaldab nukleotiidjärjestust, millel on vähemalt umbes 80% nukleiinhappejärjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 82% nukleiinhappejärjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 83% nukleiinhappejärjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 84% nukleiinhappejärjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 85% nukleiinhappejärjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 86% nukleiinhappejärjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 87% nukleiinhappejärjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 88% nukleiinhappejärjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 89% nukleiinhappejärjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 90% nukleiinhappejärjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 91% nukleiinhappejärjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 92% nukleiinhappejärjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 93% nukleiinhappejärjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 94% nukleiinhappejärjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 95% nukleiinhappejärjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 96% nukleiinhappejärjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 97% nukleiinhappejärjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 98% nukleiinhappejärjestuse samasus ning alternatiivselt vähemalt umbes 99% nukleiinhappejärjestuse samasus (a) DNA-molekuliga, mis sisaldab siin avaldatud täispikka IL-17A/F-polüpeptiidi cDNA kodeerivat järjestust, siin avaldatud IL-17A/F-polüpeptiidi, millel puudub signaalpeptiid, kodeerivat järjestust või täispika aminohapete järjestuse

mistahes muu, spetsiifiliselt määratletud siin avaldatud fragmendi kodeerivat järjestust; või (b) DNA-molekulile (a) komplementaarse järjestusega.

(0052) Siin kirjeldatakse eraldatud nukleiinhappemolekuli, mis sisaldab nukleotiidjärjestust, millel on vähemalt umbes 80% nukleiinhappejärjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 81% nukleiinhappejärjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 82% nukleiinhappejärjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 83% nukleiinhappejärjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 84% nukleiinhappejärjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 85% nukleiinhappejärjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 86% nukleiinhappejärjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 87% nukleiinhappejärjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 88% nukleiinhappejärjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 89% nukleiinhappejärjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 90% nukleiinhappejärjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 91% nukleiinhappejärjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 92% nukleiinhappejärjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 93% nukleiinhappejärjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 94% nukleiinhappejärjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 95% nukleiinhappejärjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 96% nukleiinhappejärjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 97% nukleiinhappejärjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 98% nukleiinhappejärjestuse samasus ning alternatiivselt vähemalt umbes 99% nukleiinhappejärjestuse samasus (a) DNA-molekuliga, mis kodeerib seda küpset polüpeptiidi, mida kodeeritakse inimese mistahes valgu cDNA-ga, mida hoiustatakse ATCC-s, nagu on siin avaldatud; või (b) DNA-molekulile (a) komplementaarse järjestusega.

(0053) Siin kirjeldatakse IL-17A/F-polüpeptiidi kodeeriva järjestuse fragmente või nendega komplementaarseid järjestusi, mida võib kasutada näiteks hübriidiseerimissondidena, IL-17A/F-polüpeptiidi fragmentide kodeerimiseks, kodeerides valikuliselt IL-17A/F-vastase antikeha seondumiskohta sisaldavat polüpeptiidi, või antisenss-oligonukleotiidsondidena. Sellised nukleiinhappefragmendid on tavaliselt vähemalt 20 nukleotiidi pikad, alternatiivselt vähemalt umbes 30 nukleotiidi pikad, alternatiivselt vähemalt umbes 40 nukleotiidi pikad, alternatiivselt vähemalt umbes 50 nukleotiidi pikad, alternatiivselt vähemalt umbes 60 nukleotiidi pikad, alternatiivselt vähemalt umbes 70 nukleotiidi pikad, alternatiivselt vähemalt umbes 80 nukleotiidi pikad, alternatiivselt vähemalt umbes 90 nukleotiidi pikad, alternatiivselt vähemalt umbes 100 nukleotiidi pikad, alternatiivselt vähemalt umbes 110 nukleotiidi pikad, alternatiivselt vähemalt umbes 120 nukleotiidi pikad, alternatiivselt vähemalt umbes

130 nukleotiidi pikad, alternatiivselt vähemalt umbes 140 nukleotiidi pikad, alternatiivselt vähemalt umbes 150 nukleotiidi pikad, alternatiivselt vähemalt umbes 160 nukleotiidi pikad, alternatiivselt vähemalt umbes 170 nukleotiidi pikad, alternatiivselt vähemalt umbes 180 nukleotiidi pikad, alternatiivselt vähemalt umbes 190 nukleotiidi pikad, alternatiivselt vähemalt umbes 200 nukleotiidi pikad, alternatiivselt vähemalt umbes 250 nukleotiidi pikad, alternatiivselt vähemalt umbes 300 nukleotiidi pikad, alternatiivselt vähemalt umbes 350 nukleotiidi pikad, alternatiivselt vähemalt umbes 400 nukleotiidi pikad, alternatiivselt vähemalt umbes 450 nukleotiidi pikad, alternatiivselt vähemalt umbes 500 nukleotiidi pikad, alternatiivselt vähemalt umbes 600 nukleotiidi pikad, alternatiivselt vähemalt umbes 700 nukleotiidi pikad, alternatiivselt vähemalt umbes 800 nukleotiidi pikad, alternatiivselt vähemalt umbes 900 nukleotiidi pikad ning alternatiivselt vähemalt umbes 1000 nukleotiidi pikad, kusjuures selles kontekstis tähendab mõiste “umbes”, et nimetatud nukleotiidjärjestuse pikkus on pluss või miinus 10% nimetatud pikkusest. Olgu märgitud, et IL-17A/F-polüpeptiidi kodeeriva nukleotiidjärjestuse uudseid fragmente võib kindlaks määrata tavapärasel viisil, joondades IL-17A/F-polüpeptiidi kodeeriva nukleotiidjärjestuse muu tuntud nukleotiidjärjestusega, kasutades millist tahes paljudest hästi tuntud programmidest järjestuse joondamiseks ning määrates kindlaks, milline polüpeptiidi kodeeriv nukleotiidjärjestuse fragment (fragmentid) on uudne (uudsed). Siin peetakse võimalikuks kõiki selliseid nukleotiidjärjestusi, mis kodeerivad polüpeptiide. Samuti peetakse võimalikuks nende nukleiinhappemolekuli fragmentidega kodeeritavaid polüpeptiidi fragmente, eelistatavalt neid IL-17A/F-polüpeptiidi fragmente, mis sisaldavad IL-17A/F-vastase antikeha seondumiskohta.

(0054) Siin kirjeldatakse ka eraldatud IL-17A/F-polüpeptiidi, mida kodeeritakse mistahes eraldatud nukleiinhappejärjestustega, mis on identifitseeritud siin eespool.

(0055) Kindla eripära kohaselt käsitleb leiutis eraldatud IL-17A/F-polüpeptiidi, mis sisaldab aminohapete järjestust, millel on vähemalt umbes 80% aminohapete järjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 81% aminohapete järjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 82% aminohapete järjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 83% aminohapete järjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 84% aminohapete järjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 85% aminohapete järjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 86% aminohapete järjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 87% aminohapete järjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 88% aminohapete järjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 89% aminohapete järjestuse samasus, alternatiivselt

vähemalt umbes 90% aminohapete järjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 91% aminohapete järjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 92% aminohapete järjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 93% aminohapete järjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 94% aminohapete järjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 95% aminohapete järjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 96% aminohapete järjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 97% aminohapete järjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 98% aminohapete järjestuse samasus ning alternatiivselt vähemalt umbes 99% aminohapete järjestuse samasus IL-17A/F-ga, millel on täispikk aminohapete järjestus, nagu on määratletud patendiõudluses.

(0056) Siin kirjeldatakse eraldatud IL-17A/F-polüpeptiidi, mis sisaldab aminohapete järjestust, millel on vähemalt 80% aminohapete järjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 81% aminohapete järjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 82% aminohapete järjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 83% aminohapete järjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 84% aminohapete järjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 85% aminohapete järjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 86% aminohapete järjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 87% aminohapete järjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 88% aminohapete järjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 89% aminohapete järjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 90% aminohapete järjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 91% aminohapete järjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 92% aminohapete järjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 93% aminohapete järjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 94% aminohapete järjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 95% aminohapete järjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 96% aminohapete järjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 97% aminohapete järjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 98% aminohapete järjestuse samasus ning alternatiivselt vähemalt umbes 99% aminohapete järjestuse samasus aminohapete järjestusega, mida kodeeritakse inimese mistahes valgu cDNA-ga, mida hoiustatakse ATCC-s, nagu on siin avaldatud.

(0057) Siin kirjeldatakse ka eraldatud IL-17A/F-polüpeptiidi, mis sisaldab aminohapete järjestust, mis annab vähemalt umbes 80% positiivse, alternatiivselt vähemalt umbes 81% positiivse, alternatiivselt vähemalt umbes 82% positiivse, alternatiivselt vähemalt umbes 83% positiivse, alternatiivselt vähemalt umbes 84% positiivse, alternatiivselt vähemalt umbes 85% positiivse, alternatiivselt vähemalt umbes 86% positiivse, alternatiivselt vähemalt umbes 87%

positiivse, alternatiivselt vähemalt umbes 88% positiivse, alternatiivselt vähemalt umbes 89% positiivse, alternatiivselt vähemalt umbes 90% positiivse, alternatiivselt vähemalt umbes 91% positiivse, alternatiivselt vähemalt umbes 92% positiivse, alternatiivselt vähemalt umbes 93% positiivse, alternatiivselt vähemalt umbes 94% positiivse, alternatiivselt vähemalt umbes 95% positiivse, alternatiivselt vähemalt umbes 96% positiivse, alternatiivselt vähemalt umbes 97% positiivse, alternatiivselt vähemalt umbes 98% positiivse ning alternatiivselt vähemalt umbes 99% positiivse skoori, kui võrreldakse siin avaldatud täispika aminohapete järjestusega IL-17A/F-polüpeptiidiga, siin avaldatud aminohapete järjestusega, millel puudub signaalpeptiid, või täispika aminohapete järjestuse mistahes muu spetsiifiliselt määratletud fragmendiga, mis siin on avaldatud.

(0058) Spetsiifilise eripära kohaselt pakutakse leiutises eraldatud IL-17A/F-polüpeptiidi, millel pole N-terminaalset signaaljärjestust ja/või algus-metioniini ning mida kodeeritakse nukleiinhappejärjestusega, mis kodeerib sellist aminohapete järjestust, nagu siin eespool on kirjeldatud. Siin on samuti kirjeldatud toiminguid selle polüpeptiidi tootmiseks, kusjuures need toimingud hõlmavad sobivat kodeerivat nukleiinhappemolekuli sisaldavat vektorit sisaldava peremeesraku kultiveerimist IL-17A/F-polüpeptiidi ekspresseerimiseks sobivates tingimustes ning IL-17A/F-polüpeptiidi kogumist rakukultuurist.

(0059) Veel ühes teostuses käsitleb leiutis natiivse IL-17A/F-polüpeptiidi antagonist-antikehasid, nagu on määratletud patendinõudluses.

(0060) Lisateostuses käsitleb leiutis IL-17A/F-polüpeptiidi agonistide või antagonistide identifitseerimise meetodit, mis hõlmab IL-17A/F-polüpeptiidi ühendusse viimist kandidaatmolekuliga ning nimetatud IL-17A/F-polüpeptiidiga vahendatava bioloogilise aktiivsuse jälgimist. Eelistatavalt on see IL-17A/F-polüpeptiid natiivne IL-17A/F-polüpeptiid.

(0061) Veel ühes lisateostuses käsitleb leiutis ainekompositsiooni, mis sisaldab IL-17A/F-polüpeptiidi või IL-17A/F-polüpeptiidi antagonist-antikeha, nagu on määratletud patendinõudluses, kombineerituna kandjaga. Valikuliselt on see kandja farmatseutiliselt vastuvõetav kandja.

(0062) Käesoleva leiutise veel üks teostus käsitleb IL-17A/F-polüpeptiidi või selle antagonist-antikeha, nagu on määratletud patendinõudluses, kasutamist ravimi valmistamiseks IL-17A/F-polüpeptiidile või selle antagonistile reageeriva seisundi ravimiseks.

(0063) Käesoleva leiutise lisateostustes pakutakse mistahes siin kirjeldatud polüpeptiide kodeerivat DNA-d sisaldavaid vektoreid. Samuti pakutakse sellist vektorit sisaldavat pere-

meesrakku. Näiteks võivad peremeesrakud olla CHO-rakud, *E. coli* rakud, pärmirakud või bakuloviirusega nakatatud putukarakud. Lisaks pakutakse mistahes siin kirjeldatud polüpeptiidi tootmise toimingut, mis hõlmab peremeesrakkude kultiveerimist soovitud polüpeptiidi ekspresseerimiseks sobivates tingimustes ning soovitud polüpeptiidi kogumist rakukultuurist.

(0064) Veel ühes teostuses pakutakse leiutisega kimäärseid molekule, mis sisaldavad siin kirjeldatud polüpeptiide, mis on liidetud heteroloogse polüpeptiidi või aminohapete järjestusega. Selliste kimäärsete molekulide näited hõlmavad mistahes siin kirjeldatud polüpeptiide, mis on liidetud epitoobi märgis-järjestuse või immunoglobuliini Fc-piirkonnaga.

(0065) Veel ühes teostuses pakutakse leiutises patendinõudluses määratletud antikeha, mis seondub spetsiifiliselt mistahes IL-17A/F-polüpeptiididega, mida on kirjeldatud ees- või allpool. Valikuliselt on see antikeha monokloonne antikeha, humaniseeritud antikeha, antikeha fragment või üheaahelaline antikeha.

(0066) Muudes teostustes pakutakse leiutises veel oligonukleotiidsonde, mis on kasutatavad genoomsete ja cDNA-nukleotiidjärjestuste eraldamiseks või antisenss-sondidena, kusjuures need sondid võivad pärineda mistahes eespool kirjeldatud nukleotiidjärjestustest.

JOONISTE LÜHIKIRJELDUS

(0067)

Joonisel 1 on näidatud inimese uudse tsütokiini IL-17A/F ekspresseerimine ja eraldamine. Inimese 293-neerurakud transfekteeriti inimese IL-17 ja IL-17F kodeerivate cDNA-de ekspressioonivektoritega eraldi või nende kombinatsiooniga, nagu on näidatud joonistel 1A ja 1B. Transfekteeritud rakkudelt pärinev konditsioneeritud keskkond immuunsadestati (IS), kasutades antikehasid, millel on võime tunda ära IL-17 (rajad 1-5) või IL-17F-i (rajad 6-10), nagu on näidatud joonistel 1A ja 1B. Näidatud on *Western blot* analüüs, mis näitab dimeer-kompleksi IL-17A/F esinemist joonise 1A rajal 8 ja joonise 1B rajal 3. Dimeer-kompleksi IL-17A/F suurus on kooskõlas kovalentse heterodimeeri liigiga, mis sisaldab ühte IL-17 polüpeptiidahelat ja ühte IL-17F polüpeptiidahelat.

Joonisel 2 on näidatud rekombinantse IL-17A/F-i puhastamine. Joonisel 2A on näidatud IL-17A/F-i esialgsest S-Sepharose-kolonnis fraktsioneerimisest pärinevate valgufraktsioonide hõbedaga värvitud SDS-PAGE geel. Fraktsioonid 31 ja 32 sisaldavad valku, mille umbes 33 kD suurune näiv molekulmass vastab IL-17A/F-le. Joonisel 2B on näidatud IL-17A/F-i

lisapuhastuse, milleks kasutati kromatograafiat Vydac C4 kolonniga, tulemused. Näidatud on elueeritud valkude kromatogramm, mõõdetuna 214 nm ja 280 nm juures. Joonisel 2C on näidatud, et puhastamiskolonnist Vydac C4 pärineva puhastatud valgu IL-17A/F fraktsioonid indutseerivad IL-8 tootmise TK-10 rakkudes.

Joonisel 3 on näidatud IL-17A/F-i aminohapete järjestuse analüüsi tulemused. Joonisel 3A on näidatud puhastatud IL-17A/F-i analüüs mitteredutseerivas SDS-PAGE geelis. Lahutatud valk kanti üle PVDF-membraanile ja värviti Comassie Blue värviga. Molekulmassi markerite asendid on näidatud paremal pool. Joonisel 3B on näidatud eraldatud IL-17A/F-i N-terminaalse järjestuse analüüsi tulemused (joonisel 3A näidatud võõdi N-terminaalse järjestuse analüüsiga tuvastatud aminohappejäägid). Järjestuse analüüs toob välja kaks N-terminaalset järjestust (vastavalt on järjestus 1 tähistatud kui SEQ ID NO: 1 ja järjestus 2 on tähistatud kui SEQ ID NO: 2). Joonisel 3C on näidatud inimese IL-17 aminohapete järjestus (näidatud nii joonisel 3C kui joonisel 8 ning tähistatud kui SEQ ID NO: 3) ning inimese IL-17F-i aminohapete järjestus (näidatud nii joonisel 3C kui joonisel 10 ning tähistatud kui SEQ ID NO: 4). IL-17 ja IL-17F-i signaaljärjestused on alla joonitud. Järjestused, mis on identsed IL-17A/F-is esinevas kahes N-terminaalses peptiidjärjestuses (SEQ ID NO: 1 ja SEQ ID NO: 2), on näidatud IL-17- ja IL-17F-polüpeptiidjärjestuses poolpaksu kirjaga.

Joonisel 4 on näidatud IL-17A/F massispektromeetiline analüüs. Joonisel 4A on skemaatiliselt näidatud aminohapete järjestus koos heterodimeeri IL-17A/F (SEQ ID NO: 77) ahelatevahelise ja ahelasiseste disulfiidsidemetega. Disulfiidühendustesse kaasatud tsüsteiinid on tähistatud kuulikese (•) ja jäägi numbriga. Disulfiidsidemed on näidatud tsüsteiine ühendavate mustade joontega. Ahelatevahelisi disulfiidühendusi moodustavad disulfiidsidemed on esitatud poolpaksude mustade joontega. Joonisel 4B on skemaatiliselt näidatud IL-17A/F-i trüpsiiniga lõikamisel eeldatavalt tekkivad IL-17A/F-peptiidfragmentid nr 1 ja nr 2, mis sisaldavad IL-17-ahela ja IL-17F-ahela vahelisi disulfiidsidemeid (disulfiidsidemega IL-17A/F-fragment nr 1 on tähistatud kui SEQ ID NO: 7; disulfiidsidemega IL-17A/F-fragment nr 2 on tähistatud kui SEQ ID NO: 8). Neis fragmentides sisalduvad aminohapped on näidatud ja nummerdatud kummagi ahela algus-metioniini suhtes. Samuti on näidatud nende fragmentide, mida eeldatavalt võiks täheldada massispektromeetriga, arvutuslikud ligikaudsed molekulmassid. Joonisel 4C on näidatud IL-17A/F-i peptiidikaart, mis saadi maatriks-laser-desorptsiooni/ionisatsiooni lennuaja massispektromeetriaga (*matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry* - MALDI-TOF-iga). Saadud peptiidi-

kaardil on piigid $(M + H)^+ = 2420,12 \text{ Da}$ ja $3410,60 \text{ Da}$, mis vastavad disulfiidsidemega seotud peptiididele. Joonisel 4D on näidatud IL-17A/F redutseerimata proovide edasist isoleerimist vedelikukromatograafia-elektropihustusionisatsioonimassispekromeetriaga (*liquid-chromatography electrospray ionization ion trap mass spectrometry* - LC-ESI-MS-ga). Ioonkromatogrammide esindavad (ülalt alla) kogu ioonkromatogrammi, disulfiidsidemega IL-17A/F-fragmendi nr 2 $(M+2H)^{2+}$ ja disulfiidsidemega IL-17A/F-fragmendi nr 1 $(M + 2H)^{3+}$ rekonstrueeritud ioonkromatogrammi (*reconstructed ion chromatogram* – RIC-i). Täheledatakse mõlemale heterodimeerile vastavaid piike, samas kui homodimeer-peptiidide eeldatavate masside kohal ei täheldatud keemilisest müra eristuvaid piike.

Joonisel 5A on näidatud annusest sõltuvad kõverad, kui võrreldi IL-17A/F, IL-17 ja IL-17F põletikku soodustavat vastust. Näidatud kontsentratsioonidega IL-17A/F, IL-17 ja IL-17F inkubeeriti TK-10 rakkudega 24 tundi. Näidati, et IL-17A/F-il on võimas IL-8 indutseeriv aktiivsus ning oluline aktiivsus ilmnes ka vähem kui nanomolaarsetel kontsentratsioonidel. Joonisel 5B on näidatud annusest sõltuvad kõverad, kui võrreldi IL-6 indutseerimist IL-17A/F, IL-17 ja IL-17F-ga. Näidatud kontsentratsioonidega IL-17A/F, IL-17 ja IL-17F inkubeeriti TK-10 rakkudega 24 tundi. TK-10 rakkude konditsioneeritud keskkond koguti ja analüüsiti IL-6-ELISA-ga.

Joonisel 6 on näidatud IL-17A/F-ga seonduvast Fab-ist pärineva raske ahela varieeruva ala piirkonna, mis sisaldab CDR-ide H1-H3, aminohapete järjestust. Näidatud on kolmekümne nelja (34) kloni (vastavalt järjestused (SEQ ID NO: 9 kuni SEQ ID NO: 42), mis kodeerivad antikeha raske ahela erinevaid järjestusi, mis on võimelised seonduma IL-17A/F-ga, aminohapete ennustatava järjestuse piirkonna joondus. Raske ahela kolm CDR-piirkonda (CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3) on viirutatud.

Joonisel 7 on näidatud IL-17 natiivse järjestusega cDNA nukleotiidjärjestus (SEQ ID NO: 5).

Joonisel 8 on näidatud aminohapete järjestus (SEQ ID NO: 3), mis on tuletatud joonisel 7 näidatud kodeerivast järjestusest SEQ ID NO: 5.

Joonisel 9 on näidatud IL-17F natiivse järjestusega cDNA nukleotiidjärjestus (SEQ ID NO: 6).

Joonisel 10 on näidatud aminohapete järjestus (SEQ ID NO: 4), mis on tuletatud joonisel 9 näidatud kodeerivast järjestusest SEQ ID NO: 6.

Joonisel 11 on näidatud inimese T-rakkudest, mis olid aktiveeritud CD3-vastase / CD28-vastase antikehaga, toodetud IL-17A/F-i ELISA mõõtmise tulemused.

Joonisel 12 on näidatud IL-17A/F-i ELISA mõõtmise spetsiifilisus, näidates, et kolm paralleelselt analüüsitud fraktsiooni, nr 31-33, sisaldasid ligikaudu võrdsetes kogustes IL-17A/F-i (kontrollidena kasutati IL-17A-d ja IL-17F-i).

EELISTATAVATE TEOSTUSTE ÜKSIKASJALIK KIRJELDUS

I Määratlused

(0068) “Natiivse järjestusega IL-17A/F-polüpeptiid” hõlmab polüpeptiidi, millel on sama aminohapete järjestus, kui vastaval loodusest pärineval IL-17A/F-polüpeptiidil. Selliseid natiivse järjestusega IL-17A/F-polüpeptiide võib eraldada loodusest või toota rekombinantsel või sünteetilisel viisil. Spetsiifiliselt hõlmab mõiste “natiivse järjestusega IL-17A/F-polüpeptiid” spetsiifilise IL-17A/F-polüpeptiidi looduslikult esinevaid kärbitud või sekreteeritud vorme (näiteks rakuvälise domeeni järjestust), looduslikult esinevaid variantseid vorme (näiteks alternatiivselt splaissitud vorme) ning selle polüpeptiidi looduslikult esinevaid alleelseid variante. Leiutise erinevates teostustes on siin avaldatud natiivse järjestusega IL-17A/F-polüpeptiidid küpsed või täispikad natiivse järjestusega polüpeptiidid, mis hõlmavad aminohapete täispikka järjestust, mis on näidatud kaasatud joonistel. Joonistel on start- ja stoppkoodonid näidatud poolpaksus kirjas ning need on alla joonitud. Kuigi kaasnevatel joonistel on näidatud, et avaldatud IL-17A/F-polüpeptiidid algavad metioniinijäägiga, mis siin on joonistel tähistatud kui aminohappe asend 1, on siiski mõeldav ja võimalik, et muid metioniinijäake, mis paiknevad joonistel olevast aminohappe asendist 1 üles- või allavoolu, võib kasutada IL-17A/F-polüpeptiidide start-aminohappejäägina.

(0069) Siin avaldatud erinevate IL-17A/F-polüpeptiidide “signaalpeptiidide” ligikaudne paiknemine on näidatud käesolevas kirjelduses ja/või kaasnevatel joonistel. Olgu siiski märgitud, et signaalpeptiidi C-terminaalne piir võib varieeruda, kuid kõige tõenäolisemalt mitte enam kui 5 aminohapet ükskõik kummas suunas signaalpeptiidi siin algselt määratletud C-terminaalsest piirist, sealjuures võib signaalpeptiidi C-terminaalse piiri identifitseerida vastavalt kriteeriumitele, mida tehnika tasemes rakendatakse rutiinselt aminohapete järjestuse sellist tüüpi elemendi identifitseerimiseks (näiteks Nielsen *et al.*, Prot. Eng., 10:1-6 (1997) ning von Heinje *et al.*, Nucl. Acids. Res., 14:4683-4690 (1986)). Lisaks tunnustatakse, et mõnel juhul pole sekreteeritavalt polüpeptiidilt signaaljärjestuse lõikamine täiesti ühetaoline, andes tule-

museks enam kui ühe sekreteeritud liigi. Käesoleva leiutise kohaselt peetakse võimalikuks neid küpseid polüpeptiide, milles signaalpeptiid on lõigatud mitte enam kui 5 aminohappe kauguselt ükskõik kummas suunas signaalpeptiidi siin algselt määratletud C-terminaalsest piirist, ning neid kodeerivad nukleiinhappeid.

(0070) “IL-17A/F-polüpeptiidi variant” tähendab aktiivset IL-17A/F-polüpeptiidi, nagu on määratletud ees- või allpool, millel on vähemalt umbes 80% aminohapete järjestuse samasus siin avaldatud täispika natiivse järjestusega IL-17A/F-polüpeptiidjärjestusega, siin avaldatud IL-17A/F-polüpeptiidjärjestusega, millel puudub signaalpeptiid, või täispika IL-17A/F-polüpeptiidjärjestuse mistahes muu siin avaldatud fragmendiga. Sellised IL-17A/F-polüpeptiidi variandid hõlmavad näiteks IL-17A/F-polüpeptiide, milles täispika natiivse aminohapete järjestuse N- või C-terminusse on lisatud või sellest on eemaldatud üks või enam aminohappejääki. Tavapäraselt on IL-17A/F-polüpeptiidi variandil vähemalt umbes 80% aminohapete järjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 82% aminohapete järjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 83% aminohapete järjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 84% aminohapete järjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 85% aminohapete järjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 86% aminohapete järjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 87% aminohapete järjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 88% aminohapete järjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 89% aminohapete järjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 90% aminohapete järjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 91% aminohapete järjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 92% aminohapete järjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 93% aminohapete järjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 94% aminohapete järjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 95% aminohapete järjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 96% aminohapete järjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 97% aminohapete järjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 98% aminohapete järjestuse samasus and alternatiivselt vähemalt umbes 99% aminohapete järjestuse samasus siin avaldatud täispika natiivse järjestusega IL-17A/F-polüpeptiidjärjestuse, siin avaldatud IL-17A/F-polüpeptiidjärjestusega, millel puudub signaalpeptiid, või täispika IL-17A/F-polüpeptiidjärjestuse mistahes muu siin avaldatud ja spetsiifiliselt määratletud fragmendiga. Harilikult on variantsed IL-17A/F-polüpeptiidid vähemalt umbes 10 aminohappe pikkused, alternatiivselt vähemalt umbes 20 aminohappe pikkused, alternatiivselt vähemalt umbes 30 aminohappe pikkused, alternatiivselt vähemalt umbes 40 aminohappe pikkused, alternatiivselt vähemalt

umbes 50 aminohappe pikkused, alternatiivselt vähemalt umbes 60 aminohappe pikkused, alternatiivselt vähemalt umbes 70 aminohappe pikkused, alternatiivselt vähemalt umbes 80 aminohappe pikkused, alternatiivselt vähemalt umbes 90 aminohappe pikkused, alternatiivselt vähemalt umbes 100 aminohappe pikkused, alternatiivselt vähemalt umbes 150 aminohappe pikkused, alternatiivselt vähemalt umbes 200 aminohappe pikkused, alternatiivselt vähemalt umbes 300 aminohappe pikkused või pikemad.

(0071) „Aminohapete järjestuse samasuse protsent (%)” siin identifitseeritud IL-17A/F polüpeptiidjärjestuse suhtes on määratletud kui aminohappe jääkide protsent kandidaatjärjestuses, mis pärast järjestuste joondamist ja vajadusel pärast tühikute sisestamist järjestuste maksimaalse samasuse protsendi saavutamiseks on samasugused aminohappejääkidega IL-17A/F-spetsiifilises polüpeptiidjärjestuses, võtmata järjestuse samasuse osana arvesse konservatiivseid asendusi. Joonduse aminohapete järjestuse samasuse protsendi määramiseks võib saada erinevatel tehnika tasemes tuntud viisidel, kasutades näiteks avalikult kättesaadavat arvutitarkvara, nagu BLAST, BLAST-2, ALIGN või Megalign (DNASTAR) tarkvara. Eriala asjatundja võib määrata joonduse mõõtmiseks sobivad parameetrid, sealhulgas mistahes algoritmi, mis on vajalik maksimaalse joonduse saavutamiseks võrrelduna täispikkade järjestuste ulatuses. Siiski on siinsetel eesmärkidel aminohapete järjestuste samasuse väärtused (%) tekitatud, kasutades järjestuse võrdluse arvutiprogrammi ALIGN-2, sealjuures on ALIGN-2 programmi lähtekood on esitatud allpool tabelis 1. ALIGN-2 järjestuse võrdluse arvutiprogrammi autoriõigus on kinnitatud firmale Genentech, Inc ning allpool tabelis 1 näidatud lähtekood koos kasutaja dokumentatsiooniga on sisse antud USA autoriõiguse ametis, Washington D. C., 20559, kus see on registreeritud USA autoriõiguse registreerimisnumbriga TXU510087. ALIGN-2 programm on avalikult kättesaadav firmast Genentech, Inc., South San Francisco, California või koostatav lähtekoodist, mida pakutakse allpool tabelis 1. ALIGN-2 programmi võiks koostada, kasutades operatsioonisüsteemi UNIX, eelistatavalt versiooni digital UNIX V4. 0D. Kõik järjestuse võrdlemise parameetrid on määratud ALIGN-2 programmiga ning ei varieeru.

(0072) Olukordades, kus ALIGN-2 rakendatakse aminohapete järjestuse võrdluseks, arvutatakse antud aminohapete järjestuse A aminohapete järjestuse samasus (%) antud aminohapete järjestuse B suhtes, sellega või selle vastu (mida võib alternatiivselt väljendada kui antud aminohapete järjestus A, millel on või mis hõlmab kindlat protsenti aminohapete järjestuse samasust antud aminohapete järjestuse B suhtes, sellega või selle vastu) järgnevalt:

$$100 \times \frac{X}{Y},$$

milles X on järjestuse joondamise programmiga ALIGN-2 identsete ühitatavustena arvestatud aminohappejääkide arv A ja B joonduses selle programmiga ning Y on B-s olevate aminohappejääkide koguarv. On mõistetav, et kui aminohapete järjestuse A pikkus pole võrdne aminohapete järjestuse B pikkusega, pole A aminohapete järjestuse samasuse protsent B suhtes võrdne B aminohapete järjestuse samasuse protsendiga A suhtes. Aminohapete samasuse protsendi selle meetodiga arvutamiste näited on tabelis 2 ja 3, kus näidatakse, kuidas arvutatakse aminohapete järjestuse, mis on tähistatud kui „võrdlusvalk“, aminohapete järjestuse samasuse protsenti hüpoteetilise huvipakkuva valgu suhtes; „võrdlusvalk“ esindab polüpeptiidi aminohapete järjestust, mille suhtes huvipakkuvat polüpeptiidi võrreldakse, ning „X“, „Y“ ja „Z“ esindavad igaüks erinevaid hüpoteetilisi aminohappejääke.

(0073) Kuni pole spetsiifiliselt sätestatud teisiti, saadakse kõik siin kasutatavad aminohapete järjestuse samasuse protsentväärtused selliselt, nagu on kirjeldatud vahetult eelnevas lõigus ning kasutades arvutiprogrammi ALIGN-2. Siiski võib aminohapete järjestuse samasuse protsentväärtused saada ka selliselt, nagu kirjeldatakse allpool, ning kasutades arvutiprogrammi WU-BLAST-2 (Altschul *et al.*, *Methods in Enzymology* 266:460-480 (1996)). Enamus WU-BLAST-2 otsinguparameetritest on seatud vaikeväärtustele. Need, mis ei ole seatud vaikeväärtustele, see tähendab kohandatavad parameetrid, seatakse järgnevatele väärtustele: *overlap span* = 1, *overlap fraction* = 0,125, *word threshold* (T) = 11 ja *scoring matrix* = BLOSUM62. WU-BLAST-2 rakendamisel määratletakse aminohapete järjestuse samasuse protsent, jagades (a) WU-BLAST-2-ga määratud ühituvate identsete aminohappejääkide arvu, mis on natiivsest polüpeptiidist pärineva järjestusega huvipakkuva polüpeptiidi aminohapete järjestuses ning huvipakkuvas aminohapete võrdlusjärjestuses (st järjestuses, mille suhtes huvipakkuvat polüpeptiidi võrreldakse ning mis võib olla variantne IL-17A/F-polüpeptiid), (b) huvipakkuva polüpeptiidi aminohappejääkide koguarvuga. Näiteks väite „aminohapete järjestust A hõlmaval polüpeptiidil on vähemalt 80% aminohapete järjestuse samasus aminohapete järjestusega B” puhul on võrreldav aminohapete järjetus A huvipakkuva „võrdlusvalgu” aminohapete järjestus, ning aminohapete järjestus B on huvipakkuva polüpeptiidi aminohapete järjestus.

(0074) Samuti võib aminohapete järjestuse samasuse protsenti määrata, kasutades järjestuse võrdlemise programmi NCBI-BLAST2 (Altschul *et al.*, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 (1997)). Järjestuse võrdlemise programmi NCBI-BLAST2 võib alla laadida aadressilt <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> või saada muul viisil riiklikust tervishoiuinstituudist (National Institute of Health, Bethesda), MD. NCBI-BLAST2 kasutab mitmeid otsinguparameetreid, kusjuures kõik need otsinguparameetrid, seatakse vaikeväärtustele, mis hõlmavad näiteks järgnevaid: *unmask = yes, strand = all, expected occurrences = 10, minimum low complexity length = 15/5, multi-pass e-value = 0,01, constant for multi-pass = 25, dropoff for final gapped alignment = 25* ja *scoring matrix = BLOSUM62*.

(0075) Olukordades, mille puhul aminohapete järjestuse võrdlemiseks kasutatakse NCBI-BLAST2, arvutatakse antud aminohapete järjestuse A aminohapete hapete järjestuse samasuse protsent antud aminohapete järjestuse B suhtes, sellega või selle vastu (mida alternatiivselt võib väljendada kui antud aminohapete järjestust A, millel on või mis hõlmab kindlat aminohapete järjestuse samasuse protsenti antud aminohapete järjestuse B suhtes, sellega või selle vastu) järgnevalt:

$$100 \times \frac{X}{Y},$$

milles X on järjestuse joondamise programmiga NCBI-BLAST2 identsete ühitatavustena arvestatud aminohappejääkide arv A ja B joonduses selle programmiga ning Y on B-s olevate aminohappejääkide koguarv. On mõistetav, et kui aminohapete järjestuse A pikkus pole võrdne aminohapete järjestuse B pikkusega, pole A aminohapete järjestuse samasuse protsent B suhtes võrdne B aminohapete järjestuse samasusega protsendiga A suhtes.

(0076) “Variantne IL-17A/F-polünukleotiid” või “variantne IL-17A/F-nukleiinhappejärjestus” tähendab nukleiinhappemolekuli, mis kodeerib allpool määratletud IL-17A/F-polüpeptiidi ning millel on umbes 80% nukleiinhappe järjestuse samasus nukleiinhappe järjestusega, mis kodeerib siin avaldatud täispikka natiivse järjestusega IL-17A/F-polüpeptiidi, siin avaldatud täispikka natiivse järjestusega IL-17A/F-polüpeptiidi, millel puudub signaalpeptiid, või siin avaldatud täispikka natiivse järjestusega IL-17A/F-polüpeptiidi mistahes muud fragmenti. Harilikult on variantsel IL-17A/F-polünukleotiidil vähemalt umbes 80% nukleiinhappejärjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 81% nukleiinhappejärjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 82% nukleiinhappejärjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt

umbes 83% nukleinhappejärjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 84% nukleinhappejärjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 85% nukleinhappejärjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 86% nukleinhappejärjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 87% nukleinhappejärjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 88% nukleinhappejärjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 89% nukleinhappejärjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 90% nukleinhappejärjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 91% nukleinhappejärjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 92% nukleinhappejärjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 93% nukleinhappejärjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 94% nukleinhappejärjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 95% nukleinhappejärjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 96% nukleinhappejärjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 97% nukleinhappejärjestuse samasus, alternatiivselt vähemalt umbes 98% nukleinhappejärjestuse samasus ja alternatiivselt vähemalt umbes 99% nukleinhappejärjestuse samasus nukleinhappe järjestusega, mis kodeerib siin avaldatud täispikka natiivse järjestusega IL-17A/F-polüpeptiidi, siin avaldatud ja täispikka natiivse järjestusega IL-17A/F-polüpeptiidi, millel puudub signaalpeptiid, või siin avaldatud täispikka natiivse järjestusega IL-17A/F-polüpeptiidi mistahes fragmenti. Variandid ei hõlma natiivset nukleotiidjärjestust.

(0077) Harilikult on variantsed IL-17A/F-polünukleotiidid vähemalt umbes 30 nukleotiidi pikad, alternatiivselt vähemalt umbes 60 nukleotiidi pikad, alternatiivselt vähemalt umbes 90 nukleotiidi pikad, alternatiivselt vähemalt umbes 120 nukleotiidi pikad, alternatiivselt vähemalt umbes 150 nukleotiidi pikad, alternatiivselt vähemalt umbes 180 nukleotiidi pikad, alternatiivselt vähemalt umbes 210 nukleotiidi pikad, alternatiivselt vähemalt umbes 240 nukleotiidi pikad, alternatiivselt vähemalt umbes 270 nukleotiidi pikad, alternatiivselt vähemalt umbes 300 nukleotiidi pikad, alternatiivselt vähemalt umbes 450 nukleotiidi pikad, alternatiivselt vähemalt umbes 600 nukleotiidi pikad, alternatiivselt vähemalt umbes 900 nukleotiidi pikad või pikemad.

(0078) „Aminohapete järjestuse samasuse protsent (%)” IL-17A/F-i kodeeriva nukleinhappejärjestuse suhtes, mis siin on identifitseeritud, on määratletud kui nukleotiidide protsent kandidaatjärjestuses, mis pärast järjestuste joendamist ja vajadusel pärast tühikute sisestamist, et saavutada järjestuste samasuse maksimaalset protsenti, on identsed nukleotiididega IL-17A/F-i kodeerivas huvipakkavas järjestuses. Joonduse nukleotiidjärjestuse samasuse protsendi määramiseks võib saada erinevatel tehnika tasemes tuntud viisidel, kasutades näi-

teks avalikult kättesaadavat arvutitarkvara, nagu BLAST, BLAST-2, ALIGN või Megalign (DNASTAR). Siiski on siinsetel eesmärkidel nukleiinhappejärjestuste samasuse väärtused (%) tekitatud, kasutades järjestuse võrdlemise arvutiprogrammi ALIGN-2, kusjuures programmi ALIGN-2 lähtekoodi pakutakse tabelis 1 allpool. Järjestuse võrdlemise arvutiprogrammi ALIGN-2 autoriõigus on kinnitatud firmale Genentech, Inc ning selle lähtekood koos kasutaja dokumentatsiooniga on sisse antud USA autoriõiguse ametis, Washington D. C., 20559, kus see on registreeritud USA autoriõiguse registreerimisnumbriga TXU510087. ALIGN-2 programm on avalikult kättesaadav firmast Genentech, Inc., South San Francisco, California või koostatav lähtekoodist, mida pakutakse tabelis 1 allpool. ALIGN-2 programmi võiks koostada, kasutades operatsioonisüsteemi UNIX, eelistatavalt versiooni digital UNIX V4. 0D. Kõik järjestuse võrdlemise parameetrid on määratud ALIGN-2 programmiga ning ei varieeru.

(0079) Olukordades, mille puhul nukleiinhappejärjestuse võrdlemisteks rakendatakse ALIGN-2, arvutatakse antud nukleiinhappejärjestuse C aminohapete hapete järjestuse samasuse protsent antud nukleiinhappejärjestuse D suhtes, sellega või selle vastu (mida alternatiivselt võib väljendada kui antud aminohapete järjestust A, millel on või mis hõlmab kindlat nukleiinhappejärjestuse samasuse protsenti antud nukleiinhappejärjestuse B suhtes, sellega või selle vastu) järgnevalt:

$$100 \times \frac{W}{Z},$$

milles W on järjestuse joondamise programmiga ALIGN-2 identsete ühitatavustena arvestatud nukleotiidide arv C ja D joonduses selle programmiga ning Z on D-s olevate nukleotiidide koguarv. On mõistetav, et kui nukleiinhappejärjestuse C pikkus pole võrdne nukleiinhappejärjestuse D pikkusega, pole C nukleiinhappejärjestuse samasuse protsent D suhtes võrdne D nukleiinhappejärjestuse samasusega protsendiga C suhtes. Nukleiinhappejärjestuse samasuse protsendi arvutuste näidetena on tabelites 4 ja 5 näidatud, kuidas arvutada “võrdlus-DNA-na” tähistatud nukleiinhappejärjestuse nukleiinhappejärjestuse samasusega protsenti “IL-17A/F-i DNA-na” tähistatud nukleiinhappejärjestuse suhtes, kusjuures “IL-17A/F-i DNA” esindab hüpoteetilist huvipakkuvat nukleiinhappejärjestust ja “võrdlus-DNA” esindab nukleiinhappemolekuli, mille suhtes huvipakkuvat nukleiinhappemolekuli “IL-

17A/F-i DNA-d” võrreldakse, nukleiinhappejärjestust ning "N", "L" ja "V" esindavad igaüks erinevaid hüpoteetilisi nukleotiide.

(0080) Kuni pole spetsiifiliselt sätestatud teisiti, saadakse kõik siin kasutatavad nukleiinhappejärjestuse samasuse protsentväärtused selliselt, nagu on kirjeldatud vahetult eelnevas lõigus ning kasutades arvutiprogrammi ALIGN-2. Siiski võib nukleiinhappejärjestuse samasuse protsentväärtused saada ka selliselt, nagu kirjeldatakse allpool, ning kasutades arvutiprogrammi WU-BLAST-2 (Altschul *et al.*, *Methods in Enzymology* 266:460-480 (1996)). Enamus WU-BLAST-2 otsinguparameetritest on seatud vaikeväärtustele. Need, mis ei ole seatud vaikeväärtustele, see tähendab kohandatavad parameetrid, seatakse järgnevatele väärtustele: *overlap span* = 1, *overlap fraction* = 0,125, *word threshold* (T) = 11 ja *scoring matrix* = BLOSUM62. WU-BLAST-2 rakendamisel määratletakse nukleiinhappejärjestuse samasuse protsent, jagades (a) WU-BLAST-2-ga määratud ühituvate identsete nukleotiidide arvu, mis on IL-17A/F-polüpeptiidi kodeeriva huvipakkuva nukleiinhappemolekuli, mille järjestus pärineb natiivsest järjestusega IL-17A/F-polüpeptiidi kodeerivast nukleiinhapest, nukleiinhappejärjestuses ning huvipakkavas võrdlus-nukleiinhappemolekulis (st järjestuses, mille suhtes IL-17A/F-polüpeptiidi kodeerivat huvipakkuvat nukleiinhappemolekuli võrreldakse ning mis võib olla variantne IL-17A/F-polünukleotiid), (b) IL-17A/F-polüpeptiidi kodeeriva huvipakkuva nukleiinhappemolekuli nukleotiidide koguarvuga. Näiteks väite “nukleiinhappejärjestust A hõlmaval eraldatud nukleiinhappemolekulil on vähemalt 80% nukleiinhappejärjestuse samasus nukleiinhappejärjestusega B” puhul, on nukleiinhappejärjestus A huvipakkuv võrdlus-nukleiinhappemolekul ning nukleiinhappejärjestus B on IL-17A/F-polüpeptiidi kodeeriva huvipakkuva nukleiinhappemolekuli nukleiinhappejärjestus.

(0081) Samuti võib nukleiinhappejärjestuse samasuse protsendi määrata, kasutades järjestuse võrdlemise programmi NCBI-BLAST2 (Altschul *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-3402 (1997)). Järjestuse võrdlemise programmi NCBI-BLAST2 võib alla laadida aadressilt <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> või saada muul viisil riiklikust tervishoiuinstituudist (National Institute of Health, Bethesda), MD. NCBI-BLAST2 kasutab mitmeid otsinguparameetreid, kusjuures kõik need otsinguparameetrid, seatakse vaikeväärtustele, mis hõlmavad näiteks järgnevaid: *unmask* = yes, *strand* = all, *expected occurrences* = 10, *minimum low complexity length* = 15/5, *multi-pass e-value* = 0,01, *constant for multi-pass* = 25, *dropoff for final gapped alignment* = 25 ja *scoring matrix* = BLOSUM62.

(0082) Olukordades, mille puhul järjestuse võrdlemisteks rakendatakse NCBI-BLAST2, arvutatakse antud nukleiinhappejärjestuse C aminohapete hapete järjestuse samasuse protsent antud nukleiinhappejärjestuse D suhtes, sellega või selle vastu (mida alternatiivselt võib väljendada kui antud nukleiinhappejärjestust C, millel on või mis hõlmab kindlat nukleiinhappejärjestuse samasuse protsenti antud nukleiinhappejärjestuse D suhtes, sellega või selle vastu) järgnevalt:

$$100 \times \frac{W}{Z},$$

milles W on järjestuse joondamise programmiga NCBI-BLAST2 identsete ühitatavustena arvestatud nukleotiidide arv C ja D joonduses selle programmiga ning Z on D-s olevate nukleotiidide koguarv. On mõistetav, et kui nukleiinhappejärjestuse C pikkus pole võrdne nukleiinhappejärjestuse D pikkusega, pole C nukleiinhappejärjestuse samasuse protsent D suhtes võrdne D nukleiinhappejärjestuse samasusega protsendiga C suhtes.

(0083) Teistes teostustes on variantsed IL-17A/F-polünukleotiidid IL-17A/F-polüpeptiidi kodeerivad nukleiinhappemolekulid, mis on võimelised hübridiseeruma, eelistatavalt karmides hübridiseerimis- ja pesemistingimustes, siin avaldatud täispikka IL-17A/F-polüpeptiidi kodeerivate nukleotiidjärjestustega. Variantsed IL-17A/F-polüpeptiidid võivad olla sellised, mida kodeeritakse variantse IL-17A/F-polünukleotiidiga.

(0084) Siin avaldatud erinevate polüpeptiidide kirjeldamiseks kasutatuna tähendab “eraldatud”, et polüpeptiid on identifitseeritud ja lahutatud ja/või kogutud selle loodusliku keskkonna koostisosast. Selle loodusliku keskkonna saastavad koostisosad on ained, mis tüüpiliselt selle polüpeptiidi diagnostilisi või ravirakendusi häiriks, ning need hõlmavad ensüüme, hormone ning muid valgulisi ja mittevalgulisi lahustunud aineid. Eelistatavates teostustes puhastatakse polüpeptiid (1) määrani, mis on piisav, et saada vähemalt 15 N-terminaalse või sisemise aminohappejärgi järjestus, kasutades pöörlevate labadega sekvenaatorit, või (2) homogeensuseni SDS-PAGE analüüsis redutseerivates või mitteredutseerivates tingimustes, kasutades värvimist Coomassie Blue või eelistatavalt hõbedaga. Eraldatud polüpeptiid hõlmab polüpeptiidi rekombinantsetes rakkudes *in situ*, kuna vähemalt ühte IL-17A/F-polüpeptiidi loodusliku keskkonna koostisosa ei esine. Tavapäraselt valmistatakse eraldatud polüpeptiid siiski vähemalt ühe puhastamisetaapiga.

(0085) „Eraldatud“ nukleiinhappemolekul, mis kodeerib IL-17A/F-polüpeptiidi, on nukleiinhappemolekul, mis on identifitseeritud ja eraldatud vähemalt ühest saastavast nukleiinhappemolekulist, millega see on tavapäraselt seotud polüpeptiidi kodeeriva nukleiinhappe looduslikus allikas. Eraldatud nukleiinhappemolekul, mis kodeerib polüpeptiidi, on teistsuguses vormis või seades kui see, milles seda leidub looduses. Seega on eraldatud nukleiinhappemolekulid eristatavad looduslikes rakkudes olevatest spetsiifilistest nukleiinhappemolekulidest, mis kodeerivad polüpeptiidi. Siiski hõlmab eraldatud nukleiinhappemolekul, mis kodeerib polüpeptiidi, peptiidi kodeerivaid nukleiinhappemolekule, mis sisalduvad seda polüpeptiidi tavapäraselt ekspresseerivates rakkudes, kus nukleiinhappemolekul on näiteks teistsuguse kromosomaalse paiknemisega kui looduslikes rakkudes.

(0086) Mõiste „kontrolljärjestused“ tähistab DNA järjestusi, mis on vajalikud toimivalt ühendatud kodeeriva järjestuse ekspresseerimiseks konkreetses peremeesorganismis. Näiteks hõlmavad prokarüootidele sobivad kontrolljärjestused promootorit, vajadusel operaatorjärjestust, ning ribosoomi sidumiskohta. Eukarüootsete rakkude puhul on tuntud promootorite, polüadenüülimissignaali ja enhanserite kasutamine.

(0087) Nukleiinhape on „toimivalt ühendatud“ siis, kui see on paigutatud funktsionaalsesse suhtesse mõne teise nukleiinhappejärjestusega. Näiteks eeljärjestuse või sekreteerimisliidri DNA on polüpeptiidi DNA-ga toimivalt ühendatud siis, kui seda ekspresseeritakse eelvalguna, mis osaleb polüpeptiidi sekreteerimises, promootor või enhanser on toimivalt ühendatud kodeeriva järjestusega siis, kui see mõjutab järjestuse transkriptsiooni, või ribosoomi sidumiskoht on toimivalt ühendatud kodeeriva järjestusega siis, kui see paikneb sellisel, et hõlbustab translatsiooni. Üldiselt tähendab „toimivalt ühendatud“, et ühendatud DNA järjestused on külgnevad ning sekreteerimisliidri puhul on need külgnevad ja lugemisfaasis. Enhanserid ei pea siiski olema külgnevad. Ühendamine teostatakse näiteks ligeerimisega sobivates restrikteerimiskohtades. Kui selliseid kohti pole, kasutatakse kooskõlas tavapärase praktikaga sünteetilisi oligonukleotiidadapteereid või -linkereid.

(0088) Hübridiseerimisreaktsioonide „karmus“ on eriala asjatundja poolt hõlpsalt määratav ning üldiselt on see empiiriline arvestus, mis sõltub sondi pikkusest, pesemise temperatuurist ja soola kontsentratsioonist. Üldiselt vajavad pikemad sondid õigeks paardumiseks kõrgemaid temperatuure, samas kui lühemad sondid vajavad madalamaid temperatuure. Üldiselt sõltub hübridiseerimine denatureeritud DNA võimest taaspaarduda siis, kui komplementaarsed ahelad esinevad keskkonnas, mille temperatuur on allpool ahelate sulamistemperatuuri.

Mida suurem on soovitud homolooguse määr sondi ja hübridiseeritava järjestuse vahel, seda kõrgem on suhteline temperatuur, mida võib kasutada. Sellest järeldub, et kõrgematel suhtelistel temperatuuridel oleks kalduvus muuta reaktsioonitingimused karmimateks, samas kui madalamad temperatuurid vähendaks karmust. Hübridiseerimisreaktsioonide karmusesse puutuvaid lisa-üksikasju ja selgitusi vaadake teosest Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995).

(0089) Siin määratletuna võib “karme tingimusi” või “väga karme tingimusi” identifitseerida järgnevalt: (1) madala ioonse jõu ja kõrge temperatuuri rakendamine pesemiseks, näiteks 0,015 M naatriumkloriid / 0,0015 M naatriumtsitraat / 0,1% naatriumdodetsüülsulfaat 50 °C juures; (2) denatureeriva agensi nagu formamiid rakendamine hübridiseerimisel, näiteks 50% (mahtu mahu kohta) formamiid ja 0,1% veise seerumalbumiin / 0,1% Ficoll / 0,1% polüvinüülpirrolidoon / 50 mM naatriumfosfaatpuhver, pH 6,5, koos 750 mM naatriumkloriidi ja 75 mM naatriumtsitraadiga 42 °C juures; või (3) 50% formamiid, 5-kordne SSC (0,75 M NaCl, 0,075 M naatriumtsitraat), 50 mM naatriumfosfaat (pH 6,8), 0,1% naatriumpürofosfaat, 5-kordne Denhardti lahus, lõhe niisa sonikeeritud DNA (50 µg/ml), 0,1% SDS ja 10% dekstraansulfaat 42 °C juures pesemistega 42 °C juures 0,2-kordses SSC-s (naatriumkloriid/naatriumtsitraat) koos 50% formamiidiga 55 °C juures, millele järgneb väga karm pesemine EDTA-d sisaldavas 0,1-kordses SSC-s 55 °C juures.

(0090) “Mõõdukalt karmid tingimused” võib identifitseerida, nagu on kirjeldatud teoses Sambrook *et al.*, Molecular cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989, ning need hõlmavad pesemislahuse ja hübridiseerimistingimuste (näiteks temperatuuri, ioonse jõu ja SDS-i protsendi) kasutamist, mis on vähem karmid kui eespool kirjeldatud. Näiteks on mõõdukalt karmideks tingimusteks üle öö inkubeerimine 37 °C juures lahuses, mis sisaldab 20% formamiidi, 5-kordset SSC-d (150 mM NaCl, 15 mM trinaatriumtsitraat), 50 mM naatriumfosfaati (pH 7,6), 5-kordset Denhardti lahust, 10% dekstraansulfaati ja 20 mg/ml lõhe niisa sonikeeritud ja denatureeritud DNA-d, ning millele järgneb filtrite pesemine 1-kordses SSC-s umbes 37-50 °C juures. Eriala asjatundja teaks, kuidas vastavalt teguritele, nagu proovi pikkus ja muu taoline, on vaja kohandada temperatuuri, ioonset jõudu jne.

(0091) Siin kasutatuna tähendab mõiste “epitoomärgistatud” kimäärset polüpeptiidi, mis sisaldab IL-17A/F-polüpeptiidi, mis on liidetud “märgispolüpeptiidiga”. Märgispolüpeptiidil on piisavalt jääke, et pakkuda epitoopti, mille vastu võib teha antikeha, ning see on veel

piisavalt lühike, et mitte häirida polüpeptiidi, millega see on liidetud, aktiivsust. Samuti on määrgispolüpeptiid eelistatavalt küllaltki unikaalne, sest selle vastasel antikehal praktiliselt ei ole ristreaktsioone teiste epitoopidega. Üldiselt on sobivatel määrgispolüpeptiididel vähemalt kuus aminohappejääki ja tavaliselt on neil umbes 8 kuni 50 aminohappejääki (eelistatavalt umbes 10 kuni 20 aminohappejääki).

(0092) Siin kasutatuna tähistab mõiste “immunoadhesiin” antikehasarnaseid molekule, milles on kombineeritud heteroloogse valguga (adhesiini) seondumisspetsiifilisus immunoglobuliini konstantsete domeenide efektorfunktsioonidega. Struktuurselt hõlmavad immunoadhesiinid soovitud seondumisspetsiifilisusega, mis erineb antikeha antigeeni äratundvast antigeeniseotsest kohast (st see on “heteroloogne”), aminohapete järjestust ning immunoglobuliini konstantse domeeni järjestust. Tüüpiliselt on immunoadhesiinmolekuli adhesiinosas aminohapete pidev järjestus, mis hõlmab vähemalt retseptori või ligandi seondumiskohta. Immunoadhesiinis oleva immunoglobuliini konstantse domeeni võib saada mistahes immunoglobuliinist, nagu on alamtüübid IgG₁, IgG₂, IgG₃ või IgG₄, IgA (sealhulgas IgA₁ ja IgA₂), IgE, IgD või IgM.

(0093) Mõistet “antagonist” kasutatakse kõige laiemas tähenduses ning see hõlmab mistahes molekuli, mis osaliselt või täielikult tõkestab, inhibeerib või neutraliseerib siin avaldatud natiivse IL-17A/F-polüpeptiidi bioloogilist aktiivsust. Sarnasel viisil kasutatakse mõistet “agonist” kõige laiemas tähenduses ning see hõlmab mistahes molekuli, mis jäljendab siin avaldatud natiivse IL-17A/F-polüpeptiidi bioloogilist aktiivsust. Spetsiifiliselt hõlmavad sobivad agonist- või antagonistmolekulid agonist- või antagonist-antikehasid, antikeha fragmente, natiivsete IL-17A/F-polüpeptiidide fragmente või aminohapete järjestuse fragmente, peptiide, antisenss-oligonukleotiide, väikesi orgaanilisi molekule jne. IL-17A/F-polüpeptiidi agonistide ja antagonistide identifitseerimise meetodid võivad hõlmata IL-17A/F-polüpeptiidi ühendusse viimist kandidaat-agonistmolekuli või kandidaat-antagonistmolekuliga ning ühe või enama bioloogilise aktiivsuse, mis harilikult on seotud IL-17A/F-polüpeptiidiga, tuvastatava muutuse mõõtmist.

(0094) Mõiste "ravimine" tähendab nii ravitöötlust kui profülaktilisi või ennetavaid meetmeid, kusjuures eesmärk on hoida ära või aeglustada (vähendada) sihtmärgiks olevat patoloogilist seisundit või häiret. Ravi vajajad hõlmavad neid, kelle juba on häire ja lisaks neid, kellel on soodumus häirele, või neid, kellel hoitakse häiret ära.

(0095) “Krooniline” manustamine tähendab, vastupidiselt akuutsele viisile, agensi(te) manustamist pideval viisil, säilitades selliselt algse ravitoime (aktiivsuse) pikema aja jooksul. “Vahelduv” manustamine on ravi, mida ei tehta järjestikusest katkestuseta vaid olemuselt on see pigem tsükliline.

(0096) Ravi seisukohast tähendab "imetaja" mistahes looma, keda liigitakse imetajaks, hõlmates inimesi, kodu- ja farmiloomi ning loomaia-, spordis rakendatavaid või lemmikloomi, nagu koerad, hobused, kassid, veised, lambad, sead, kitsed, küülikud jne. Eelistatavalt on see imetaja inimene.

(0097) Manustamine “kombineerituna” ühe või enama lisa-raviagensiga hõlmab üheaegset (samaaegset) ja järjestikust manustamist mistahes järjekorras.

(0098) Siin kasutatuna hõlmavad “kandjad” farmatseutiliselt vastuvõetavaid kandjaid, abiaineid või stabilisaatoreid, mis kasutatavates annustes ja kontsentratsioonides pole toksilised rakule või imetajale, kellele need eksponeeritakse. Tihti on füsioloogiliselt vastuvõetav kandja pH-d puhverdav vesilahus. Füsioloogiliselt vastuvõetavate kandjate näited hõlmavad puhvreid, nagu fosfaat-, tsitraat- ja muude orgaaniliste hapete puhvrid, antioksüdante, sealhulgas askorbiinhapet, väikese molekuliga (vähem kui umbes 10 jääki) polüpeptiidi, valke, nagu seerumi albumiin, želatiin või immunoglobuliinid, hüdrofiilseid polümeere nagu polüvinüülpirrolidoon, aminohappeid, nagu glütsiin, glutamiin, asparagiin, arginiin või lüsiin, monosahhariide, disahhariide ja muid süsivesikuid, sealhulgas glükoosi, mannoosi või dekstriini, kelaativaid agenseid nagu EDTA, sukuralkohole, nagu mannitool või sorbitool, sooli moodustavaid vastasioone nagu naatrium, ning/või mitteioonseid surfaktante, nagu TWEEN™, polüetüleenglükool (PEG) ja PLURONICS™.

(0099) Mõistet “antikeha” kasutatakse kõige laiemas tähenduses ning spetsiifiliselt katab see näiteks üksikuid IL-17A/F-vastaseid monokloonseid antikehasid (sealhulgas agonist- antagonist- ja neutraliseerivaid antikehasid), IL-17A/F-vastase antikeha polüepitopse spetsiifilisusega kompositsioone, polükloonseid antikehasid, IL-17A/F-vastaseid üheaheelalisi antikehasid ja IL-17A/F-vastaste antikehade fragmente (vaadake allpool) seni, kuni neil ilmneb soovitud bioloogiline või immunoloogiline aktiivsus. Siin kasutatakse mõistet “immunoglobuliin” (Ig) samas tähenduses antikehaga.

(0100) "Eraldatud" antikeha on selline, mis on identifitseeritud ja eraldatud ning/või kogutud selle loodusliku keskkonna koostisosast. Selle loodusliku keskkonna saastavad koostisosad on materjalid, mis võivad häirida antikeha diagnostilisi või ravirakendusi, ning need võivad

hõlmata ensüüme, hormoone ning muid valgulisi ja mittevalgulisi lahustunud aineid. Eelistatavas teostuses puhastatakse antikeha (1) Lowry meetodil, määratuna enam kui 95% ulatuses antikeha massi järgi ning eelistatavamalt enam kui 99% ulatuses massi järgi, (2) määrani, mis on piisav, et saada vähemalt 15 N-terminaalse või sisemise aminohappejäägi järjestus, kasutades pöörlevate labadega sekvenaatorit, või (3) homogeensuseni SDS-PAGE analüüsis redutseerivates või mitteredutseerivates tingimustes, kasutades Coomassie Blue värvi või eelistatavalt hõbedaga värvimist. Eraldatud antikeha hõlmab antikeha rekombinantsetes rakkudes *in situ*, kuna vähemalt ühte antikeha loodusliku keskkonna koostisosa ei esine. Tavapäraselt valmistatakse eraldatud antikeha siiski vähemalt ühe puhastamisetaapiga.

(0101) Põhiline neljaahelaline antikehaühik on heterotetrameer-glükovalk, mis koosneb kahest identsest kergest (*light* - L) ahelast ja kahest identsest raskest (*heavy* - H) ahelast (IgM-antikeha koosneb viiest põhilisest heterotetrameerühikust koos J-ahelaks nimetatava lisapolüpetiidiga, ning seega sisaldab see 10 antigeeniseoselist kohta, samas kui sekreteeritavad IgA-antikehad võivad polümeriseeruda, et moodustuks polüvalentsed kogumid, mis koosnevad 2-5 põhilisest neljaahelalisest ühikust koos J-ahelaga). IgG-de puhul on neljaahelaline ühik üldiselt umbes 150000 daltoni suurune. Kumbki L-ahel on H-ahelaga seotud ühe kovalentse disulfiidsidemega, samas kui kaks H-ahelat on üksteisega seotud ühe või enama disulfiidsidemega, sõltudes H-ahela isotüübist. Samuti on igas H- ja L-ahelas regulaarsed ahelasisesed disulfiidsillad. Iga H-ahela N-terminuses on varieeruv domeen (V_H), millele järgneb kolm konstantset domeeni (C_H) iga α - ja γ -ahela puhul ning neli C_H -domeeni isotüüpide μ ja ϵ puhul. Iga L-ahela N-terminuses on varieeruv domeen (V_L), millele järgneb konstantne domeen (C_L) selle teises otsas. V_L on joondatud V_H -ga ning C_L on joondatud raske ahela esimese konstantse domeeniga (C_{H1} -ga). Arvatakse, et konkreetsed aminohappejäägid moodustavad liidese kerge ahela ja raske ahela varieeruvate domeenide vahel. V_H ja V_L koos paardumine moodustab ühe antigeeniseoselise koha. Antikehade erinevate klasside struktuuride ja omaduste kohta vaadake näiteks teost Basic and Clinical Immunology, 8. väljaanne, Daniel P. Stites, Abba I. Terr ja Tristram G. Parslow (toimetajad), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, lk 71 ja peatükk 6.

(0102) Tuginedes konstantsete domeenide aminohapete järjestustele, võib mistahes selgroogse looma liigist pärineva L-ahela liigitada ühte kahest selgelt eristuvast tüübist, mida nimetatakse κ ja λ . Sõltuvalt raskete ahelate konstantse domeeni (C_H) aminohapete järjestusest võib immunoglobuliine liigitada erinevatesse klassidesse või isotüüpidesse. Immunoglobuli-

liini klasse on viis: IgA, IgD, IgE, IgG ja IgM, millel on rasked ahelad, mida tähistatakse vastavalt α , δ , ϵ , γ ja μ . Klassid γ ja α jaotatakse edasi alamklassideks, tuginedes suhteliselt väikestele erinevustele C_H järjestuses ja funktsioonis, näiteks ekspresseeritakse inimestes järgmisi alamklasse: IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ ja IgA₂.

(0103) Mõiste „varieeruv“ tähendab tõsiasi, et antikehade varieeruvate domeenide kindlad lõigud erinevad ulatuslikult järjestuse poolest. V-domeen vahendab antigeeniga seondumist ning see määratleb konkreetse antikeha spetsiifilisuse selle konkreetse antigeeni suhtes. Siiski ei ole 110 aminohappe pikkuste varieeruvate domeenide ulatuses varieeruvus ühtlaselt jaotunud. Selle asemel koosnevad V-piirkonnad suhteliselt mittevarieeruvatest, 15-30 aminohappe pikkustest ning raamistikpiirkondadeks (FR-ideks) nimetatavatest aladest, mis on eraldatud ülimalt varieeruvate, „hüpervarieeruvateks piirkondadeks“ nimetatavate lühemate piirkondadega, millest igauhe pikkus on 9-12 aminohapet. Natiivsete raskete ja kergete ahelate varieeruvad domeenid sisaldavad igauks nelja FR-i, mis valdavalt võtavad β -lehe konfiguratsiooni, olles ühendatud kolme hüpervarieeruva piirkonnaga, mis moodustavad β -lehe struktuuriga ühenduvaid ja mõnel juhul nendest osa moodustavaid linge. Iga ahela hüpervarieeruvad piirkonnad on FR-de läheduses tihedalt koos ning osalevad koos teise ahela hüpervarieeruvate piirkondadega antikehade antigeeniseoselise koha moodustumises (vaadake teost Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5. väljaanne, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Konstantsed domeenid ei ole otseselt hõlmatud antikeha seondumisse antigeeniga, kuid neil on mitmesuguseid efektorfunktsioone, nagu antikeha osalemine antikehasõltuvas rakuga vahendatud tsütotoksilisuses (*antibody dependent cellular cytotoxicity* – ADCC-s).

(0104) Siin kasutatuna tähendab mõiste „hüpervarieeruv piirkond“ antikeha aminohappejääke, mis vastutavad antigeeni sidumise eest. Üldiselt hõlmab hüpervarieeruv piirkond aminohappejääke „komplementaarsust määravast piirkonnast“ ehk „CDR-ist“ (näiteks jääkide 24-34 (L1), 50-56 (L2) ja 89-97 (L3) domeenis V_L ning 31-35 (H1), 50-65 (H2) ja 95-102 (H3) juures domeenis V_H ; Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5. väljaanne Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) ning/või jääke „hüpervarieeruvast lingust“ (näiteks jäägid 26-32 (L1), 50-52 (L2) ja 91-96 (L3) domeenis V_L ning 26-32 (H1), 53-55 (H2) ja 96-101 (H3) domeenis V_H ; Chothia, Lesk, J. Mol. Biol., 196:901-917 (1987)).

(0105) Mõiste "monokloonne antikeha" tähendab siin kasutatuna antikeha, mis on saadud praktiliselt homogeensete antikehade populatsioonist, see tähendab, et üksikud antikehad, millest populatsioon koosneb, on identsed, välja arvatud võimalikud looduslikult esinevad mutatsioonid, mida võib olla vähestes kogustes. Olles suunatud üksiku antigeense koha vastu, on monokloonsed antikehad väga spetsiifilised. Lisaks on erinevalt polükloonsete antikehade preparaatidest, mis sisaldavad erinevaid antikehasid, mis on suunatud erinevate determinantide (epitopide) vastu, iga monokloonne antikeha suunatud ühe determinandi vastu antigeenis. Lisaks spetsiifilisusele on monokloonsed antikehad kasulikud seetõttu, et neid võib sünteesida ilma muude antikehade saastuseta. Laiendit "monokloonne" ei tõlgendata selliselt, et see nõuaks antikeha tootmist mistahes konkreetse meetodiga. Näiteks võib käesoleva leiutise kohaselt kasutatavaid monokloonseid antikehasid valmistada hübriidomimeetodiga, mida esimesena kirjeldati üllitises Kohler *et al.*, Nature, 256:495 (1975), või teha, kasutades rekombinantse DNA meetodeid bakteriaalsete, eukarüootsete, looma- või taimerakkude puhul (vaadake näiteks US patenti nr 4816567). „Monokloonseid antikehasid“ võib eraldada ka antikehade faagikogudest, kasutades meetodeid, mis on kirjeldatud üllitistes Clackson *et al.*, Nature, 352:624-628 (1991) ja Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991).

(0106) Siin hõlmavad monokloonsed antikehad „kimäärseid“ antikehasid, milles osa raskest ja/või kergest ahelast on identne või homoloogne vastava järjestusega antikehades, mis pärinevad konkreetsest liigist või kuuluvad konkreetsesse antikeha klassi või alamklassi, samas kui ülejäänud ahel on identne või homoloogne vastavate järjestustega antikehades, mis pärinevad mõnest muust liigist või kuuluvad mõnda muusse antikeha klassi või alamklassi; lisaks hõlmab see ka selliste antikehade fragmente seni, kuni neil on soovitud bioloogiline aktiivsus (vaadake US patenti nr 4816567 ja üllitist Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)). Siin huvipakkuvad kimäärsed antikehad hõlmavad "primaaditud" antikehasid, mis sisaldavad varieeruvast domeenis olevaid antigeeniseoselisi järjestusi, mis pärinevad inimesest erinevast primaadist (näiteks vana maailma ahvist, inimahvist jne), ning inimese konstantse piirkonna järjestusi.

(0107) "Terviklik" antikeha on selline, mis sisaldab antigeeniseoselist varieeruvat piirkonda ning lisaks C_L-domeeni ja raske ahela konstantseid domeene C_{H1}, C_{H2} ja C_{H3}. Konstantsed domeenid võivad olla natiivse järjestusega konstantsed domeenid (näiteks inimese natiivse järjestusega konstantsed domeenid) või nende aminohapete järjestuse variant. Eelistatavalt on terviklikul antikehal üks või enam efektorfunktsiooni.

(0108) "Antikeha fragmendid" hõlmavad osa terviklikust antikehast, eelistatavalt tervikliku antikeha antigeeniseoselist või varieeruvat piirkonda. Antikeha fragmentide näited hõlmavad Fab-, Fab'-, F(ab')₂- ja Fv-fragmente, diakehasid, lineaarseid antikehasid (vaadake US patendi nr 5641870 näidet 2 ja üllitist Zapata *et al.*, Protein Eng. 8(10): 1057-1062 (1995)), üheaheelalisi antikehamolekule ning multispetsiifilisi antikehasid, mis on moodustatud antikeha fragmentidest.

(0109) Antikehade lõikamine papaiiniga tekitab kaks identset antigeeniseoselist fragmenti, mida nimetatakse "Fab"-fragmentideks, ning järgijääva "Fc"-fragmendi, mille nimi peegeldab selle võimet hõlpsalt kristalluda. Fab-fragment koosneb terviklikust L-ahelast koos H-ahela varieeruva piirkonna domeeni (V_H-ga) ja ühe raske ahela esimese konstantse domeeniga (C_{H1}). Iga Fab-fragment on antigeeni sidumise mõttes monovalentne, mis tähendab, et sellel on üks antigeeniseoseline koht. Antikehade lõikamine pepsiiniga annab F(ab')₂-fragmendi, mis koosneb üldiselt kahest disulfiidsidemega seotud Fab-fragmentidest, ning sellel on divalentne antigeeni sidumise aktiivsus ja ikka veel võime antigeeni ristsiduda. Fab'-fragmentid erinevad Fab-fragmentidest selle poolest, et neil on domeeni C_{H1} karboksüterminuses mõni lisajääk, mis hõlmab ühte või enam tsüsteiinijääki antikeha liigendpiirkonnast. Fab'-SH on siin tähistus Fab' jaoks, milles konstantse domeeni tsüsteiinijäägil (jääkidel) on vaba tiolrühm. Antikeha F(ab')₂-fragmentid tehakse algselt Fab'-fragmentide paaridena, mille vahel on liigendpiirkonna tsüsteiinid. Antikeha fragmentide muud keemilised sidumised on samuti tuntud.

(0110) Fc-fragment hõlmab mõlema H-ahela karboksüterminaalseid osi, mis on omavahel seotud disulfiidsidemetega. Antikehade efektorfunktsioonid määratakse järjestustega Fc-piirkonnas ning see piirkond on ka osa, mis tuntakse ära Fc-retseptoriga (FcR-ga), mida leidub kondlates rakutüüpides.

(0111) "Fv" on antikeha minimaalne fragment, mis sisaldab täielikku antigeeni äratundvat ja -seoselist kohta. See fragment koosneb ühe raske ja ühe kerge ahela varieeruva piirkonna domeeni tihedalt ja mittekovalentselt seotud dimeerist. Nende kahe domeeni voltimisest tuleb kuus hüpervarieeruvat ligu (3 ligu kummaski H- ja L-ahelas), mis pakuvad antigeeniseoselisi aminohappejääke ja tagavad antikeha antigeeniga seondumise spetsiifilisuse. Siiski on isegi üks varieeruv domeen (või Fv-st pool, mis sisaldab ainult kolme antigeenispetsiifilist CDR-i) võimeline tundma ära ja seonduma antigeeniga, kuigi madalama afiinsusega, kui täielik seondumiskoht.

(0112) "Üheahelalised Fv-d", lühendatult ka „sFv-d“ või "scFv-d", on antikeha fragmendid, mis sisaldavad antikeha domeene V_H ja V_L , kusjuures need domeenid on ühendatud üheks polüpeptiidahelaks. Eelistatavalt sisaldab sFv-polüpeptiid lisaks polüpeptiidlinkerit domeenide V_H ja V_L vahel, mis võimaldab sFv-fragmendil moodustada soovitud struktuuri antigeeni sidumiseks. Ülevaateks scFv kohta vaadake Pluckthun'i osa teoses *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, 113. köide, toimetajad Rosenberg ja Moore, Springer-Verlag, New York, lk 269-315 (1994); Borrebaeck 1995, allpool.

(0113) Mõiste "diakehad" tähendab antikeha väikesi fragmente, mis valmistatakse, konstrueerides sFv-fragmendid (vaadake eelnevat lõiku), millel V_H - ja V_L -domeenide vahel on lühikesed linkerid (umbes 5-10 jääki) selliselt, et saavutatakse V-domeenide ahelatevaheline, kuid mitte ahelasisene, paardumine ning selle tulemuseks on bivalentne fragment, mis tähendab kahe antigeeniseoselise kohaga fragmenti. Bispetsiifilised diakehad on kahe "ristuva" sFv-fragmendi heterodimeerid, milles kahe antikeha V_H -ja V_L -domeenid esinevad erinevates polüpeptiidahelates. Diakehasid on täielikumalt kirjeldatud näiteks üllitistes EP 404, 097; WO93/11161 ning Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993).

(0114) Inimesest erineva päritoluga (näiteks hiire) antikehade „humaniseeritud“ vormid on kimäärsed antikehad, mis sisaldavad minimaalselt inimesest erineva päritoluga antikehast lähtuvat järjestust. Suuremalt osalt on humaniseeritud antikehad inimese immunoglobuliinid (retsipient-antikeha), milles retsiptiendi hüpervarieeruva piirkonna jäägid on asendatud jääkidega inimesest erinevate liikide, nagu hiir, rott, küülik või inimesest erinev primaat, hüpervarieeruvast piirkonnast (doonorantikeha), millel on soovitud spetsiifilisus, afiinsus ja võimekus. Mõnel juhul on inimese immunoglobuliini raamistikupiirkonna (FR-i) jäägid asendatud vastavate inimesest erineva päritoluga jääkidega. Lisaks võivad humaniseeritud antikehad sisaldada jääke, mida ei leidu ei retsiptient-antikehas ega doonorantikehas. Need muutused tehakse, et veelgi parendada antikeha suutlikust. Üldiselt hõlmab humaniseeritud antikeha praktiliselt vähemalt ühte, tüüpiliselt kahte terviklikku varieeruvat domeeni, milles kõik või praktiliselt kõik hüpervarieeruvad lingud vastavad sellele inimesest erineva päritoluga immunoglobuliinile, ning kõik või praktiliselt kõik FR-id on inimese immunoglobuliini järjestusega. Humaniseeritud antikeha sisaldab vajadusel vähemalt osa immunoglobuliini, tüüpiliselt inimese immunoglobuliini, konstantsest piirkonnast (Fc). Enamaid üksikasju vaadake üllitistest Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332:323-329 (1988) ja Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992).

(0115) “Liigist sõltuv antikeha”, näiteks inimese IgE vastane imetaja antikeha, on antikeha, millel on tugevam seondumisafiinsus esimesest imetajaliigist pärineva antigeeni suhtes, kui selle antigeeni homoloogi suhtes, mis pärineb teisest imetajaliigist. Harilikult liigist sõltuv antikeha “seondub spetsiifiliselt” inimese antigeeniga (st sellel on seondumisafiinsuse (Kd) väärtus mitte suurem kui 1×10^{-7} M, eelistatavalt mitte suurem kui 1×10^{-8} M ning enim eelistatavalt mitte suurem kui 1×10^{-9} M), kuid sellel on selle antigeeni homoloogi, mis pärineb teisest, inimesest erinevast imetajaliigist, suhtes seondumisafiinsus, mis on vähemalt umbes 50 korda või vähemalt umbes 500 korda või vähemalt umbes 1000 korda väiksem kui selle seondumisafiinsus inimese antigeeni suhtes. Liigist sõltuv antikeha võib olla milline tahes antikeha erinevatest, eespool määratletud tüüpidest, kuid eelistatavalt on see humaniseeritud või inimese antikeha.

(0116) “IL-17A/F-ga seonduv oligopeptiid” on oligopeptiid, mis seondub, eelistatavalt spetsiifiliselt, siin kirjeldatud IL-17A/F-polüpeptiidiga. IL-17A/F-ga seonduvad oligopeptiidid võivad olla keemiliselt sünteesitud, kasutades oligopeptiidide sünteesi tuntud meetodikat, või need võib valmistada ja puhastada, kasutades rekombinatset tehnoloogiat. Tavaliselt on IL-17A/F-ga seonduvad oligopeptiidid vähemalt umbes 5 aminohapet pikad, alternatiivselt vähemalt umbes 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 või 100 aminohapet pikad või pikemad, kusjuures sellised oligopeptiidid on võimelised seonduma, eelistatavalt spetsiifiliselt, siin kirjeldatud IL-17A/F-polüpeptiidiga. IL-17A/F-ga seonduvaid oligopeptiidide võib liigse katsetamiseta identifitseerida, kasutades hästi tuntud meetodeid. Sellega seoses võib märkida, et sihtmärkpolüpeptiidiga spetsiifiliselt seondumise võimega oligopeptiidide suhtes oligopeptiidikogude skriinimise meetodid on tehnika tasemes hästi tuntud (vaadake näiteks US patente nr 5556762, 5750373, 4708871, 4833092, 5223409, 5403484, 5571689, 5663143; PCT publikatsioone nr WO84/03506 ja WO84/03564; Geysen *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 81:3998-4002 (1984); Geysen *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 82:178-182 (1985); Geysen *et al.*, Synthetic Peptides as Antigens, 130-149 (1986); Geysen *et al.*, J. Immunol. Meth., 102:259-274 (1987); Schoofs *et al.*, J. Immunol., 140:611-616 (1988), Cwirla, S. E. *et al.*, (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378; Lowman, H. B. *et al.*, (1991) Biochemistry, 30:10832; Clackson, T. *et al.*, (1991) Nature,

352: 624; Marks, J. D. *et al.*, (1991), J. Mol. Biol., 222:581; Kang, A. S. *et al.*, (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8363 ja Smith, G. P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2:668).

(0117) “IL-17A/F-ga seonduv orgaaniline molekul” on siin määratletud oligopeptiidist või antikehast erinev orgaaniline molekul, mis seondub eelistatavalt spetsiifiliselt siin kirjeldatud IL-17A/F-polüpeptiidiga. IL-17A/F-ga seonduvaid orgaanilisi molekule või identifitseerida ja keemiliselt sünteesida, kasutades tuntud meetodikat (vaadake näiteks PCT publikatsioone nr WO00/00823 ja WO00/39585). IL-17A/F-ga seonduvad orgaanilised molekulid on harilikult vähem kui 2000 daltoni suurused, alternatiivselt vähem kui 1500, 750, 500, 250 või 200 daltoni suurused, kusjuures selliseid orgaanilisi molekule, mis seonduvad eelistatavalt spetsiifiliselt siin kirjeldatud IL-17A/F-polüpeptiidiga, võib liigse katsetamiseta identifitseerida, kasutades hästi tuntud meetodeid. Sellega seoses võib märkida, et sihtmärkpolüpeptiidiga spetsiifiliselt seonduvate molekulide suhtes orgaaniliste molekulide kogude skriinimise meetodid on tehnika tasemes hästi tuntud (vaadake näiteks PCT publikatsioone nr WO00/00823 ja WO00/39585).

(0118) Antikeha, oligopeptiid või muu orgaaniline molekul, “mis seondub” huvipakkuva antigeeni, näiteks kasvajakasvatuse polüpeptiidse sihtmärkantigeeniga, on selline, mis seondub antigeeniga piisava afiinsusega nii, et see antikeha, oligopeptiid või muu orgaaniline molekul on kasutatav diagnostilise ja/või raviagensina suunamiseks seda antigeeni ekspresseerivale rakule või koele ning sellel ei ole märkimisväärseid ristreaktsioone muude valkudega. Sellistes teostustes on antikeha, oligopeptiidi või muu orgaanilise molekuli “mitte-sihtmärk”-valguga seonduvuse määr väiksem kui umbes 10% antikeha, oligopeptiidi või muu orgaanilise molekuli seonduvusest oma konkreetse sihtmärkvalguga, määratuna fluorestsentsiga aktiveeritud rakkude sortimise (*fluorescence activated cell sorting* – FACS) analüüsi või radioimmuunsadestamisega (RIA-ga). Antikeha, oligopeptiidi või muu orgaanilise molekuli sihtmärkmolekuliga seonduvusega seoses tähendab mõiste “spetsiifiline seondumine” või “seondub spetsiifiliselt” või “on spetsiifiline” konkreetse polüpeptiidsihtmärgi või konkreetse polüpeptiidsihtmärgis oleva epitoobi suhtes seda, et seondumine on mõõdetavalt erinev mittespetsiifilisest vastasmõjust. Näiteks võib spetsiifilist seondumist mõõta, määra molekuli seonduvuse võrdlevalt kontrollmolekuliga, mis on üldiselt sarnase struktuuriga, kuid seonduvuse aktiivsusetu molekul. Näiteks võib spetsiifilise seonduvuse määrata konkureerimise kaudu sihtmärgiga sarnase kontrollmolekuliga, kasutades näiteks märgistamata sihtmärgi ülehulka. Sellisel juhul näitab spetsiifilist seondumist see, kui märgistamata siht-

märgi ülehulk inhibeerib konkureerivalt märgistatud sihtmärgi seondumist sondiga. Siin kasutatuna võib mõistet “spetsiifiline seondumine” või “seondub spetsiifiliselt” või “on spetsiifiline” konkreetse polüpeptiidsihtmärgi või konkreetse polüpeptiidsihtmärgis oleva epitoobi suhtes kohaldada näiteks molekulile, millel sihtmärgi suhtes on K_d -väärtus vähemalt umbes 10^4 M, alternatiivselt vähemalt umbes 10^5 M, alternatiivselt vähemalt umbes 10^6 M, alternatiivselt vähemalt umbes 10^7 M, alternatiivselt vähemalt umbes 10^8 M, alternatiivselt vähemalt umbes 10^9 M, alternatiivselt vähemalt umbes 10^{10} M, alternatiivselt vähemalt umbes 10^{11} M, alternatiivselt vähemalt umbes 10^{12} M või väiksem. Ühes teostuses tähendab “spetsiifiline seondumine” seondumist, mille puhul molekul seondub konkreetse polüpeptiidi või epitoobiga konkreetse polüpeptiidis, ilma et see praktiliselt seonduks mistahes muu polüpeptiidi või polüpeptiid-epitoobiga.

(0119) Antikeha, oligopeptiid või muu orgaaniline molekul, mis “inhibeerib IL-17A/F-polüpeptiidi ekspresseerivaid kasvajakarakke”, või “kasvu inhibeeriv” antikeha, oligopeptiid või muu orgaaniline molekul on selline, mille tulemusel sobivat IL-17A/F-polüpeptiidi ekspresseerivate või üleekspresseerivate vähirakkude kasvu inhibeeridakse mõõdetavalt. Eelistatavad kasvu inhibeerivad IL-17A/F-vastased antikehad, oligopeptiidid või orgaanilised molekulid inhibeerivad IL-17A/F-i ekspresseerivate kasvajakarakkude kasvu enam kui 20%, eelistatavalt umbes 20% kuni 50% ning isegi enam eelistatavalt enam kui 50% (näiteks umbes 50% kuni umbes 100%) võrreldes kontrolliga, milleks tüüpiliselt on kasvajakarakud, mida pole töödeldud testitava antikeha, oligopeptiidi või muu orgaanilise molekuliga. Ühes teostuses võib inhibeerimist mõõta antikeha kontsentratsioonil umbes 0,1 kuni 30 $\mu\text{g/ml}$ või umbes 0,5 nM kuni 200 nM kontsentratsioonil rakukultuuris, kus kasvu inhibeerimist määratakse 1-10 päeva pärast kasvajakarakkude eksponeerimist antikehale. Kasvajakarakkude kasvu inhibeerimist *in vivo* võib määrata mitmel viisil. Antikeha on *in vivo* kasvu inhibeeriv, kui IL-17A/F-vastase antikeha manustamine koguses umbes 1 μg kuni umbes 100 mg ühe kilogrammi kehamassi kohta anab tulemuseks kasvaja suuruse või kasvajakaraku proliferatsioonide vähenemise ajavahemikus umbes 5 päeva kuni 3 kuud, eelistatavalt umbes 5 kuni 30 päeva pärast antikeha esimest manustamist.

(0120) Antikeha, oligopeptiid või muu orgaaniline molekul, mis "indutseerib apoptoosi", on selline, mis indutseerib programmeeritud rakusurma, nagu seda määratakse anneksiin V sidumise, DNA fragmenteerumise, raku kokkutõmbumise, endoplasmaatilise retiikulumi laienemise, raku fragmenteerumise ja/või membraanvesiikulite (mida nimetatakse apoptootilis-

teks kehadeks) moodustumise järgi. Rakk on tavaliselt selline, mis üleekspresseerib IL-17A/F-polüpeptiidi. Eelistatavalt on rakk kasvajarakk, näiteks eesnäärme-, rinna-, munasarja-, mao-, emaka limaskesta, kopsu-, neeru-, käärsoole-, põierakk. Apoptoosiga seotud rakuliste sündmuste hindamiseks on mitmesuguseid meetodeid. Näiteks võib fosfatidüülseriini (*phosphatidyl serine* - PS) ümberpaiknemist mõõta anneksiini seondumise järgi, DNA fragmenteerumist võib hinnata, visualiseerides fragmendid (*DNA laddering*), ning tuuma/kromatiini kondenseerumist koos DNA fragmenteerumisega võib hinnata hüpodiploidsete rakkude arvu mistahes suurenemise järgi. Eelistatavalt on apoptoosi indutseeriv antikeha, oligopeptiid või muu orgaaniline molekul selline, mis indutseerib apoptoosi, mille tulemusena anneksiini seondumise analüüsis indutseeritakse anneksiini seondumine, mis on umbes 2- kuni 50 korda, eelistatavalt umbes 5 kuni 50 korda ning enim eelistatavalt umbes 10 kuni 50 korda suurem kui töötlemata raku puhul.

(0121) Antikeha "efektorfunktsioonid" tähendavad bioloogilisi aktiivsusi, mis on omistatavad antikeha Fc-piirkonnale (natiivse järjestusega Fc-piirkonnale või Fc-piirkonna aminohapete järjestuse variandile) ning need varieeruvad koos antikeha isotüübiga. Antikeha efektorfunktsioonide näited hõlmavad C1q sidumist ja komplemendisõltuvat tsütotoksilisust, Fc-retseptoriga seondumist, antikehasõltuvat rakuga vahendatud tsütotoksilisust (ADCC-d), fagotsütoosi, rakupinna retseptorite (näiteks B-raku retseptori) mahareguleerimist ning B-raku aktiveerimist.

(0122) „Antikehasõltuv rakuga vahendatud tsütotoksilisus“ ehk „ADCC“ tähendab tsütotoksilisuse vormi, mille puhul sekreteeritud Ig, mis on seondunud Fc-retseptoritele (FcR-dele), mis esinevad kindlatel tsütotoksilistel rakkudel (näiteks loomulikel tapjarakkudel (*Natural Killer* – NK), neutrofiilidel ja makrofaagidel), võimaldab nendel tsütotoksilistel efektorrakkudel seonduda spetsiifiliselt antigeeni kandva sihtmärkrakuga ning järgnevalt tappa sihtmärkrakk tsütokiinidega. Antikehad moodustavad tsütotoksiliste rakkude „kää“ ning need on selliseks tapmiseks absoluutselt vajalikud. Peamised ADCC-d vahendavad rakud on NK-rakud, mis ekspresseerivad ainult Fc_γRIII, samas kui monotsüüdid ekspresseerivad Fc_γRI, Fc_γRII ja Fc_γRIII. FcR ekspressioon vereloomerakkudes on kokku võetud üllitise Ravetch, Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9:457-92 (1991) tabelis 3 leheküljel 464. Huvipakkuva molekuli ADCC-aktiivsuse hindamiseks võib teostada *in vitro* ADCC-analüüsi, nagu on kirjeldatud US patentides nr 5500362 või 5821337. Sellisteks analüüsideks kasutatavad efektorrakud hõlmavad perifeerse vere mononukleaarseid rakke (*peripheral blood mononuclear cells* –

PBMC-id) ja loomulikke tapjarakke (NK-rakke). Alternatiivselt või lisaks võib huvipakkuva molekuli ADCC-aktiivsust hinnata *in vivo*, näiteks sellises loomamudelil, nagu on avaldatud üllitises Clynes *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:652-656 (1998).

(0123) Mõiste „Fc-retseptor“ ehk „FcR“ kirjeldab retseptorit, mis seondub antikeha Fc-piirkonnaga. Eelistatav FcR on inimese natiivse järjestusega FcR. Lisaks on eelistatav FcR selline, mis seondub IgG-antikehaga (γ -retseptor), ning see hõlmab Fc γ RI, Fc γ RII ja Fc γ RIII alamklasside retseptoreid, sealhulgas nende retseptorite alleelvariante ja alternatiivselt splaisitud vorme. Fc γ RII-retseptorid hõlmavad Fc γ RIIA-d ("aktiveeriv retseptor") ja Fc γ RIIB-d ("inhibeeriv retseptor"), millel on sarnased aminohapete järjestused, mis erinevad peamiselt tsütoplasmaatiliste domeenide osas. Aktiveeriv retseptor Fc γ RIIA sisaldab oma tsütoplasmaatilises domeenis immunoretseptori türosiinipõhist aktiveerivat motiivi (ITAM). Inhibeeriv Fc γ RIIB-retseptor sisaldab oma tsütoplasmaatilises domeenis immunoretseptori türosiinipõhist inhibeerivat motiivi (ITIM) (vaadake ülevaadet üllitises Daëron. Annu. Rev. Immunol., 15:203-234 (1997)). FcR-idest antakse ülevaade üllitistes Ravetch, Kinet, Annu. Rev. Immunol., 9:457-92 (1991); Capel *et al.*, Immunomethods, 4:25-34 (1994) ja de Haas *et al.*, J. Lab. Clin. Med., 126:330-41 (1995). Muud FcR-id, sealhugast need, mis identifitseeritakse tulevikus, on hõlmatud siin mõistega „FcR“. Mõiste hõlmab ka vastsündinu retseptorit FcR_n, mis vastutab emalt pärinevate IgG-de transpordi eest lootesse (Guyer *et al.*, J. Immunol., 117:587 (1976) ja Kim *et al.*, J. Immunol., 24:249 (1994)).

(0124) „Inimese efektorrakud“ on leukotsüüdid, mis ekspresseerivad ühte või enam FcR-i ning teostavad efektorfunktsioone. Eelistatavalt ekspresseerivad need rakud vähemalt Fc γ RIII ja teostavad efektorfunktsiooni ADCC. ADCC-d vahendavate inimese leukotsüütide näited hõlmavad perifeerse vere mononukleaarseid rakke (PBMC-sid), loomulike tapjarakke (NK-rakke), monotsüüte, tsütotoksilisi T-rakke ja neutrofiile, millest on eelistatavad PBMC-d ja NK-rakud. Efektorrakke võib eraldada nende looduslikust allikast, näiteks verest.

(0125) „Komplementisõltuv tsütotoksilisus“ ehk „CDC (*Complement dependent cytotoxicity*)“ tähendab molekuli võimet lüüvida sihtmärkrakku komplemendi manulusel. Komplemendi klassikalise aktiveerimise rada käivitatakse komplemendisüsteemi esimese osa (C1q) seandumisel (sobiva alamklassi) antikehadega, mis on seotud neile omase antigeeniga. Komplemendi aktiveerimise hindamiseks võib teostada CDC-analüüsi, näiteks nagu on kirjeldatud üllitises Gazzano-Santoro *et al.*, J. Immunol. Methods, 202:163 (1996).

(0126) Siin kasutatuna tähendab sõna “märgis” tuvastatavat ühendit või kompositsiooni, mis konjugeeritakse otseselt või kaudselt antikehaga, et tekitada “märgistatud” antikeha. Märgis võib olla tuvastatav iseenesest (näiteks radioisotoopmärgised või fluorestsentsmärgised) või, ensüümmärgise puhul, võib see katalüüsida substraatihendi või –kompositsiooni tuvastatavat keemilist muutust.

(0127) Mõistega “tahke faas” mõeldakse vesilahusest erinevat maatriksit, millele võib kinnitada leiutisekohase antikeha. Tahkete faaside näited hõlmavad siin neid, mille osaliselt või täielikult moodustab klaas (näiteks kontrollitud poorisuurusega klaas), polüsahhariidid (näiteks agaros), polüakrüülamiidid, polüstüreen, polüvinüülalkohol ja silikoonid. Kindlates teostustes võib tahke faas sõltuvalt kontekstist hõlmata analüüsiplaadi süvendit, teistes teostustes võib see olla puhastamiskolonn (näiteks afiinsuskromatograafiakolonn). See mõiste hõlmab ka eristuvate osakeste mittepidevat tahket faasi, nagu on kirjeldatud US patendis nr 4275149.

(0128) “Liposoom” on väike vesiikul, mis koosneb erinevat tüüpi lipiididest, fosfolipiididest ja/või surfaktandist, ning on kasutatav ravimi (nagu IL-17A/F-polüpeptiid või selle vastane antikeha) kohaletoimetamiseks imetajasse. Liposoomi koostisosad on harilikult paigutatud kahekihilises vormis, mis on sarnane bioloogiliste membraanide lipiidide paigutusega.

(0129) Siin määratletaval “väikesel molekulil” on molekulmass väiksem kui umbes 500 daltonit.

(0130) Mõiste “moduleerima” tähendab signaaliraja taset mõjutama (näiteks ülesreguleerima, allareguleerima või muul viisil kontrollima). Signaali ülekandega kontrollitavad rakulised protsessid hõlmavad, nendega piirdumata, spetsiifiliste geenide transkriptsiooni, normaalseid rakulisi protsesse, nagu metabolism, prolifereerumine, diferentseerumine, adhesioon, apoptoos ja elumus, ning lisaks ebanormaalseid protsesse, nagu transformeerumine, diferentseerumise tõkestamine ja metastaseerumine.

(0131) Siinsetel eesmärkidel tähendab “aktiivne” või “aktiivsusega” IL-17A/F-polüpeptiidi vormi (vorme), millel säilib natiivsete või looduslikult esinevate IL-17A/F-polüpeptiidide bioloogiline ja/või immunoloogiline aktiivsus, kusjuures “bioloogiline” aktiivsus tähendab natiivse või looduslikult esineva IL-17A/F-polüpeptiidi poolt põhjustatavat bioloogilist funktsiooni (inhibeerivat või stimuleerivat), mis ei ole võime indutseerida natiivses või looduslikus IL-17A/F-polüpeptiidis esineva antigeense epitoobi vastase antikeha tootmist, ning “immunoloogiline” aktiivsus tähendab võimet indutseerida natiivses või looduslikus IL-17A/F-polü-

peptiidis esineva antigeense epitoobi vastase antikeha tootmist. Üks eelistatav bioloogiline aktiivsus hõlmab NF- κ B aktiveerimise indutseerimist ja põletikku soodustavate kemokiinide IL-8 ja IL-6 tootmise stimuleerimist. Veel üks eelistatav bioloogiline aktiivsus hõlmab perifeerse vere mononukleaarsete rakkude või CD4⁺-rakkude stimuleerimist. Veel üks eelistatav bioloogiline aktiivsus hõlmab T-lümfotsüütide prolifereerumise stimuleerimist. Veel üks eelistatav bioloogiline aktiivsus hõlmab näiteks TNF- α vabastamist THP1-rakkudest. Veel üks aktiivsus hõlmab kunstlikus kõhres maatriksi sünteesi võimendamist. Alternatiivselt hõlmab veel üks aktiivsus kunstliku kõhre maatriksi lagunemise soodustamist ja lisaks maatriksi sünteesi inhibeerimist. Veel üks eelistatav bioloogiline aktiivsus hõlmab interleukiin-17 signaaliraja taseme moduleerimist põletikulise soolehaiguse kergetes kuni rasketes staadiumites või insuldi puhul.

(0132) “Immunoloogiline” aktiivsus tähendab ainult võimet indutseerida natiivses või looduslikult esinevas IL-17A/F-polüpeptiidis oleva antigeense epitoobi vastase antikeha tootmist.

(0133) Mõiste “degeneratiivne kõhrehäire” kirjeldab häirete hulka, mida olemuslikult iseloomustab kõhremaatriksi hävinemine. Lisapatoloogiad hõlmavad lämmastikoksiidi tootmist ja proteoglykaani lagunemise suurendamist. Iseloomulikud häired, mida hõlmatakse selle määratlusega, on näiteks artriidid (näiteks osteoartriit, reumatoidartriit, psoriaatiline artriit).

(0134) Mõiste “immuunseoseline haigus” tähendab haigust, mille puhul imetaja immuunsüsteemi koostisosa põhjustab, vahendab või muul viisil panustab selle imetaja haigestumisse. Samuti on hõlmatud haigused, mille puhul immuunvastuse stimuleerimisel või sellesse sekkumisel on haiguse progresseerumist leevendav toime. Selle mõistega on hõlmatud immuunseoselised põletikulised haigused, mitte-immuunseoselised põletikulised haigused, nakkushaigused, immuunpuudulikkushaigused, kasvajaid jne.

(0135) Mõiste “T-rakuga vahendatav haigus” tähendab haigust, mille puhul T-rakud otseselt või kaudselt vahendavad või panustavad muul viisil imetaja haigestumisse. T-rakuga vahendatud haigus võib olla seotud rakuga vahendatavate toimete, lümfokiinidega vahendatavate toimete jne ning isegi B-rakkudega seotud toimetega, kui näiteks B-rakke stimuleeritakse T-rakkude poolt sekreteeritud lümfokiinidega.

(0136) Immuunseoseliste ja põletikuliste haiguste, millest mõned on immuun- või T-rakkudega vahendatavad ning mida võib ravida vastavalt leiutisele, näited hõlmavad järgnevaid: süsteemne erütematoosluupus, reumatoidartriit, juveniilne krooniline artriit, spondüloartro-

paatiad, süsteemne sklerooos (skleroderma), idiopaatilised põletikulised müopaatiad (dermatomüosiit, polümüosiit), Sjörgeni sündroom, süsteemne vaskuliit, sarkoidoos, autoimmuunne hemolüütiline aneemia (immuunpantsütopeenia, paroksüsmaalne öine hemoglobiinuuria), autoimmuunne trombotsütopeenia (idiopaatiline trombotsütopeeniline purpura, immuunvahendatud trombotsütopeenia), türeoidiit (Grave'i tõbi, Hashimoto türeoidiit, juveniilne lümfotsütoosne türeoidiit, atroofiline türeoidiit), diabeet, immuunvahendatud neeruhaigus (glomerulonefriit, tubulointerstitsiaalne nefriit), kesk- ja perifeerse närvisüsteemi demüeliniseerivad haigused, nagu hulgisklerooos, idiopaatiline demüeliniseeriv polüneuropaatia või Guillaini-Barré'i sündroom ja krooniline põletikuline demüeliniseeriv polüneuropaatia, maksa-sapihaigused, nagu nakkuslik hepatiit (A-, B-, C-, D-, E-hepatiit ja muud, mittehepatotroofilistest viirustest tingitud haigused), krooniline aktiivne autoimmuunne hepatiit, esmane sapitsirroos, granulomatoosne hepatiit ja skleroseeriv kolangiit, põletikuline soolehaigus (haavandiline koliit, Crohni tõbi), gluteenitundlik enteropaatia ja Whipple tõbi, autoimmuun- või immuunvahendatud nahahaigused, sealhulgas naha villtõved, mitmekujuline erüteem ja kontaktdermatiit, psoriaas, allergilised haigused, nagu astma, allergiline nohu, atoopiline dermatiit, toidu suhtes ülitundlikkus ja nõgestõbi, immunoloogilised kopsuhaigused, nagu eosinofiilne kopsupõletik, idiopaatiline kopsufibroos ja ülitundlikkusega seotud kopsupõletik, siirdamisega seotud haigused, sealhulgas transplantaadi hülgamine ja transplantaadi peremehevastane haigus, nakkushaigused, sealhulgas viirushaigused, nagu AIDS (HIV-i nakkus), A-, B-, C-, D- ja E-hepatiit, herpes jne, bakteriaalsed nakkused, seennakkused, algloomade nakkused ja nakatumised parasiitidega. Mõiste "toimiv kogus" on IL-17A/F-polüpeptiidi ja/või selle agonisti/antagonisti kontsentratsioon või kogus, mille tulemusena saavutatakse konkreetne püstitatud eesmärk. IL-17A/F-polüpeptiidi ja/või selle agonisti/antagonisti "toimiva koguse" võib määrata empiiriliselt. Lisaks on "ravivalt toimiv kogus" IL-17A/F-polüpeptiidi ja/või selle agonisti/antagonisti kontsentratsioon või kogus, mis on tõhus püstitatud ravieesmärgi saavutamiseks. Ka selle koguse võib määrata empiiriliselt.

(0137) Siin kasutatuna tähistab mõiste „tsütotoksiline agens“ ainet, mis inhibeerib või hoiab ära rakkude talitlemist ja/või põhjustab rakkude hävinemist. Mõiste on mõeldud hõlmama radioaktiivseid isotoope (näiteks ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y ja ^{186}Re), keemiaravi agenseid ja toksine, nagu bakteriaalse, seene, taimse või loomse päritoluga ensümaatiliseltselt aktiivsed toksiinid või nende fragmendid.

(0138) “Keemiaraviagens” on keemiline agens, mis on kasutatav vähi ravimiseks. Keemiaraviagensite näited hõlmavad adriamütsiini, doksorubitsiini, epirubitsiini, 5-fluorouratsüüli, tsütosiinarabinosiidi (“Ara-C”), tsüklofosfamiidi, tiotepat, busulfaani, tsütoksiini, taksoide, mille näideteks on paklitakseel (Taxol, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ) ja doksetakseel (Taxotere, Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Prantsusmaa), toksoteeri, metotrektaati, tsisplatiini, melfalaani, vinblastiini, bleomütsiini, etoposiidi, ifosfamiidi, mitomütsiini C, mitoksantroni, vinkristiini, vinorelbiini, karboplatiini, teniposiidi, daunomütsiini, karminomütsiini, aminopteriini, daktinomütsiini, mitomütsiine, esperamütsiine (vaadake US patenti nr 4675187), melfalaani ja muid sarnaseid lümmastikipriite. Samuti on selle määratlusega hõlmatud hormonaalsed agensid, nagu tamoksifeen ja onapristoon, mis toimivad, reguleerides või inhibeerides hormoonide toimet kasvajatele.

(0139) Siin kasutatuna tähistab mõiste „kasvu inhibeeriv agens“ ühendit või kompositsiooni, mis inhibeerib raku, eriti mistahes siin identifitseeritud gene ekspresseeriva vähiraku, kasvu *in vitro* või *in vivo*. Seega on kasvu inhibeeriv agens selline, mis oluliselt vähendab selliseid gene S-faasis üleekspresseerivate rakkude protsenti. Kasvu inhibeerivate agensite näited hõlmavad rakutsükli (muus kui S-faasis) progresseerumist tõkestavaid agenseid, nagu agensid, mis tekitavad G1-faasi seiskamise ja M-faasi seiskamise. Klassikalised M-faasi tõkestajad hõlmavad *Vinca* alkaloidide (vinkristiini ja vinblastiini), taksooli ja topo II inhibiitoreid, nagu doksorubitsiin, epirubitsiin, daunorubitsiin, etoposiid ja bleomütsiin. Agensid, mis seiskavad G1-faasi, mõjuvad ka S-faasi seiskajatena, näideteks on DNA-d alküülivad agensid, nagu tamoksifeen, prednisoon, dakarbasiin, meklooretamiin, tsisplatiin, metotrektaat, 5-fluorouratsüül ja ara-C. Lisainfot võib leida teosest *The Molecular Basis of Cancer*, toimetanud Mendelsohn ja Israel, peatükk 1 pealkirjaga "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs", autorid Murakami *et al.*, (WB Saunders: Philadelphia, 1995), peamiselt lk 13.

(0140) Mõiste „tsütokiin“ on üldine mõiste valkude jaoks, mis ühe rakupopulatsiooni poolt vabastatuna toimivad mõnele teisele rakule kui rakkudevahelised vahendajad. Selliste tsütokiinide näited on lümfokiinid, monokiinid ja traditsioonilised polüpeptiidised hormoonid. Tsütokiinide hulka arvatakse kasvuhormoon, nagu inimese kasvuhormoon, inimese N-metionüül-kasvuhormoon ja veise kasvuhormoon, kõrvalkilpnäärme hormoon, türoksiin, insuliin, proinsuliin, relaksiin, prorelaksiin, glükoproteiinsed hormoonid, nagu folliikuleid stimuleeriv hormoon (FSH), kilpnääret stimuleeriv hormoon (*thyroid stimulating hormone* - TSH)

ja luteniseeriv hormoon (LH), maksa kasvufaktor, fibroblasti kasvufaktor, prolaktiin, platsenta laktogeen, kasvaja nekroosifaktor- α ja - β , Mülleri juhasid inhibeeriv aine, hiire gonadotropiiniseoseline peptiid, inhibiin, aktiviin, vaskulaarse endoteeli kasvufaktor, integriin, trombopoetiin (TPO), närvikasvufaktorid nagu NGF- β , vereliistakute kasvufaktor, transformeerivad kasvufaktorid (*transforming growth factors* - TGF-id), nagu TGF- α ja TGF- β , insuliinisarnane kasvufaktor I ja II, erütropoetiin (EPO), osteoinduktiivsed faktorid, interferoonid, nagu interferoon- α , - β ja - γ , kolooniat stimuleerivad faktorid (*colony stimulating factors* – CSF-id), nagu makrofaagi CSF (M-CSF), granulotsüüdi-makrofaagi CSF (GM-CSF) ja granulotsüüdi CSF (G-CSF), interleukiinid (IL-id), nagu IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, kasvaja nekroosifaktor, nagu TNF- α või TNF- β , ning muud polüpeptiidised faktorid, sealhugast LIF ja Kit-i ligand (KL). Siin kasutatuna hõlmab mõiste tsütokiin looduslikest allikatest või rekombinantsest rakukultuurist pärinevaid valke ning natiivse järjestusega tsütokiinide bioloogiliselt aktiivseid ekvivalente.

Table 1

```

/*
 *
 * C-C increased from 12 to 15
 * Z is average of EQ
 * B is average of ND
 * match with stop is _M; stop-stop = 0; J (joker) match = 0
 */
#define _M      -8      /* value of a match with a stop */

int  _day[26][26] = {
/*  A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z */
/* A */ { 2, 0, -2, 0, 0, -4, 1, -1, -1, 0, -1, -2, -1, 0, _M, 1, 0, -2, 1, 1, 0, 0, -6, 0, -3, 0},
/* B */ { 0, 3, -4, 3, 2, -5, 0, 1, -2, 0, 0, -3, -2, 2, _M, -1, 1, 0, 0, 0, 0, -2, -5, 0, -3, 1},
/* C */ {-2, -4, 15, -5, -4, -3, -3, -2, 0, -5, -6, -5, -4, _M, -3, -5, -4, 0, -2, 0, -2, -8, 0, 0, -5},
/* D */ { 0, 3, -5, 4, 3, -6, 1, 1, -2, 0, 0, -4, -3, 2, _M, -1, 2, -1, 0, 0, 0, -2, -7, 0, -4, 2},
/* E */ { 0, 2, -5, 3, 4, -5, 0, 1, -2, 0, 0, -3, -2, 1, _M, -1, 2, -1, 0, 0, 0, -2, -7, 0, -4, 3},
/* F */ {-4, -5, -4, -6, -5, 9, -5, -2, 1, 0, -5, 2, 0, -4, _M, -5, -5, -4, -3, -3, 0, -1, 0, 0, 7, -5},
/* G */ { 1, 0, -3, 1, 0, -5, 5, -2, -3, 0, -2, -4, -3, 0, _M, -1, -1, -3, 1, 0, 0, -1, -7, 0, -5, 0},
/* H */ {-1, 1, -3, 1, 1, -2, -2, 6, -2, 0, 0, -2, -2, 2, _M, 0, 3, 2, -1, -1, 0, -2, -3, 0, 0, 2},
/* I */ {-1, -2, -2, -2, -2, 1, -3, -2, 5, 0, -2, 2, 2, -2, _M, -2, -2, -2, -1, 0, 0, 4, -5, 0, -1, -2},
/* J */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* K */ {-1, 0, -5, 0, 0, -5, -2, 0, -2, 0, 5, -3, 0, 1, _M, -1, 1, 3, 0, 0, 0, -2, -3, 0, -4, 0},
/* L */ {-2, -3, -6, -4, -3, 2, -4, -2, 2, 0, -3, 6, 4, -3, _M, -3, -2, -3, -3, -1, 0, 2, -2, 0, -1, -2},
/* M */ {-1, -2, -5, -3, -2, 0, -3, -2, 2, 0, 0, 4, 6, -2, _M, -2, -1, 0, -2, -1, 0, 2, -4, 0, -2, -1},
/* N */ { 0, 2, -4, 2, 1, -4, 0, 2, -2, 0, 1, -3, -2, 2, _M, -1, 1, 0, 1, 0, 0, -2, -4, 0, -2, 1},
/* O */ {_M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M},
/* P */ { 1, -1, -3, -1, -1, -5, -1, 0, -2, 0, -1, -3, -2, -1, _M, 6, 0, 0, 1, 0, 0, -1, -6, 0, -5, 0},
/* Q */ { 0, 1, -5, 2, 2, -5, -1, 3, -2, 0, 1, -2, -1, 1, _M, 0, 4, 1, -1, -1, 0, -2, -5, 0, -4, 3},
/* R */ {-2, 0, -4, -1, -1, -4, -3, 2, -2, 0, 3, -3, 0, 0, _M, 0, 1, 6, 0, -1, 0, -2, 2, 0, -4, 0},
/* S */ { 1, 0, 0, 0, 0, -3, 1, -1, -1, 0, 0, -3, -2, 1, _M, 1, -1, 0, 2, 1, 0, -1, -2, 0, -3, 0},
/* T */ { 1, 0, -2, 0, 0, -3, 0, -1, 0, 0, 0, -1, -1, 0, _M, 0, -1, -1, 1, 3, 0, 0, -5, 0, -3, 0},
/* U */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* V */ { 0, -2, -2, -2, -2, -1, -1, -2, 4, 0, -2, 2, 2, -2, _M, -1, -2, -2, -1, 0, 0, 4, -6, 0, -2, -2},
/* W */ {-6, -5, -8, -7, -7, 0, -7, -3, -5, 0, -3, -2, -4, -4, _M, -6, -5, 2, -2, -5, 0, -6, 17, 0, 0, -6},
/* X */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* Y */ {-3, -3, 0, -4, -4, 7, -5, 0, -1, 0, -4, -1, -2, -2, _M, -5, -4, -4, -3, -3, 0, -2, 0, 0, 10, -4},
/* Z */ { 0, 1, -5, 2, 3, -5, 0, 2, -2, 0, 0, -2, -1, 1, _M, 0, 3, 0, 0, 0, 0, -2, -6, 0, -4, 4}
};

```

Table 1 (cont')

```

/*
*/
#include <stdio.h>
#include <ctype.h>

#define MAXJMP      16      /* max jumps in a diag */
#define MAXGAP      24      /* don't continue to penalize gaps larger than this */
#define JMPS        1024    /* max jmps in an path */
#define MX          4       /* save if there's at least MX-1 bases since last jmp */

#define DMAT        3       /* value of matching bases */
#define DMIS        0       /* penalty for mismatched bases */
#define DINS0       8       /* penalty for a gap */
#define DINS1       1       /* penalty per base */
#define PINS0       8       /* penalty for a gap */
#define PINS1       4       /* penalty per residue */

struct jmp {
    short          n[MAXJMP]; /* size of jmp (neg for dely) */
    unsigned short x[MAXJMP]; /* base no. of jmp in seq x */
}; /* limits seq to 2^16 -1 */

struct diag {
    int            score;      /* score at last jmp */
    long           offset;     /* offset of prev block */
    short          jmp;        /* current jmp index */
    struct jmp     jp;         /* list of jmps */
};

struct path {
    int            spc;        /* number of leading spaces */
    short          n[JMPS];    /* size of jmp (gap) */
    int            x[JMPS];    /* loc of jmp (last elem before gap) */
};

char             *ofile;      /* output file name */
char             *namex[2];   /* seq names: getseqs() */
char             *prog;       /* prog name for err msgs */
char             *seqx[2];    /* seqs: getseqs() */
int              dmax;        /* best diag: nw() */
int              dmax0;       /* final diag */
int              dna;         /* set if dna: main() */
int              endgaps;     /* set if penalizing end gaps */
int              gapx, gapy;   /* total gaps in seqs */
int              len0, len1;   /* seq lens */
int              ngapx, ngapy; /* total size of gaps */
int              smax;        /* max score: nw() */
int              *xbm;        /* bitmap for matching */
long             offset;      /* current offset in jmp file */
struct diag      *dx;         /* holds diagonals */
struct path      pp[2];       /* holds path for seqs */

char             *calloc(), *malloc(), *index(), *strcpy();
char             *getseq(), *g_calloc();

```

Table 1 (cont')

```

/* Needleman-Wunsch alignment program
*
* usage: progs file1 file2
* where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.
* The sequences can be in upper- or lower-case and may contain ambiguity
* Any lines beginning with ';', '>' or '<' are ignored
* Max file length is 65535 (limited by unsigned short x in the jmp struct)
* A sequence with 1/3 or more of its elements ACGTU is assumed to be DNA
* Output is in the file "align.out"
*
* The program may create a tmp file in /tmp to hold info about traceback.
* Original version developed under BSD 4.3 on a vax 8650
*/
#include "nw.h"
#include "day.h"

static  _dbval[26] = {
        1,14,2,13,0,0,4,11,0,0,12,0,3,15,0,0,0,5,6,8,8,7,9,0,10,0
};

static  _pbval[26] = {
        1, 2|(1<<('D'-'A'))|(1<<('N'-'A')), 4, 8, 16, 32, 64,
        128, 256, 0xFFFFFFFF, 1<<10, 1<<11, 1<<12, 1<<13, 1<<14,
        1<<15, 1<<16, 1<<17, 1<<18, 1<<19, 1<<20, 1<<21, 1<<22,
        1<<23, 1<<24, 1<<25|(1<<('E'-'A'))|(1<<('Q'-'A'))
};

main(ac, av)
int      ac;
char     *av[];
{
    prog = av[0];
    if (ac != 3) {
        fprintf(stderr, "usage: %s file1 file2\n", prog);
        fprintf(stderr, "where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.\n");
        fprintf(stderr, "The sequences can be in upper- or lower-case\n");
        fprintf(stderr, "Any lines beginning with ';', '>' or '<' are ignored\n");
        fprintf(stderr, "Output is in the file \"align.out\"\n");
        exit(1);
    }
    namex[0] = av[1];
    namex[1] = av[2];
    seqx[0] = getseq(namex[0], &len0);
    seqx[1] = getseq(namex[1], &len1);
    xbm = (dna)? _dbval : _pbval;

    endgaps = 0;                /* 1 to penalize endgaps */
    ofile = "align.out";       /* output file */

    nw();                       /* fill in the matrix, get the possible jmps */
    readjmps();                 /* get the actual jmps */
    print();                     /* print stats, alignment */

    cleanup();                  /* unlink any tmp files */
}

```

main

Table 1 (cont')

```

/* do the alignment, return best score: main()
 * dna: values in Fitch and Smith, PNAS, 80, 1382-1386, 1983
 * pro: PAM 250 values
 * When scores are equal, we prefer mismatches to any gap, prefer
 * a new gap to extending an ongoing gap, and prefer a gap in seqx
 * to a gap in seq y.
 */
nw()
{
    char      *px, *py;          /* seqs and ptrs */
    int       *ndely, *dely;     /* keep track of dely */
    int       ndelx, delx;       /* keep track of delx */
    int       *tmp;              /* for swapping row0, row1 */
    int       mis;               /* score for each type */
    int       ins0, ins1;        /* insertion penalties */
    register  id;                /* diagonal index */
    register  ij;                /* jmp index */
    register  *col0, *col1;      /* score for curr, last row */
    register  xx, yy;            /* index into seqs */

    dx = (struct diag *)g_calloc("to get diags", len0+len1+1, sizeof(struct diag));

    ndely = (int *)g_calloc("to get ndely", len1+1, sizeof(int));
    dely = (int *)g_calloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));
    col0 = (int *)g_calloc("to get col0", len1+1, sizeof(int));
    col1 = (int *)g_calloc("to get col1", len1+1, sizeof(int));
    ins0 = (dna)? DINS0 : PINS0;
    ins1 = (dna)? DINS1 : PINS1;

    smax = -10000;
    if (endgaps) {
        for (col0[0] = dely[0] = -ins0, yy = 1; yy <= len1; yy++) {
            col0[yy] = dely[yy] = col0[yy-1] - ins1;
            ndely[yy] = yy;
        }
        col0[0] = 0;          /* Waterman Bull Math Biol 84 */
    }
    else
        for (yy = 1; yy <= len1; yy++)
            dely[yy] = -ins0;

    /* fill in match matrix
     */
    for (px = seqx[0], xx = 1; xx <= len0; px++, xx++) {
        /* initialize first entry in col
         */
        if (endgaps) {
            if (xx == 1)
                col1[0] = delx = -(ins0+ins1);
            else
                col1[0] = delx = col0[0] - ins1;
            ndelx = xx;
        }
        else {
            col1[0] = 0;
            delx = -ins0;
            ndelx = 0;
        }
    }
}

```

nw

Table 1 (cont')

...nw

```

for (py = seqx[1], yy = 1; yy <= len1; py++, yy++) {
  mis = col0[yy-1];
  if (dna)
    mis += (xbrm[*px-'A']&xbrm[*py-'A'])? DMAT : DMIS;
  else
    mis += _day[*px-'A'][*py-'A'];

  /* update penalty for del in x seq;
  * favor new del over ongong del
  * ignore MAXGAP if weighting endgaps
  */
  if (endgaps || ndely[yy] < MAXGAP) {
    if (col0[yy] - ins0 >= dely[yy]) {
      dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
      ndely[yy] = 1;
    } else {
      dely[yy] -= ins1;
      ndely[yy]++;
    }
  } else {
    if (col0[yy] - (ins0+ins1) >= dely[yy]) {
      dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
      ndely[yy] = 1;
    } else
      ndely[yy]++;
  }

  /* update penalty for del in y seq;
  * favor new del over ongong del
  */
  if (endgaps || ndelx < MAXGAP) {
    if (col1[yy-1] - ins0 >= delx) {
      delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
      ndelx = 1;
    } else {
      delx -= ins1;
      ndelx++;
    }
  } else {
    if (col1[yy-1] - (ins0+ins1) >= delx) {
      delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
      ndelx = 1;
    } else
      ndelx++;
  }

  /* pick the maximum score; we're favoring
  * mis over any del and delx over dely
  */

```

Table 1 (cont')

...nw

```

id = xx - yy + lenl - 1;
if (mis >= delx && mis >= dely[yy])
    col1[yy] = mis;
else if (delx >= dely[yy]) {
    col1[yy] = delx;
    ij = dx[id].ijmp;
    if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndelx >= MAXJMP
    && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
        dx[id].ijmp++;
        if (++ij >= MAXJMP) {
            writejmps(id);
            ij = dx[id].ijmp = 0;
            dx[id].offset = offset;
            offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
        }
        dx[id].jp.n[ij] = ndelx;
        dx[id].jp.x[ij] = xx;
        dx[id].score = delx;
    }
} else {
    col1[yy] = dely[yy];
    ij = dx[id].ijmp;
    if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndely[yy] >= MAXJMP
    && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
        dx[id].ijmp++;
        if (++ij >= MAXJMP) {
            writejmps(id);
            ij = dx[id].ijmp = 0;
            dx[id].offset = offset;
            offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
        }
        dx[id].jp.n[ij] = -ndely[yy];
        dx[id].jp.x[ij] = xx;
        dx[id].score = dely[yy];
    }
}
if (xx == len0 && yy < lenl) {
    /* last col
    */
    if (endgaps)
        col1[yy] -= ins0+insl*(lenl-yy);
    if (col1[yy] > smax) {
        smax = col1[yy];
        dmax = id;
    }
}
}
if (endgaps && xx < len0)
    col1[yy-1] -= ins0+insl*(len0-xx);
if (col1[yy-1] > smax) {
    smax = col1[yy-1];
    dmax = id;
}
tmp = col0; col0 = col1; col1 = tmp;
}
(void) free((char *)ndely);
(void) free((char *)dely);
(void) free((char *)col0);
(void) free((char *)col1);
}

```


Table 1 (cont')

```

/*
 *
 * print() -- only routine visible outside this module
 *
 * static:
 * getmat() -- trace back best path, count matches: print()
 * pr_align() -- print alignment of described in array p[]: print()
 * dumpblock() -- dump a block of lines with numbers, stars: pr_align()
 * nums() -- put out a number line: dumpblock()
 * putline() -- put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 * stars() -- put a line of stars: dumpblock()
 * stripname() -- strip any path and prefix from a seqname
 */

#include "nw.h"

#define SPC      3
#define P_LINE  256 /* maximum output line */
#define P_SPC   3   /* space between name or num and seq */

extern _day[26][26];
int olen; /* set output line length */
FILE *fx; /* output file */

print()
{
    int lx, ly, firstgap, lastgap; /* overlap */

    if ((fx = fopen(ofile, "w")) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, ofile);
        cleanup(1);
    }
    fprintf(fx, "<first sequence: %s (length = %d)\n", namex[0], len0);
    fprintf(fx, "<second sequence: %s (length = %d)\n", namex[1], len1);
    olen = 60;
    lx = len0;
    ly = len1;
    firstgap = lastgap = 0;
    if (dmax < len1 - 1) { /* leading gap in x */
        pp[0].spc = firstgap = len1 - dmax - 1;
        ly -= pp[0].spc;
    }
    else if (dmax > len1 - 1) { /* leading gap in y */
        pp[1].spc = firstgap = dmax - (len1 - 1);
        lx -= pp[1].spc;
    }
    if (dmax0 < len0 - 1) { /* trailing gap in x */
        lastgap = len0 - dmax0 - 1;
        lx -= lastgap;
    }
    else if (dmax0 > len0 - 1) { /* trailing gap in y */
        lastgap = dmax0 - (len0 - 1);
        ly -= lastgap;
    }
    getmat(lx, ly, firstgap, lastgap);
    pr_align();
}

```

print

Table 1 (cont')

```

/*
 * trace back the best path, count matches
 */
static
getmat(lx, ly, firstgap, lastgap)                                getmat
    int    lx, ly;                                           /* "core" (minus endgaps) */
    int    firstgap, lastgap;                                /* leading trailing overlap */
{
    int    nm, i0, i1, siz0, siz1;
    char   outx[32];
    double pct;
    register n0, n1;
    register char *p0, *p1;

    /* get total matches, score
     */
    i0 = i1 = siz0 = siz1 = 0;
    p0 = seqx[0] + pp[1].spc;
    p1 = seqx[1] + pp[0].spc;
    n0 = pp[1].spc + 1;
    n1 = pp[0].spc + 1;

    nm = 0;
    while ( *p0 && *p1 ) {
        if (siz0) {
            p1++;
            n1++;
            siz0--;
        }
        else if (siz1) {
            p0++;
            n0++;
            siz1--;
        }
        else {
            if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A'])
                nm++;
            if (n0++ == pp[0].x[i0])
                siz0 = pp[0].n[i0++];
            if (n1++ == pp[1].x[i1])
                siz1 = pp[1].n[i1++];
            p0++;
            p1++;
        }
    }

    /* pct homology:
     * if penalizing endgaps, base is the shorter seq
     * else, knock off overhangs and take shorter core
     */
    if (endgaps)
        lx = (len0 < len1)? len0 : len1;
    else
        lx = (lx < ly)? lx : ly;
    pct = 100.*(double)nm/(double)lx;
    fprintf(fx, "\n");
    fprintf(fx, "<%d match%s in an overlap of %d: %.2f percent similarity\n",
            nm, (nm == 1)? "" : "es", lx, pct);
}

```

Table 1 (cont')

```

fprintf(fx, "<gaps in first sequence: %d", gapx);
if (gapx) {
    (void) sprintf(outx, "(%d %s%s)",
        ngapx, (dna)? "base":"residue", (ngapx == 1)? "" : "s");
    fprintf(fx, "%s", outx);

    fprintf(fx, ", gaps in second sequence: %d", gapy);
    if (gapy) {
        (void) sprintf(outx, "(%d %s%s)",
            ngapy, (dna)? "base":"residue", (ngapy == 1)? "" : "s");
        fprintf(fx, "%s", outx);
    }
    if (dna)
        fprintf(fx,
            "\n<score: %d (match = %d, mismatch = %d, gap penalty = %d + %d per base)\n",
            smax, DMAT, DMIS, DINS0, DINS1);
    else
        fprintf(fx,
            "\n<score: %d (Dayhoff PAM 250 matrix, gap penalty = %d + %d per residue)\n",
            smax, PINS0, PINS1);
    if (endgaps)
        fprintf(fx,
            "<endgaps penalized. left endgap: %d %s%s, right endgap: %d %s%s\n",
            firstgap, (dna)? "base" : "residue", (firstgap == 1)? "" : "s",
            lastgap, (dna)? "base" : "residue", (lastgap == 1)? "" : "s");
    else
        fprintf(fx, "<endgaps not penalized\n");
}

static      nm;          /* matches in core -- for checking */
static      lmax;       /* lengths of stripped file names */
static      ij[2];      /* jmp index for a path */
static      nc[2];      /* number at start of current line */
static      ni[2];      /* current elem number -- for gapping */
static      siz[2];
static char *ps[2];     /* ptr to current element */
static char *po[2];     /* ptr to next output char slot */
static char out2[P_LINE]; /* output line */
static char star[P_LINE]; /* set by stars() */

/*
 * print alignment of described in struct path pp[]
 */
static
pr_align()
{
    int      nn;         /* char count */
    int      more;
    register i;

    for (i = 0, lmax = 0; i < 2; i++) {
        nn = stripname(namex[i]);
        if (nn > lmax)
            lmax = nn;

        nc[i] = 1;
        ni[i] = 1;
        siz[i] = ij[i] = 0;
        ps[i] = seqx[i];
        po[i] = out[i];
    }
}

```

...getmat

pr_align

Table 1 (cont')

```

for (nn = nm = 0, more = 1; more;) {
    for (i = more = 0; i < 2; i++) {
        /*
         * do we have more of this sequence?
         */
        if (!*ps[i])
            continue;

        more++;

        if (pp[i].spc) { /* leading space */
            *po[i]++ = ' ';
            pp[i].spc--;
        }
        else if (siz[i]) { /* in a gap */
            *po[i]++ = '-';
            siz[i]--;
        }
        else { /* we're putting a seq element
            */
            *po[i] = *ps[i];
            if (islower(*ps[i]))
                *ps[i] = toupper(*ps[i]);
            po[i]++;
            ps[i]++;

            /*
             * are we at next gap for this seq?
             */
            if (ni[i] == pp[i].x[ij[i]]) {
                /*
                 * we need to merge all gaps
                 * at this location
                 */
                siz[i] = pp[i].n[ij[i]++];
                while (ni[i] == pp[i].x[ij[i]])
                    siz[i] += pp[i].n[ij[i]++];
            }
            ni[i]++;
        }
    }
    if (++nn == olen || !more && nn) {
        dumpblock();
        for (i = 0; i < 2; i++)
            po[i] = out[i];
        nn = 0;
    }
}

/*
 * dump a block of lines, including numbers, stars: pr_align()
 */
static
dumpblock()
{
    register i;

    for (i = 0; i < 2; i++)
        *po[i]-- = '\0';
}

```

...pr_align

dumpblock

Table 1 (cont?)

```

(void) putc('\n', fx);
for (i = 0; i < 2; i++) {
    if (*out[i] && (*out[i] != ' ' || *(po[i]) != ' ')) {
        if (i == 0)
            nums(i);
        if (i == 0 && *out[1])
            stars();
        putline(i);
        if (i == 0 && *out[1])
            fprintf(fx, star);
        if (i == 1)
            nums(i);
    }
}
}

/*
 * put out a number line: dumpblock()
 */
static
nums(ix)
int ix; /* index in out[] holding seq line */
{
    char nline[P_LINE];
    register i, j;
    register char *pn, *px, *py;

    for (pn = nline, i = 0; i < lmax+P_SPC; i++, pn++)
        *pn = ' ';
    for (i = nc[ix], py = out[ix]; *py; py++, pn++) {
        if (*py == ' ' || *py == '-')
            *pn = ' ';
        else {
            if (i%10 == 0 || (i == 1 && nc[ix] != 1)) {
                j = (i < 0)? -i : i;
                for (px = pn; j /= 10, px--)
                    *px = j%10 + '0';
                if (i < 0)
                    *px = '-';
            }
            else
                *pn = ' ';
            i++;
        }
    }
    *pn = '\0';
    nc[ix] = i;
    for (pn = nline; *pn; pn++)
        (void) putc(*pn, fx);
    (void) putc('\n', fx);
}

/*
 * put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 */
static
putline(ix)
int ix;
{

```

...dumpblock

nums

putline

Table 1 (cont')

```

int          i;
register char *px;

for (px = nameX[ix], i = 0; *px && *px != '\0'; px++, i++)
    (void) putc(*px, fx);
for (; i < lmax+P_SPC; i++)
    (void) putc(' ', fx);

/* these count from 1:
 * ni[] is current element.(from 1)
 * nc[] is number at start of current line
 */
for (px = out[ix]; *px; px++)
    (void) putc(*px&0x7F, fx);
(void) putc('\n', fx);
}

/*
 * put a line of stars (seqs always in out[0], out[1]): dumpblock()
 */
static
stars()
{
    int          i;
    register char *p0, *p1, cx, *px;

    if (!*out[0] || (*out[0] == '\0' && *(po[0]) == '\0') ||
        !*out[1] || (*out[1] == '\0' && *(po[1]) == '\0'))
        return;
    px = star;
    for (i = lmax+P_SPC; i; i--)
        *px++ = ' ';

    for (p0 = out[0], p1 = out[1]; *p0 && *p1; p0++, p1++) {
        if (isalpha(*p0) && isalpha(*p1)) {
            if (xbrm[*p0-'A']&xbrm[*p1-'A']) {
                cx = '*';
                nm++;
            }
            else if (!dna && _day[*p0-'A'][*p1-'A'] > 0)
                cx = '.';
            else
                cx = ' ';
        }
        else
            cx = ' ';
        *px++ = cx;
    }
    *px++ = '\n';
    *px = '\0';
}

```

...putline

stars

Table 1 (cont')

```

/*
 * strip path or prefix from pn, return len: pr_align()
 */
static
stripname(pn)
    char *pn; /* file name (may be path) */
{
    register char *px, *py;

    py = 0;
    for (px = pn; *px; px++)
        if (*px == '/')
            py = px + 1;
    if (py)
        (void) strcpy(pn, py);
    return(strlen(pn));
}

```

stripname

Table 1 (cont')

```

/*
 * cleanup() -- cleanup any tmp file
 * getseq() -- read in seq, set dna, len, maxlen
 * g_calloc() -- calloc() with error checkin
 * readjumps() -- get the good jumps, from tmp file if necessary
 * writejumps() -- write a filled array of jumps to a tmp file: nw()
 */
#include "nw.h"
#include <sys/file.h>

char *jname = "/tmp/homgXXXXXX"; /* tmp file for jumps */
FILE *fj;

int cleanup(); /* cleanup tmp file */
long lseek();

/*
 * remove any tmp file if we blow
 */
cleanup(i)
int i;
{
    if (fj)
        (void) unlink(jname);
    exit(i);
}

/*
 * read, return ptr to seq, set dna, len, maxlen
 * skip lines starting with ';', '<', or '>'
 * seq in upper or lower case
 */
char *
getseq(file, len)
char *file; /* file name */
int *len; /* seq len */
{
    char line[1024], *pseq;
    register char *px, *py;
    int natgc, tlen;
    FILE *fp;

    if ((fp = fopen(file, "r")) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't read %s\n", prog, file);
        exit(1);
    }
    tlen = natgc = 0;
    while (fgets(line, 1024, fp)) {
        if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
            continue;
        for (px = line; *px != '\n'; px++)
            if (isupper(*px) || islower(*px))
                tlen++;
    }
    if ((pseq = malloc((unsigned)(tlen+6))) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: malloc() failed to get %d bytes for %s\n", prog, tlen+6, file);
        exit(1);
    }
    pseq[0] = pseq[1] = pseq[2] = pseq[3] = '\0';
}

```

cleanup

getseq

Table 1 (cont')

```

py = pseq + 4;
*len = lten;
rewind(fp);

while (fgets(line, 1024, fp)) {
    if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
        continue;
    for (px = line; *px != '\n'; px++) {
        if (isupper(*px))
            *py++ = *px;
        else if (islower(*px))
            *py++ = toupper(*px);
        if (index("ATGCU", *(py-1)))
            natgc++;
    }
    *py++ = '\0';
    *py = '\0';
    (void) fclose(fp);
    dna = natgc > (lten/3);
    return(pseq+4);
}

char *
g_malloc(msg, nx, sz)
char *msg;          /* program, calling routine */
int nx, sz;         /* number and size of elements */
{
    char *px, *calloc();

    if ((px = calloc((unsigned)nx, (unsigned)sz)) == 0) {
        if (*msg) {
            fprintf(stderr, "%s: g_malloc() failed %s (n=%d, sz=%d)\n", prog, msg, nx, sz);
            exit(1);
        }
    }
    return(px);
}

/*
 * get final jmps from dx[] or tmp file, set pp[], reset dmax: main()
 */
readjmps()
{
    int fd = -1;
    int siz, i0, i1;
    register i, j, xx;

    if (!f) {
        (void) fclose(f);
        if ((fd = open(jname, O_RDONLY, 0)) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't open() %s\n", prog, jname);
            cleanup(1);
        }
    }
    for (i = i0 = i1 = 0, dmax0 = dmax, xx = len0; ; i++) {
        while (1) {
            for (j = dx[dmax].ijmp; j >= 0 && dx[dmax].jp.x[j] >= xx; j--)
                ;

```

...getseq

g_malloc

readjmps

Table 1 (cont²)**...readjumps**

```

    if (j < 0 && dx[dmax].offset && fj) {
        (void) lseek(fd, dx[dmax].offset, 0);
        (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].jp, sizeof(struct jmp));
        (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].offset, sizeof(dx[dmax].offset));
        dx[dmax].ijmp = MAXJMP-1;
    }
    else
        break;
}
if (i >= JMPS) {
    fprintf(stderr, "%s: too many gaps in alignment\n", prog);
    cleanup(1);
}
if (j >= 0) {
    siz = dx[dmax].jp.n[j];
    xx = dx[dmax].jp.x[j];
    dmax += siz;
    if (siz < 0) { /* gap in second seq */
        pp[1].n[i1] = -siz;
        xx += siz;
        /* id = xx - yy + len1 - 1
        */
        pp[1].x[i1] = xx - dmax + len1 - 1;
        gapy++;
        ngapy -= siz;
/* ignore MAXGAP when doing endgaps */
        siz = (-siz < MAXGAP || endgaps)? -siz : MAXGAP;
        i1++;
    }
    else if (siz > 0) { /* gap in first seq */
        pp[0].n[i0] = siz;
        pp[0].x[i0] = xx;
        gapx++;
        ngapx += siz;
/* ignore MAXGAP when doing endgaps */
        siz = (siz < MAXGAP || endgaps)? siz : MAXGAP;
        i0++;
    }
}
else
    break;
}

/* reverse the order of jumps
*/
for (j = 0, i0--; j < i0; j++, i0--) {
    i = pp[0].n[j]; pp[0].n[j] = pp[0].n[i0]; pp[0].n[i0] = i;
    i = pp[0].x[j]; pp[0].x[j] = pp[0].x[i0]; pp[0].x[i0] = i;
}
for (j = 0, i1--; j < i1; j++, i1--) {
    i = pp[1].n[j]; pp[1].n[j] = pp[1].n[i1]; pp[1].n[i1] = i;
    i = pp[1].x[j]; pp[1].x[j] = pp[1].x[i1]; pp[1].x[i1] = i;
}
if (fd >= 0)
    (void) close(fd);
if (fj) {
    (void) unlink(jname);
    fj = 0;
    offset = 0;
}
}

```

Table 1 (cont')

```

/*
 * write a filled jmp struct offset of the prev one (if any): nw()
 */
writejmps(ix)                                     writejmps
{
    int ix;
    char *mktemp();
    if (!fj) {
        if (mktemp(jname) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't mktemp() %s\n", prog, jname);
            cleanup(1);
        }
        if ((fj = fopen(jname, "w")) == 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, jname);
            exit(1);
        }
    }
    (void) fwrite((char *)&dx[ix].jp, sizeof(struct jmp), 1, fj);
    (void) fwrite((char *)&dx[ix].offset, sizeof(dx[ix].offset), 1, fj);
}

```

Tabel 2

valk IL-17A/F	XXXXXXXXXXXXXXXXXX	(pikkus = 15 aminohapet)
võrdlusvalk	XXXXXXYYYYYYYYY	(pikkus = 12 aminohapet)

aminohapete järjestuse samasuse protsent =

(kahes polüpeptiidjärjestuses olevate aminohappejääkide, mis ühituvad identsetena, ALIGN-2-ga määratud arv) jagatuna (valgu IL-17A/F aminohappejääkide koguarvuga) = 5 : 1,5 = 33,3%

Tabel 3

valk IL-17A/F	XXXXXXXXXXXX	(pikkus = 10 aminohapet)
võrdlusvalk	XXXXXXYYYYYYYZZYZ	(pikkus = 15 aminohapet)

aminohapete järjestuse samasuse protsent =

(kahes polüpeptiidjärjestuses olevate aminohappejääkide, mis ühituvad identsetena, ALIGN-2-ga määratud arv) jagatuna (valgu IL-17A/F aminohappejääkide koguarvuga) = 5 : 10 = 50%

Tabel 4

IL-17A/F-i DNA	NNNNNNNNNNNNNNNN	(pikkus = 14 nukleotiidi)
võrdlus-DNA	NNNNNNLLLLLLLLLLL	(pikkus = 16 nukleotiidi)

nukleiinhappejärjestuse samasuse protsent =

(kahes nukleiinhappejärjestuses olevate nukleotiidide, mis ühituvad identsetena, ALIGN-2-ga määratud arv) jagatuna (IL-17A/F-i DNA nukleiinhappejärjestuse nukleotiidide koguarvuga)
 $= 6 : 14 = 42,9\%$

Tabel 5

IL-17A/F-i DNA	NNNNNNNNNNNNNN	(pikkus = 12 nukleotiidi)
võrdlus-DNA	NNNNLLLVV	(pikkus = 19 nukleotiidi)

nukleiinhappejärjestuse samasuse protsent =

(kahes nukleiinhappejärjestuses olevate nukleotiidide, mis ühituvad identsetena, ALIGN-2-ga määratud arv) jagatuna (IL-17A/F-i DNA nukleiinhappejärjestuse nukleotiidide koguarvuga)
 $= 4 : 12 = 33,3\%$

II Leiutisekohased kompositsioonid ja meetodid

A. Täispikad IL-17A/F-polüpeptiidid

(0141) Käesolevas leiutises pakutakse uudsena identifitseeritud ja eraldatud nukleotiidjärjestusi, mis kodeerivad polüpeptiide, mida käesolevas taotluses nimetatakse IL-17A/F-polüpeptiidideks. Konkreetselt on identifitseeritud ja eraldatud erinevaid IL-17A/F-polüpeptiide kodeerivad cDNA-d, nagu üksikasjalikumalt on avaldatud näidetes allpool.

B. IL-17A/F-polüpeptiidide variandid

(0142) Lisaks siin kirjeldatud täispikkadele natiivse järjestusega IL-17A/F-polüpeptiididele peetakse võimalikuks IL-17A/F-i variantide valmistamist. IL-17A/F-i variante võib valmistada, sisestades IL-17A/F-i DNA-sse nukleotiidide sobivaid muutusi ja/või sünteesides soovitud IL-17A/F-polüpeptiidi. Eriala asjatundja tunnustaks, et aminohapete muutused võivad muuta translatsioonijärgsed protsesse, nagu glükosüülimiskohtade arv või asendi muutmine või membraani ankurdamise omaduste muutmine.

(0143) Muutusi natiivses täispika järjestusega IL-17A/F-is või IL-17A/F-i erinevates siin kirjeldatud domeenides võib näiteks teha, kasutades konservatiivsete ja mittekonservatiivsete mutatsioonide tegemiseks mistahes meetodeid või juhiseid, mis on esitatud näiteks US patendis nr 5364934. Variatsioonid võivad olla IL-17A/F-i kodeeriva ühe või enama koodoni asendamine, eemaldamine või sisestamine, mille tulemuseks on IL-17A/F-i aminohapete järjestyse muutus võrreldes natiivse järjestusega IL-17A/F-ga. Valikuliselt on variatsioon vähemalt ühe aminohappe asendamine muu aminohappega IL-17A/F-i ühes või enamas domeenis. Selle, millise aminohappejäägi võib sisestada, asendada või eemaldada, ilma et see mõjutaks kahjulikult soovitud aktiivsust, määramise juhised võib leida, võrreldes IL-17A/F-i järjestust sellega homoloogsete tuntud valgumolekulidega ning minimeerides väga homoloogsetes piirkondades tehtavate aminohappeasenduste arvu. Aminohapete asendused võivad tuleneda ühe aminohappe asendamisest mõne teise aminohappega, millel on sarnased struktuursed ja/või keemilised omadused, nagu on leutsiini asendamine seriiniga, tähendades konservatiivsed aminohappeasendusi. Sisestused ja eemaldamised võivad valikuliselt olla vahemikus 1 kuni 5 aminohapet. Lubatud variatsiooni võib määrata süsteemselt, tehes järjestuses aminohapete sisestusi, eemaldamisi või asendusi ning testides saadud variante aktiivsuse suhtes, mis on täispikal või küpsel natiivsel järjestusel.

(0144) Siin pakutakse IL-17A/F-polüpeptiidi fragmente. Võrreldes näiteks täispika natiivse valguga võivad sellised fragmendid olla kärbitud N-terminusest või C-terminusest või neil võivad puududa sisemised jäägid. Kindlatel fragmentidel puuduvad aminohappejäägid, mis pole olulised IL-17A/F-polüpeptiidi soovitud bioloogiliseks aktiivsuseks.

(0145) IL-17A/F-i fragmendid võib valmistada ükskõik milliseiga arvukatest tavapärastest meetoditest. Soovitud peptiidifragmendid võib sünteesida keemiliselt. Alternatiivne lähene mine hõlmab IL-17A/F-i fragmentide tekitamist ensüümiga lõikamisega, näiteks töödeldes

valku ensüümiga, mille puhul on teada valkude lõikamine määratud aminohappejääkide juurest, või lõigates DNA-d sobivate restriktasididega ning eraldades soovitud fragmendi. Veel üks sobiv meetod hõlmab soovitud polüpeptiidifragmenti kodeeriva DNA eraldamist ja amplifitseerimist, näiteks polümeraasi ahelreaktsiooniga (PCR-ga). DNA fragmendi soovitud otsi määravaid oligonukleotiide kasutatakse PCR-is 5'- ja 3'-praimeritena. Eelistatavalt on IL-17A/F-polüpeptiidi fragmentidel vähemalt üks ühine bioloogiline ja/või immunoloogiline aktiivsus siin avaldatud natiivse IL-17A/F-polüpeptiidiga.

(0146) Konkreetsetes teostustes esinevad huvipakkuvad konservatiivsed asendused on näidatud tabeli 6 päises “eelistatavate asendustena”. Kui selliste asenduste tulemuseks on muutus bioloogilises aktiivsuses, võib sisestada märkimisväärsemaid muutusi, mis tabelis 6 on tähistatud iseloomulike asendustena või mida on lisaks kirjeldatud allpool aminohapete klassidele viidates, ning saadused skriinida.

Tabel 6

Algne jääk	Iseloomulikud asendused	Eelistatavad asendused
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn (N)	Gln, His, Lys, Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro, Ala	Ala
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, norleutsiin	Leu
Leu (L)	norleutsiin, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys (K)	Arg, Gln, Asn	Arg
Met (M)	Leu, Phe, Ile	Leu

Algne jääk	Iseloomulikud asendused	Eelistatavad asendused
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr, Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala, norleutsiin	Leu

(0147) IL-17A/F-polüpeptiidi bioloogilistes omadustes või immunoloogilises olemuses tehakse märkimisväärseid muudatusi, valides asendused, mis erinevad oluliselt oma mõjult (a) polüpeptiidahela toendi struktuurile, näiteks lehe või heeliksi konformatsioonile asenduse piirkonnas, (b) molekuli laengule või hüdrofoobsusele sihtmärkkohas või (c) külghela ulatusele. Looduslikud aminohapped võib rühmitada, tuginedes nende külghelate ühistele omadustele:

- (1) hüdrofoobsed: norleutsiin, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) neutraalsed hüdrofiilsed: Cys, Ser, Thr;
- (3) happelised: Asp, Glu;
- (4) aluselised: Asn, Gln, His, Lys, Arg;
- (5) jäägid, mis mõjutavad ahela suunda: Gly, Pro; ning
- (6) aromaatsed: Trp, Tyr, Phe.

(0148) Mittekonservatiivsed asendused toovad kaasa ühte nendest klassidest kuuluva liikme vahetuse mõnesse muusse klassi kuuluva vastu. Selliselt asendatud jäägid võib sisestada ka konservatiivse asenduse kohtadesse või, enam eelistatavalt, ülejäänud (mittekonserveerunud) kohtadesse.

(0149) Variatsioone võib teha, kasutades tehnika tasemes tuntud meetodeid, nagu oligonukleotiidi-vahendatud (kohtsuunatud) mutagenees,alaniiniga skaneerimine ja PCR-mutagenees. Kohtsuunatud mutageneesi (Carter *et al.*, Nucl. Acids Res., 13:4331 (1986); Zoller *et*

al., Nucl. Acids Res., 10:6487 (1987)), kassetmutageneesi (Wells *et al.*, Gene, 34:315 (1985)), restriksioon-selektsioon-muatgeneesi (Wells *et al.*, Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317:415 (1986)) või muid tuntud meetodeid võib rakendada kloonitud DNA-le, et toota IL-17A/F-i variandi DNA.

(0150) Aminohapetega skaneerivat analüüsi võib samuti kasutada, et pidevas järjestuses identifitseerida üks või enam aminohapet. Eelistatavate skaneeritavate aminohapete hulgas on suhteliselt väiksed ja neutraalsed aminohapped. Sellised aminohapped hõlmavadalaniini, glütsiini, seriini ja tsüsteiini. Selles rühmas on tüüpiliselt eelistatav aminohape skaneerimiseksalaniin, kuna kõrvaldakse β -süsiniku küljes olev külghel ning variandi peaahela konformatsiooni muutumine on vähem tõenäoline (Cunningham, Wells, Science, 244:1081-1085 (1989)). Samuti onalaniin tüüpiliselt eelistatav, kuna see on kõige tavalisem aminohape. Lisaks leidub seda sageli nii peidetud kui eksponeeritud asendites (Creighton, The Proteins, (W. H. Freeman & Co., N. Y.); Chothia, J. Mol. Biol., 150:1 (1976)). Kuialaniiniga asendamisega ei saada piisavates kogustes variante, võib kasutada isosteerset aminohapet.

C. IL-17A/F-i muudatused

(0151) IL-17A/F-i kovalentsed muudatused on hõlmatud käesoleva leiutise ulatusega. Kovalentse muudatuse üks tüüp hõlmab IL-17A/F-polüpeptiidis sihtmärgiks olevate aminohapetjääkide reageerimist orgaanilise derivaativa agensiga, mis on võimeline reageerima valitud külghelate või IL-17A/F-i N- või C-terminaalsete jääkidega. Derivaatimine bifunktsionaalsete agensitega on kasutatav näiteks IL-17A/F-i ristsidumiseks vees mittelahustuva toendmaatriksi või pinnaga ning vastupidi, et kasutada seda IL-17A/F-vastaste antikehade puhastamiseks. Harilikult kasutatavad ristsiduvad agensid hõlmavad näiteks 1-bis(diasoatsetüül)-2-fenüületaani, glutaaraldehüüdi, N-hüdroksüsuktsiinimiidestreib, 4-asidosalitsüülhappe estreib, homobifunktsionaalseid imidoestreib, sealhulgas disuktsiinimidüülestreid, nagu 3,3'-ditiobis(suktsiniimidüülpropionaat), bifunktsionaalseid maleimiide, nagu bis-N-maleimido-1,8-oktaan, ning agenseid, nagu metüül-3-((p-asidofenüül)ditio)propioimidaat.

(0152) Muud muudatused hõlmavad glutaminüül- ja asparginüüljääkide desamiidimist vastavateks glutamüül- ja aspartüüljääkideks, proliini ja lüsiini hüdroksüülimist, serüül- või treonüüljääkide hüdroksüülrühmade fosforüülimist, lüsiini, arginiini ja histidiini külghelate α -aminorühmade metüülimist (T. E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties,

W. H. Freeman & Co., San Francisco, 79-86 (1983)), N-terminaalse amiini atsetüülumist ja mistahes C-terminaalse karboksüülrühma amiidimist.

(0153) IL-17A/F-polüpeptiidi veel ühte tüüpi kovalentne muutus, mis on hõlmatud selle leiutise ulatusega, hõlmab polüpeptiidi natiivse glükosüülimismustri muutmist. Siinsetel eesmärkidel on väljend “polüpeptiidi natiivse glükosüülimismustri muutmine” määratud tähendada IL-17A/F-i natiivses järjestuses leiduva ühe või enama süsivesik-molekuliosa eemaldamist (eemaldades vastava glükosüülimiskoha või eemaldades glükosüülimise keemilisel ja/või ensümaatilisel viisil) ning/või ühe või enama süsivesik-molekuliosa, mida IL-17A/F-i natiivses järjestuses ei leidu, lisamist. Lisaks hõlmab see väljend natiivsete valkude glükosüülimise kvalitatiivseid muutusi, hõlmates ka erinevate süsivesik-molekulosade olemuse ja osakaalude muutust.

(0154) IL-17A/F-polüpeptiidi glükosüülimiskohtade lisamine võib teostada aminohapete järjestuse muutmisega. Muutuse võib teha näiteks ühe või enama seriini- või treoniinjäägi lisamise või asendamisega natiivse järjestusega IL-17A/F-s (O-seoseliste glükosüülimiskohade puhul). IL-17A/F-i aminohapete järjestust võib valikuliselt muuta, tehes muudatusi DNA tasemel, eriti IL-17A/F-polüpeptiidi kodeeriva DNA muteerimisega eelnevalt valitud aluste kohas selliselt, et tekitatakse koodonid, mis transleeritakse soovitud aminohapeteks.

(0155) IL-17A/F-polüpeptiidis süsivesik-molekuliosade arvu suurendamise veel üheks viisiks on glükosiidide keemiline või ensümaatiline sidumine polüpeptiidiga. Selliseid meetodeid on tehnika tasemes kirjeldatud, näiteks üllitistes WO87/05330, mis on avaldatud 11. septembril 1987, ning Aplin, Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., 259-306 (1981).

(0156) IL-17A/F-polüpeptiidis esinevate süsivesik-molekuliosad võib eemaldada keemiliselt või ensümaatiliselt või asendates mutatsioonidega koodonid, mis kodeerivad glükosüülimise sihtmärkideks olevaid aminohappeid. Keemilise deglükosüülimise meetodid on tehnika tasemes tuntud ja kirjeldatud näiteks üllitistes Hakimuddin *et al.*, Arch. Biochem. Biophys., 259:52 (1987) ja Edge *et al.*, Anal. Biochem., 118:131 (1981). Polüpeptiidides olevate süsivesik-molekuliosade ensümaatilise lõikamise võib saavutada mitmesuguste endo- ja eksoglükosidaaside kasutamisega, nagu on kirjeldatud üllitises Thotakura *et al.*, Meth. Enzymol., 138:350 (1987).

(0157) IL-17A/F-i veel ühte tüüpi kovalentne muutus hõlmab IL-17A/F-polüpeptiidi ühendamist ühega mitmesugustest mittevalgulistest polümeeridest, näiteks polüetüleenglükooli

(PEG-i), polüpropüleenglükooli või polüoksüalküleenidega, viisil, mis on esitatud US patendis nr 4640835, 4496689, 4301144, 4670417, 4791192 või 4179337.

(0158) Käesoleva leiutise kohast IL-17A/F-i võib muuta ka viisil, mille kohaselt moodustub kimäärne molekul, mis hõlmab mõne muu heteroloogse polüpeptiidi või aminohapete järjestusega liidetud IL-17A/F-i.

(0159) Ühes teostuses hõlmab selline kimäärne molekul IL-17A/F-i mis on liidetud märgispolüpeptiidiga, mis pakub epitoopi, millega märgisevastasne antikeha võib selektiivselt seonduda. Üldiselt paigutatakse epitoopmärgis IL-17A/F-i amino- või karboksüterminusse. Selliste IL-17A/F-i epitoopmärgistatud vormide esinemist võib tuvastada, kasutades märgispolüpeptiidi vastast antikeha. Samuti võimaldab epitoopmärgisega varustamine IL-17A/F-i hõlpsat puhastamist afiinsuspuhastamisega, kasutades märgisevastast antikeha või muud tüüpi epitoopmärgisega seonduvat afiinsusmaatriksit. Tehnika tasemes on hästi tuntud mitmesugused märgispolüpeptiidid ja neile vastavad antikehad. Näited hõlmavad polühistidiin- (poly-His) või polühistidiin-glütsiinmärgiseid (poly-His-Gly), gripiviiruse HA-märgispolüpeptiidi ja selle vastast antikeha 12CA5 (Field *et al.*, Mol. Cell. Biol., 8:2159-2165 (1988)), thecmyc-märgist ja selle vastaseid antikehasid 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 ja 9E10 (Evan *et al.*, Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616 (1985)) ning lihtherpesviiruse glükovaalgu D (gD) märgist ja selle vastast antikeha (Paborsky *et al.*, Protein Engineering, 3(6):547-553 (1990)). Muud märgispolüpeptiidid hõlmavad Flag-peptiidi (Hop *et al.*, BioTechnology, 6:1204-1210 (1988)), epitooppeptiidi KT3 (Martin *et al.*, Science, 255:192-194 (1992)), α -tubuliini epitooppeptiidi (Skinner *et al.*, J. Biol. Chem., 266:15163-15166 (1991)) ning T7 geeni 10 kodeeritava valgu peptiidmärgist (Lutz-Freyermuth *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6393-6397 (1990)).

(0160) Alternatiivses teostuses võib kimäärne molekul hõlmata IL-17A/F-i liidetuna immunoglobuliini või immunoglobuliini konkreetse piirkonnaga. Kimäärse molekuli bivalentse vormi (mida nimetatakse ka "immuno adhesiiniks") tarvis võib selliselt liita IgG-molekuli Fc-piirkonna. Eelistatavalt hõlmavad Ig-ga liitmised IL-17A/F-polüpeptiidi lahustuva vormiga (milles membraani läbiv piirkond on eemaldatud või inaktiveeritud) asendamist vähemalt ühe varieeruva, Ig-molekulis esinevas piirkonnas. Eriti eelistatavas teostuses hõlmab immunoglobuliiniga liitmine molekuli IgG₁ liigend-, C_H2- ja C_H3-piirkondi või liigend-, C_H1-, C_H2- ja C_H3-piirkondi. Immunoglobuliiniga liitvalkude tootmise kohta vaadake ka US patenti nr 5428130, mis on välja antud 27. juunil 1995.

(0161) Veel ühes lisateostuses võivad leiutisekohased IL-17A/F-polüpeptiidid olla lisaks muudetud viisil, mille kohaselt moodustub kimäärne molekul, mis hõlmab leutsiinihargiga liidetud IL-17A/F-polüpeptiidi. Tehnika tasemes on kirjeldatud mitmesuguseid leutsiinhark-polüpeptiide, vaadake näiteks üllitisi Landschulz *et al.*, Science, 240:1759 (1988); WO94/10308; Hoppe *et al.*, FEBS Letters, 344:1991 (1994); Maniatis *et al.*, Nature, 341:24 (1989). Arvatakse, et IL-17A/F-polüpeptiidiga liidetud leutsiinihargi kasutamine võib olla soovitud, et abistada lahustuva IL-17A/F-polüpeptiidi dimeriseerumist või trimeriseerumist lahuses. Eriala asjatundjad tunnustaks, et leutsiinihargi võib liita IL-17A/F-i molekuli N- või C-terminusega.

D. IL-17A/F-i valmistamine

(0162) Peamiselt käsitleb allpool toodud kirjeldus IL-17A/F-i tootmist, kultiveerides IL-17A/F-i nukleiinhapet sisaldava vektoriga transformeeritud või transfekteeeritud rakke. Loomulikult peetakse võimalikuks, et IL-17A/F-i valmistamiseks võib rakendada alternatiivseid meetodeid, mis on tehnika tasemes hästi tuntud. Näiteks võib IL-17A/F-i järjestust või selle osi toota otsese peptiidsünteesiga, kasutades tahke faasi meetodeid (vaadake näiteks üllitisi Stewart *et al.*, Solid-Phase Peptide Synthesis, W. H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969) ja Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154 (1963)). *In vitro* valgusünteesi võib teostada, kasutades näiteks käsitsi teostatavaid või automaatseid meetodeid. Automaatse sünteesi võib teostada, kasutades näiteks firma Applied Biosystems (Foster City, CA) peptiidsüntesaatorit ja valmistaja juhiseid. IL-17A/F-i erinevaid osi võib eraldi keemiliselt sünteesida ja kombineerida, kasutades täispika IL-17A/F-i tootmiseks keemilisi või ensümaatilisi meetodeid.

1. IL-17A/F-i kodeeriva DNA eraldamine

(0163) IL-17A/F-i kodeeriva DNA võib saada cDNA-kogust, mis on valmistatud koest, mille kohta arvatakse, et see sisaldab ja ekspresseerib IL-17A/F-i mRNA-d tuvastataval tasemel. Vastavalt võib inimese IL-17A/F-i DNA sobivalt saada inimese koest valmistatud cDNA-kogust, nagu on kirjeldatud näidetes. IL-17A/F-i kodeeriva geeni võib saada ka genoomsest kogust või tuntud sünteetiliste toimingutega (näiteks nukleiinhappe automaatse sünteesiga).

(0164) Kogusid võib skriinida sondidega (nagu IL-17A/F-vastased antikehad või vähemalt umbes 20-80 aluse pikkused oligonukleotiidid), mis on kujundatud huvipakkuva geeni või sellega kodeeritava valgu identifitseerimiseks. cDNA- või genoomse kogu skriinimise valitud sondiga võib teostada, kasutades standardseid toiminguid, nagu on kirjeldatud teoses Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). IL-17A/F-i kodeeriva geeni eraldamise alternatiivseks viisiks on PCR-metoodika kasutamine (Sambrook *et al.*, *supra*; Dieffenbach *et al.*, *PCR Primer: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)).

(0165) Allpool toodud näitetes on kirjeldatud cDNA-kogu skriinimise meetodeid. Sondidena valitud oligonukleotiidjärjestused peaksid olema piisavalt pikad ja piisavalt ühetähenduslikud, et minimeerida valepositiivseid signaale. Eelistatavalt on oligonukleotiid märgistatud selliselt, et seda võib tuvastada skriinitavas kogus oleva DNA-ga hübridiseerumisel. Märgistamise meetodid on tehnika tasemes hästi tuntud ja hõlmavad radiomärgiste nagu fosformärgisega ATP, biotinüülimise ja ensüümmärgise kasutamist. Mõõdukalt karme ja väga karme tingimusi hõlmavaid hübridiseerimistingimusi pakutakse teoses Sambrook *et al.*, *supra*.

(0166) Selliste kogude skriinimise meetoditega identifitseeritud järjestusi võib võrrelda ja joondada muude tuntud järjestustega, mida hoiustatakse ja mis on kättesaadavad avalikes andmebaasides nagu GenBank või muudes eraomanduses olevates järjestuste andmebaasides. Järjestuse samasuse (aminohapete või nukleotiidide tasemel) molekuli määratletud piirkonnades või täispikas järjestuses võib määrata, kasutades tehnika tasemes tuntud meetodeid ja selliselt, nagu siin on kirjeldatud.

(0167) Valku kodeeriva järjestusega nukleiinhappeid võib saada, skriinides cDNA- või genoomseid kogusid, kasutades tuletatud aminohapete järjestust, mis on siin esmakordselt avaldatud, ning vajadusel kasutades tavapärast praimerit pikendamist, nagu on kirjeldatud teoses Sambrook *et al.*, *supra*, et tuvastada mRNA-d, mis ei pruugi olla pöördtranskribeeritud cDNA-ks, prekursorid ja töötlemise vaheühendeid.

2. Peremeesrakkude selekteerimine ja transformeerimine

(0168) IL-17A/F-i tootmiseks transfekteeritakse või transformeeritakse peremeesrakke siin kirjeldatud ekspressiooni- või kloonimisvektoritega ning neid kultiveeritakse tavapärases

toitekeskkonnas, mis on muudetud sobivaks promootorite indutseerimiseks, transformantide selekteerimiseks või soovitud järjestusi sisaldavate geenide amplifitseerimiseks. Eriala asjatundja võib kultiveerimistingimused, nagu keskkond, temperatuur, pH ja muud taolised, valida ilma liigse katsetamiseta. Üldiselt võib rakukultuuride tootlikkuse maksimeerimise põhimõtted, eeskirjad ja praktilised meetodid leida teostest *Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach*, M. Butler, toimetaja (IRL Press, 1991) ja Sambrook *et al.*, *supra*.

(0169) Eukarüootse raku transfekteerimise ja prokarüootse raku transformeerimise meetodid, näiteks CaCl_2 , CaPO_4 -ga, liposoomvahendatud tarnsfekteerimine ja elektroporeerimine, on eriala tavalisele asjatundjale tuntud. Sõltuvalt kasutatavast peremeesrakust teostatakse transformeerimine, kasutades sellistele rakkudele sobivaid standardseid meetodeid. Üldiselt kasutatakse prokarüootide puhul kaltsiumiga töötlemist, milles kasutatakse kaltsiumkloriidi, nagu on kirjeldatud teoses Sambrook *et al.*, *supra*, või elektroporeerimist. Kindlate taimerakkude transformeerimiseks kasutatakse nakatamist *Agrobacterium tumefaciens*'iga, nagu on kirjeldatud üllitistes Shaw *et al.*, *Gene*, 23:315 (1983) ja WO89/05859, mis on avaldatud 29. juunil 1989. Selliste rakukestadeta imetajarakkude puhul võib kasutada kaltsiumfosfaadiga sadestamise meetodit, mis on üllitises Graham *et van der Eb*, *Virology*, 52:456-457 (1978). Imetaja peremeesrakusüsteemi transfekteerimiste üldisi eripärasid on kirjeldatud US patendis nr 4399216. Tüüpiliselt teostatakse pärmide transformeerimine vastavalt üllitistes Van Solingen *et al.*, *J. Bact.*, 130:946 (1977) ja Hsiao *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 76:3829 (1979) toodud meetodile. Siiski võib DNA rakkudesse sisestamiseks kasutada ka muid meetodeid, nagu mikrosüstimine tuuma, elektroporeerimine, terviklike rakkude liitmine bakteri protoplastiga või polükatioonide, näiteks polübreeni, polüornitiini kasutamine. Imetajarakkude transformeerimise erinevate meetodite kohta vaadake üllitisi Keown *et al.*, *Methods in Enzymology*, 185:527-537 (1990) ja Mansour *et al.*, *Nature*, 336:348-352 (1988).

(0170) Siin hõlmavad kloonimiseks ja vektorites DNA ekspresseerimiseks sobivad peremeesrakud prokarüootide, pärmide või kõrgemate eukarüootide rakke. Sobivad prokarüoodid hõlmavad, nendega piirdumata, pärisbaktereid, nagu näiteks gram-positiivsed või gram-negatiivsed organismid, ning sugukonda *Enterobacteriaceae* kuuluvaid, nagu on *E. coli*. *E. coli* mitmesugused tüved, nagu *E. coli* K12 tüvi MM294 (ATCC 31446), *E. coli* X1776 (ATCC 31537), *E. coli* tüvi W3110 (ATCC 27325) ja K5 772 (ATCC 53635), on avalikult saadavad. Muud sobivad prokarüootsed peremeesrakud hõlmavad sugukonda *Enterobacteriaceae* kuuluvaid, nagu on *Escherichia*, näiteks *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*,

Salmonella, näiteks *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, näiteks *Serratia marcescans*, ja *Shigella* ning lisaks *Bacilli*, nagu *B. subtilis* ja *B. licheniformis* (näiteks *B. licheniformis* 41P, mida on kirjeldatud üllitises DD 266710, mis on avaldatud 12. aprillil 1989), *Pseudomonas*, nagu *P. aeruginosa*, ja *Streptomyces*. Need näited on pigem illustreerivad kui piiravad. Tüvi W3110 on üks eriti eelistatav peremees- või eellastüvi, kuna see on harilik peremeestüvi rekombinantse IL-17A/F-i saamiseks fermenteerimisega. Eelistatavalt sekreteerib peremees-rakk minimaalses koguses proteolüütilisi ensüüme. Näiteks võib tüve W3110 muuta, et avalduks geneetiline mutatsioon peremehe endogeenseid valke kodeerivates geenides, näideteks on peremehed, mis hõlmavad *E. coli* W3110 tüve 1A2, millel on täielik genotüüp *tonA*, *E. coli* W3110 tüve 9E4, millel on täielik genotüüp *tonA ptr3*, *E. coli* W3110 tüve 27C7 (ATCC 55244), millel on täielik genotüüp *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT kan*, *E. coli* W3110 tüve 37D6, millel on täielik genotüüp *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT rbs7 ilvG kan*, *E. coli* W3110 tüve 40B4, mis on tüvi 37D6, millel on *degP* deletsiooniga kanamütsiini suhtes resistentsuseta mutatsioon, ning mutantse periplasmaatilise proteaasiga *E. coli* tüve, mis on avaldatud US patendis 4946783, mis on välja antud 7 augustil 1990. Alternatiivselt sobivad *in vitro* kloonimismeetodid, näiteks PCR või nukleiinhappe polümeeraasi muud reaktsioonid.

(0171) Lisaks prokarüootidele sobivad peremeestena IL-17A/F-i kodeerivate vektorite kloonimiseks või ekspresseerimiseks eukarüootsed mikroobid, nagu filamentsed seemed või pärmid. *Saccharomyces cerevisiae* on harilikult kasutatav madalamate eukarüootide hulka kuuluv peremees-mikroorganism. Muud hõlmavad järgnevaid: *Schizosaccharomyces pombe* (Beach *et Nurse*, Nature, 290: 140 (1981); EP 139383, mis on avaldatud 2. mail 1985); *Kluyveromyces*-peremehed (US patent nr 4943529; Fleer *et al.*, Bio/Technology, 9:968-975 (1991)), nagu näiteks *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt *et al.*, J. Bacteriol., 154(2):737-742 (1983)), *K. fragilis* (ATCC 12424), *K. bulgaricus* (ATCC 16045), *K. wickeramii* (ATCC 24178), *K. waltii* (ATCC 56500), *K. drosophilorum* (ATCC 36906; Van den Berg *et al.*, Bio/Technology, 8:135 (1990)), *K. thermotolerans* ja *K. marxianus*, *Yarrowia* (EP 402226), *Pichia pastoris* (EP 183070; Sreekrishna *et al.*, J. Basic Microbiol., 28:265-278 (1988)), *Candida*, *Trichoderma reesia* (EP 244234), *Neurospora crassa* (Case *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:5259-5263 (1979)), *Schwanniomyces*, nagu *Schwanniomyces occidentalis* (EP 394538, mis on avaldatud 31. oktoobril 1990) ning filamentsed seemed, nagu näiteks *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolyptocladium* (WO91/00357,

mis on avaldatud 10. jaanuaril 1991) ja *Aspergillus-peremehed*, nagu *A. nidulans* (Ballance *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 112:284-289 (1983); Tilburn *et al.*, Gene, 26:205-221 (1983); Yelton *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:1470-1474 (1984)) ja *A. niger* (Kelly, Hynes, EMBO J., 4:475-479 (1985)). Siin on kasutatavad metülotroofsed pärmid, mis hõlmavad nendega piirdumata, neid, mis on võimelised kasvama metanooli juuresolekul ja mis valitakse pärme *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis* ja *Rhodotorula* sisaldavast rühmast. Sellele pärmide klassile iseloomulike liikmete loetelu võib leida üllitisest C. Anthony, The Biochemistry of Methylotrophs, 269 (1982).

(0172) Glükosüülitud IL-17A/F-i ekspresseerimiseks sobivad peremeesrakud pärinevad hulk-raksetest organismidest. Selgrootutest pärinevate rakkude näited hõlmavad putukarakke, nagu *Drosophila* S2 ja *Spodoptera* Sf9 või *Spodoptera* High 5 rakud, ning lisaks taimerakke. Imetajast pärinevate kasutatavate peremees-rakuliinide näited hõlmavad ahvi neeru CV1-liini, mis on transformeeritud SV40-ga (COS-7, ATCC CRL 1651), inimese embrüonaalse neeruraku liini (293 või 293-rakud, mis on alamkloonitud kasvuks suspensioonikultuuris, Graham *et al.*, J. Gen Virol., 36:59 (1977)), hiina hamstri munasarjarakke/-DHFR (CHO, Urlaub *et Chasin*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)), hiire Sertoli rakke (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980)), inimese kopsurakke (W138, ATCC CCL 75), inimese maksarakke (Hep G2, HB 8065) ning hiire piimanäärme kasvaja rakke MMT 060562, ATCC CCL51). Sobiva peremeesraku suudab valida eriala asjatundja.

3. Replitseeruva vektori valimine ja kasutamine

(0173) IL-17A/F-i kodeeriva nukleiinhappe (näiteks cDNA või genoomse DNA) võib replitseeruvasse vektorisse sisestada kloonimiseks (DNA amplifitseerimiseks) või ekspresseerimiseks. Avalikult on saadavad mitmesugused vektorid. Vektor võib olla näiteks plasmidi, kosmiidi, viirusosakese või faagi vormis. Sobiva nukleiinhappejärjestuse võib vektorisse sisestada mitmesuguste toimingutega. Üldiselt sisestatakse DNA sobiva(te)sse endonukleaasi äratundmiskohta(desse), kasutades tehnikat tasemes tuntud meetodeid. Üldiselt hõlmavad vektori koostisosad, nendega piirdumata, ühte või enamat signaaljärjestust, replikatsiooni alguspunkti, ühte või enamat markergeeni, enhanserelementi, promootorit ja transkriptsiooni lõpetamise järjestust. Nendest koostisosadest ühte või enamat sisaldavate sobivate vektorite

konstrueerimisel rakendatakse standardseid ligeerimismeetodeid, mis on eriala asjatundjale tuntud.

(0174) IL-17A/F-i võib rekombinantselt toota mitte ainult otseselt, vaid ka kui liitpolüpeptiidi heteroloogse polüpeptiidiga, milleks võib olla signaaljärjestus või muu polüpeptiid, millel on küpse valgu või polüpeptiidi N-terminuses spetsiifiline lõikamiskoht. Üldiselt võib signaaljärjestus olla vektori koostisosa või see võib olla osa IL-17A/F-i kodeerivast DNA-st, mis sisestatakse vektorisse. Signaaljärjestus võib olla prokarüootne signaaljärjestus, mis valitakse näiteks aluselise fosfataasi, penitsillinaasi, Ipp või kuumastabiilse enterotoksiin II liiderjärjestuste rühmast. Pärmist sekreteerimiseks võib signaaljärjestus olla näiteks pärmis invertaasi liiderjärjestus, α -faktori liiderjärjestus (sealhulgas *Saccharomyces*'e ja *Kluyveromyces*'e liiderjärjestused; viimast on kirjeldatud US patendis nr 5010182) või happelise fosfataasi liiderjärjestus, *C. albicans* glükoamülaasi liiderjärjestus (EP 362179, mis on avaldatud 4. aprillil 1990) või üllitises WO90/13646, mis on avaldatud 15. novembril 1990, kirjeldatud signaal. Ekspresseerimiseks imetajarakkudes võib valgu otseseks sekreteerimiseks kasutada imetaja signaaljärjestusi, nagu on sama või lähedase liigi sekreteeritavatest polüpeptiididest pärinevad signaaljärjestused, ning lisaks sekreteerimise liiderjärjestusi viirustest.

(0175) Nii ekspressiooni- kui kloonimisvektorid sisaldavad nukleiinhappejärjestust, mis võimaldab vektoril replitseeruda ühes või enamas valitud peremeesrakus. Sellised järjestused on hästi tuntud erinevate bakterite, pärmis ja viiruste jaoks. Replikatsiooni alguspunkt plasmiidist pBR322 sobib enamusele gram-negatiivsetele bakteritele, plasmidi 2 μ replikatsiooni alguspunkt sobib pärmile ning mitmesugused viiruste alguspunktid (SV40, polüoomi-, adeno-viirus, VSV või BPV) on kasutatavad kloonimisvektorite puhul imetajarakkudes.

(0176) Tüüpiliselt sisaldavad ekspressiooni- ja kloonimisvektorid selektsioonigeeni, mida nimetatakse ka selektsioonimarkeriks. Tüüpilised selektsioonigeenid kodeerivad valke, mis (a) annavad resistentsuse antibiootikumide või muude toksiinide suhtes, näiteks ampitsilliini, neomütsiini, metotreksaadi või tetratsükliini suhtes, (b) täiendavad auksotroofseid puudeid, või (c) varustavad kriitiliste toitainetega, mis ei ole kättesaadavad komplekssest keskkonnast, selle näiteks on *Bacilli* D-alaniini ratsemaasi kodeeriv geen.

(0177) Imetajarakkudele sobivate selektsioonimarkerite näideteks, nagu DHFR või tümidiini kinaas, on sellised, mis võimaldavad identifitseerida IL-17A/F-i kodeeriva nukleiinhappe omastamiseks kompetentseid rakke. Metsiktüüpi DHFR-i kasutamisel on sobivaks peremeesrakuks DHFR-i aktiivsuse suhtes puudulik CHO-rakuliin, mis valmistatakse ja paljundatakse,

nagu on kirjeldatud üllitises Urlaub *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980). Pärmiss kasutamiseks sobib selektsioonigeen *trp1*, mis esineb pärmi plasmiidis YRp7 (Stinchcomb *et al.*, Nature, 282:39 (1979); Kingsman *et al.*, Gene, 7:141 (1979); Tschemper *et al.*, Gene, 10:157 (1980)). Geen *trp1* pakub selektsioonimarkerit mutantse pärmitüve, näiteks ATCC nr 44076 või PEP4-1 (Jones, Genetics, 85:12 (1977)) tarvis, millel puudub võime kasvada trüptofaani juuresolekul.

(0178) Tavaliselt sisaldavad ekspressiooni- ja kloonimisvektorid promootorit, mis mRNA sünteesi juhtimiseks on toimivalt ühendatud IL-17A/F-i kodeeriva nukleiinhappejärjestusega. Promootorid, mida tuntakse ära mitmesuguste võimalike peremeesrakkude poolt, on hästi tuntud. Prokarüootsete peremeestega kasutatavad promootorid hõlmavad β -laktamaasi ja laktoosi promootorsüsteeme (Chang *et al.*, Nature, 275:615 (1978); Goeddel *et al.*, Nature, 281:544 (1979)), aluselise fosfataasi, trüptofaani (*trp*) promootorsüsteemi (Goeddel, Nucleic Acids Res., 8:4057 (1980); EP 36776) ning hübriidseid promootoreid nagu *tac*-promootor (deBoer *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:21-25 (1983)). Bakteriaalsete süsteemidega kasutatavad promootorid sisaldaks ka Shine-Dalgarno (S. D.) järjestust, mis on toimivalt ühendatud IL-17A/F-i kodeeriva DNA-ga.

(0179) Sobivate promootorjärjestuste näited pärm-peremeestes kasutamiseks hõlmavad 3-fosfoglutseraadi kinaasi (Hitzeman *et al.*, J. Biol. Chem., 255:2073 (1980)) või muude glükolüütiliste ensüümide (Hess *et al.*, J. Adv. Enzyme Reg., 7:149 (1968); Holland, Biochemistry, 17:4900 (1978)), nagu enolaas, glütseeraldehüd-3-fosfaadi dehüdrogenaas, heksokinaas, püruvaadi dekarboksülaas, fosfofruktokinaas, glükoos-6-fosfaadi isomeraas, 3-fosfoglutseraadi mutaas, püruvaadi kinaas, triosefosfaadi isomeraas, fosfoglükoosi isomeeraas ja glükokinaas, promootoreid.

(0180) Muud indutseeritavad pärmipromootorid, millel on kasvutingimustega kontrollitud transkriptsiooni lisaeelis, on alkoholi dehüdrogenaasi 2, isotsütokroom C, happelise fosfataasi, lämmastiku ainevahetusega seotud lagundavate ensüümide, metallotioniini, glütseeraldehüd-3-fosfaadi dehüdrogenaasi ning maltoosi ja galaktoosi kasutamise eest vastutavate ensüümide promootorpiirkonnad. Lisaks on pärmiss ekspresseerimiseks kasutatavaid sobivaid vektoreid ja promootoreid kirjeldatud üllitises EP 73657.

(0181) Imetaja-peremeesrakkudes kontrollitakse vektoritelt IL-17A/F-i transkriptsiooni näiteks viiruste, nagu polüoomiviirus, lindude rõugeviirus (*fowlpox virus*) (UK 2211504, avaldatud 5. juulil 1989), adenoviirus (nagu adenoviirus 2), veise papilloomiviirus, lindude

sarkoomiviirus, tsütomegaloviirus, retroviirus, B-hepatiidiviirus ja ahviviirus 40 (SV40) geenidest saadud promootorite, heteroloogsetest imetajatest pärinevate promootoritega, näiteks aktiini promootori või immunoglobuliini promootori ning kuumašoki (*heat-shock*) promootoritega, tingimusel, et sellised promootorid sobivad peremeesraku süsteemidega.

(0182) IL-17A/F-i kodeeriva DNA transkribeerimine kõrgemates eukarüootides võib olla suurenenud, kui vektorisse on sisestatud enhanserjärjestus. Enhanserid on *cis*-toimelised DNA-elementid, mis harilikult on 10 kuni 300 bp pikad, ning need toimivad promootorile, suurendades sellelt transkribeerimist. Praegu tuntakse paljusid imetajate geenidest (globiin, elastaas, albumiin, α -fötovalk ja insuliin) pärinevaid enhanserjärjestusi. Tüüpiliselt kasutatakse siiski eukarüootse raku viirusest pärinevat enhanserit. Näited hõlmavad SV40 enhanserit replikatsiooni alguspunkti hilisest alast (bp 100-270), tsütomegaloviiruse varajase promootori enhanserit, polüoomiviiruse enhanserit replikatsiooni alguspunkti hilisest alast ning adenoviiruse enhansereid. Enhanseri võib vektorisse liita IL-17A/F-i kodeeriva järjestuse suhtes 5' - või 3' -asendis, kuid eelistatavalt paikneb see promootorist 5' -suunas.

(0183) Eukarüootsetes peremeesrakkudes (pärimi-, seene-, putuka-, taime- looma-, inimese- või muude hulkraksete organismide tuumaga rakkudes) kasutatavad ekspressioonivektorid sisaldavad ka järjestusi, mis on vajalikud transkriptsiooni lõpetamiseks ja mRNA stabiliseerimiseks. Harilikult on sellised järjestused saadavad eukarüootsete rakkude või viiruste DNA-de või cDNA-de 5' - ning mõnikord 3' -mittetransleeritavatest piirkondadest. Need piirkonnad sisaldavad nukleotiidisegmente, mida IL-17A/F-i kodeeriva mRNA mittetransleeritavas osas transkribeeritakse polüadenüülitud fragmentidena.

(0184) Muud meetodid, vektorid ja peremeesrakud, mis sobivad IL-17A/F-i sünteesimiseks kohandamiseks selgroogse looma raku rekombinantsetes kultuuris, on kirjeldatud üllitistes Gething *et al.*, Nature, 293:620-625 (1981); Mantei *et al.*, Nature, 281:40-46 (1979); EP 117060 ja EP 117058.

4. Geeni amplifitseerumise/ekspressioonise tuvastamine

(0185) Nukleiinhappe ekspresseerumist proovis võib mõõta otseselt, näiteks tavapäraste *Southern blot*, RNA transkriptsiooni kvantiteerimiseks *Northern blot*, (Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 5201-5205 (1980)), *dot blot* (DNA analüüs) meetodite või *in situ* hübriidiseerimisega, kasutades sobivalt märgistatud sondi, mis põhineb siin pakutavatel järjestustel.

Alternatiivselt võib rakendada antikehasid, mis tunnevad ära spetsiifilisi duplekseid, sealhulgas DNA-duplekseid, RNA-duplekseid ning DNA-RNA-hübriidduplekseid või DNA-valk-duplekseid. Antikehad võivad omakorda olla märgistatud ning analüüsi võib teostada, kui dupleks on seotud pinnale selliselt, et pinnal dupleksi moodustumisel võib tuvastada dupleksiga seondunud antikeha esinemise.

(0186) Alternatiivselt võib geeniekspressiooni mõõta immunoloogiliste meetoditega, nagu rakkude või koelõikude immunohistokeemiline värvimine ja koekultuuri- või kehavedelike analüüs geenisaaduse ekspressiooni otseseks kvantifitseerimiseks. Immunohistokeemiliseks värvimiseks ja/või vedelikuproovide analüüsiks kasutatavad antikehad võivad olla monokloonsed või polükloonsed, neid võib valmistada mistahes imetajas. Sobivalt võib antikehad valmistada natiivse järjestusega IL-17A/F-polüpeptiidi vastu või siin pakutavale DNA-järjestusele tugineva sünteetilise peptiidi vastu või IL-17A/F-i DNA-ga liidetud ja spetsiifilise antikeha vastast epitoopi kodeeriva eksogeense järjestuse vastu.

5. Polüpeptiidi puhastamine

(0187) IL-17A/F-i vorme võib koguda kultiveerimiskeskonnast või peremeesrakkude lüsaadist. Membraaniga seotuse puhul võib selle membraanist vabastada, kasutades sobiva detergendi (näiteks Triton-X 100) lahust või ensümaatilist lõikamist. IL-17A/F-i ekspresseerimiseks kasutatavaid rakke võib purustada mitmesuguste füüsikaliste või keemiliste vahenditega, nagu vahelduv külmutamine-sulatamine, sonikeerimine, mehaaniline purustamine või rakke lüüsivad agensid.

(0188) IL-17A/F-i puhastamine rekombinantse raku valkudest või polüpeptiididest võib olla soovitud. Järgnevad toimingud on sobivate puhastamistoimingute näited: fraktsioneerimine ioonivahetuskolonnil, etanooliga sadestamine, pöördfaasi HPLC, kromatograafia silikageelil või kationivahetusvaigul nagu DEAE, kromatofokuseerimine, SDS-PAGE, ammoniumsulfaadiga sadestamine, geelfiltreerimine, kasutades näiteks Sephadex G-75, A-valk-Sepharose kolonnid, et eemaldada saasteaineid nagu IgG, ning metallikelaatijatega kolonnid, et siduda IL-17A/F-i epitoop-märgistatud vorme. Võib rakendada mitmesuguseid valgu puhastamise meetodeid, sellised meetodid on tehnika tasemes tuntud ja neid on kirjeldatud näiteks üllistest Deutscher, *Methods in Enzymology*, 182 (1990), Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, New York (1982). Valitud puhastamisetapp (etapid)

sõltuvad näiteks kasutatud tootmisprotsessi olemusest ja konkreetsest IL-17A/F-ist, mida tootetakse.

E. IL-17A/F-i rakendused

(0189) IL-17A/F-i kodeerivad nukleotiidjärjestustel (või nendele komplementaarsetel järjestustel) on mitmesuguseid rakendusi molekulaarbioloogia valdkonnas ning nende hulgas on kasutamine kromosoomi ja geeni kaardistamisel hübridiseerimissondidena ning antisenss-RNA ja –DNA tekitamiseks. IL-17A/F-i nukleiinhape oleks kasutatav ka IL-17A/F-polüpeptiidide valmistamisel siin kirjeldatud rekombinantsete meetoditega.

(0190) IL-17A/F-i täispikka natiivse järjestusega geeni või selle osasid võib kasutada cDNA-kogu hübridiseerimissondidena, et eraldada IL-17A/F-i täispikk cDNA või muid cDNA-sid (näiteks IL-17A/F-i looduslikult esinevaid variante või muust liigist pärinevat IL-17A/F-i kodeerivaid), millel on soovitud järjestuse samasus IL-17A/F-i natiivse järjestusega, mis on siin avaldatud. Valikuliselt võib sondide pikkus olla umbes 20 kuni umbes 50 alust. Hübridiseerimissondid võivad pärineda täispika natiivse nukleotiidjärjestuse piirkondadest, mis on vähemalt osaliselt uudsed, kusjuures selliseid piirkondi võib määrata liigse katsetamiseta, või need võivad pärineda genoomsetest järjestustest, mis hõlmavad natiivse järjestusega IL-17A/F-i promotoreid, enhanserelemente ja introneid. Näiteks hõlmaks skriinimismeetod IL-17A/F-i geenis oleva kodeeriva piirkonna eraldamist, kasutades tuntud DNA-järjestust umbes 40 aluse pikkuse sondi sünteesimiseks. Hübridiseerimissondid võib märgistada mitmesuguste märgistega, mille hulgas on radionukleotiidid, nagu ^{32}P või ^{35}S , või ensüümmärgised, nagu on avidiini/biotiini sidumissüsteemide kaudu sondiga seotud aluseline fosfaat. Märgistatud sonde, millel on leiutisekohasele IL-17A/F-i geenile komplementaarne järjestus, võib kasutada inimese cDNA, genoomse DNA või mRNA-kogude skriinimiseks, et määrata, milliste liikmetega nendest kogudest sond hübridiseerub. Hübridiseerimismeetodeid on üksikasjalikumalt kirjeldatud näidetes allpool.

(0191) Sarnaselt võib sondidena kasutada mistahes EST-järjestusi, mida käesolevas taotluses kirjeldatakse, kasutades siin avaldatud meetodeid.

(0192) IL-17A/F-nukleiinhapete muud kasutatavad fragmendid hõlmavad antisenss- või senss-oligonukleotide, mis sisaldavad üheaheelalist nukleiinhappejärjestust (RNA-d või DNA-d), mis on võimeline seonduma IL-17A/F-i mRNA- (senss) või IL-17A/F-i DNA-

(antisenss) järjestustega, mis on sihtmärkideks. Vastavalt leiutisele hõlmavad antisenss- või senss-oligonukleotiidid IL-17A/F-i DNA kodeeriva piirkonna fragmenti. Üldiselt sisaldab selline fragment vähemalt umbes 14 nukleotiidi, eelistatavalt umbes 14-30 nukleotiidi. Antud valku kodeeriva cDNA-järjestusele tuginedes antisenss- või senssoligonukleotiidi tuletamise võimekuse kohta vaadake näiteks üllitisi Stein, Cohen (Cancer Res. 48:2659, (1988)) ja van der Krol *et al.*, (BioTechniques, 6:958, (1988)).

(0193) Antisenss- või senss-oligonukleotiidide sihtmärk-nukleiinhappega seondumise tulemusena moodustuvad dupleksid, mis tõkestavad sihtmärkjärjestuse transkriptsiooni või translatsiooni ühega mitmetest viisidest, mis hõlmavad dupleksite suurenenud lagundamist, transkriptsiooni või translatsiooni enneaegset lõpetamist või muid viise. Seega võib antisenss-oligonukleotiide kasutada IL-17A/F-valkude ekspressiooni tõkestamiseks. Lisaks hõlmavad antisenss- või senss-oligonukleotiidid muudetud suhkur-fosfodiester-toendiga (või muude suhkursidemetega, nagu on kirjeldatud üllitises WO91/06629) oligonukleotiide, kusjuures sellised suhkursidemed on endogeensetele nukleaaside suhtes resistentsed. Sellised resistentsete suhkursidemetega oligonukleotiidid on stabiilsed *in vivo* (st need on ensümaatilisele lagundamise suhtes resistentsed), kuid neil säilib järjestusespetsiifilisus, mis annab võime seonduda sihtmärk-nukleotiidjärjestustega.

(0194) Senss- või antisenss-oligonukleotiidide muud näited hõlmavad selliseid oligonukleotiide, mis on kovalentselt seotud orgaaniliste molekuliosadega, nagu need, mida on kirjeldatud üllitises WO90/10048, ning muude molekuliosadega nagu polü-(L-lüsiin), mis suurendavad oligonukleotiidi afiinsust sihtmärk-nukleiinhappejärjestuse suhtes. Lisaks võib antisenss- või senss-oligonukleotiidi sihtmärk-nukleotiidjärjestusega seondumise spetsiifilisuse muutmiseks kinnitada senss- või antisenss-oligonukleotiididele interkaleeruvad agenseid nagu elliptitsiin, ning alküülivaid agenseid või metallikomplekse.

(0195) Antisenss- või senss-oligonukleotiide võib sihtmärk-nukleiinhappejärjestust sisaldivasse raku sisestada geeni ülekandmise mistahes meetodiga, sealhulgas näiteks DNA CaPO₄-vahendatud transfekteerimisega, elektroporeerimisega, või kasutada geeni ülekandmise vektoreid nagu Epstein-Barri viirus. Eelistatava toimingu kohaselt sisestatakse antisenss- või senss-oligonukleotiid sobivasse retroviirusvektorisse. Sihtmärk-nukleiinhappejärjestust sisaldiv rakk viiakse *in vivo* või *ex vivo* ühendusse selle rekombinantse retroviirusvektoriga. Sobivad retroviirusvektorid hõlmavad, nendega piirdumata, hiire retroviirusest M-MuLV, N2

(M-MuLV-st pärinev retroviirus) pärinevaid või topeltkoopiaga vektoreid, mida tähistatakse DCT5A, DCT5B ja DCT5C (vaadake üllitist WO90/13641).

(0196) Samuti võib sens- või antisenss-oligonukleotiide sihtmärk-nukleiinhappejärjestust sisaldavasse rakku sisestada, moodustades konjugaadi ligandi siduva molekuliga, nagu on kirjeldatud üllitises WO91/04753. Sobivad ligandi siduvad molekulid hõlmavad, nendega piirdumata, rakupinna retseptoreid, kasvufaktoreid, muid tsütokiine või muid ligande, mis seonduvad rakupinna retseptoritega. Eelistatavalt ligandi siduva molekuliga konjugeerimine praktiliselt ei häiri ligandi siduva molekuli võimet seonduda sellele vastava molekuli või retseptoriga ega tõkesta sens- või antisenss-oligonukleotiidi või selle konjugeeritud versiooni sisenemist rakku.

(0197) Alternatiivselt võib sens- või antisenss-oligonukleotiidi sisestada sihtmärk-nukleiinhappejärjestust sisaldavasse rakku, moodustades oligonukleotiidi-lipiidi kompleksi, nagu on kirjeldatud üllitises WO90/10448. Eelistatavalt dissotsieeritakse sens- või antisenss-oligonukleotiidi ja lipiidi kompleks rakus endogeense lipaasi poolt.

(0198) Üldiselt on antisenss- või senss-RNA- või –DNA-molekulid vähemalt umbes 5 aluse pikkused, umbes 10 aluse pikkused, umbes 15 aluse pikkused, umbes 20 aluse pikkused, umbes 25 aluse pikkused, umbes 30 aluse pikkused, umbes 35 aluse pikkused, umbes 40 aluse pikkused, umbes 45 aluse pikkused, umbes 50 aluse pikkused, umbes 55 aluse pikkused, umbes 60 aluse pikkused, umbes 65 aluse pikkused, umbes 70 aluse pikkused, umbes 75 aluse pikkused, umbes 80 aluse pikkused, umbes 85 aluse pikkused, umbes 90 aluse pikkused, umbes 95 aluse pikkused, umbes 100 aluse pikkused või pikemad.

(0199) Sonde võib kasutada ka PCR-meetodites, et tekitada IL-17A/F-i kodeerivate suure sarnasusega järjestuste identifitseerimiseks järjestuste kogumi.

(0200) IL-17A/F-i kodeerivaid nukleotiidjärjestusi võib kasutada ka hübriidiseerimisondide konstrueerimiseks, et kaardistada seda IL-17A/F-i kodeeriv geen ning geneetiliselt analüüsida geneetiliste häiretega indiviide. Siin pakutavate nukleotiidjärjestustega võib kaardistada kromosoomi ja kromosoomi spetsiifilisi piirkondi, kasutades tuntud meetodeid, nagu *in situ* hübriidiseerimine, kromosomaalsete markeritega aheldumise analüüs ja kogude skriinimine hübriidiseerimisega.

(0201) Kui IL-17A/F-i kodeeriv järjestus kodeerib valku, mis seondub mõne teise valguga (kui see valk on näiteks retseptor), siis võib seda valku kasutada seondumis-vastasmõjusse kaasatud muude valkude või molekulide identifitseerimiseks. Selliste meetoditega võib iden-

tifitseerida retseptori/ligandi seondumis-vastasmõju inhibiitoreid. Sellistesse seondumis-vastasmõjusse hõlmatud valke võib kasutada ka selle seondumis-vastasmõju peptiidsete või väikese molekuliga inhibiitorite või agonistide skriinimiseks. Samuti võib retseptorvalku kasutada korrelatiivse(te) ligandi(de) eraldamiseks. Võib kujundada skriinimisanalüüse ühendite, mis jäljendavad natiivse IL-17A/F-i või IL-17A/F-i retseptori bioloogilist aktiivsust, leidmiseks. Sellised skriinimisanalüüsid hõlmaks keemiliste kogude suure läbilaskevõimega skriinimiseks kohaldatavaid analüüse, tehes need eriti sobivaks väikese molekuliga ravimkandidaatide identifitseerimiseks. Arvestatakse, et väikese molekuliga ühendid hõlmavad sünteetilisi orgaanilisi või anorgaanilisi ühendeid. Analüüsid võib teostada erinevates vormides, mille hulgas on valk-valk seondumisanalüüsid, biokeemilised skriinimisanalüüsid, immuunanalüüsid ja rakupõhised analüüsid, mis on tehnika tasemes hästi iseloomustatud.

(0202) Samuti võib IL-17A/F-i või selle muudetud vorme kodeerivaid nukleinhappeid kasutada, et tekitada inimesest erinevaid transgeenseid loomi või inimesest erinevaid “väljalülitusega” loomi, mis omakorda on kasutatavad raviks kasutatavate reagentide arendamiseks ja skriinimiseks. Transgeenne loom (näiteks hiir või rott) on loom, kellel on transgeeni sisaldavaid rakud ning selline transgeen sisestati sellesse looma või selle looma eellasesse enne sündi, see tähendab embrüonaalses staadiumis. Transgeen on DNA, mis on integreerunud raku, millest transgeenne loom areneb, genoomi. Ühes teostuses võib IL-17A/F-i kodeerivat cDNA-d kasutada IL-17A/F-i kodeeriva genoomse DNA kloonimiseks, tehes seda vastavalt väljakujunenud meetoditele ja genoomsetele järjestustele, mida kasutatakse IL-17A/F-i kodeerivat DNA-d ekspresseerivaid rakke sisaldavate transgeensete loomade tekitamiseks. Transgeensete loomade, eriti loomade, nagu hiired või rotid, tekitamise meetodid on muutunud tehnika tasemes tavapärasteks ning kirjeldatud näiteks US patentides nr 4736866 ja 4870009. Tüüpiliselt oleksid konkreetsete rakud IL-17A/F-transgeeni ja koespetsiifiliste enhanserite koosseisu lülitamise sihtmärgiks. Transgeenseid loomi, kes sisaldavad IL-17A/F-i kodeeriva transgeeni koopiat, mis on selle looma embrüonaalses staadiumis sisestatud iduliini, võib kasutada IL-17A/F-i kodeeriva DNA suurenenud ekspressiooni mõju uurimiseks. Selliseid loomi võib kasutada testloomadena reagentide jaoks, mis annavad kaitse näiteks sellise üleekspressiooniga seotud patoloogiliste seisundite eest. Vastavalt sellele töödeldakse looma reagentiga ning patoloogilise seisundi vähenenud esinemine võrreldes töötlemata loomadega, kellel on transgeen, näitaks võimalikku ravisekkumist patoloogilise seisundi puhul.

(0203) Alternatiivselt võib IL-17A/F-i homolooge, mis ei pärine inimesest, kasutada, et konstrueerida IL-17A/F-i “väljalülitusega” loom, kellel IL-17A/F-i kodeeriva endogeense geeni ja IL-17A/F-i kodeeriva muudetud genoomse DNA, mis on sisestatud selle looma embrüonaalsesse tüvirakku, vahelise homoloogse rekombinatsiooni tulemusel IL-17A/F-i kodeeriv geen puudulik või muutunud. Näiteks võib IL-17A/F-i kodeerivat cDNA-d kasutada IL-17A/F-i kodeeriva genoomse DNA kloonimiseks vastavalt väljakujundatud meetoditele. Osa genoomsest DNA-st, mis kodeerib IL-17A/F-i, võib eemaldada või asendada muu geeniga nagu seleksioonimarkeri geen, mida võib kasutada integreerumise jälgimiseks. Tüüpiliselt kaasatakse vektorisse mitu tuhat aluspaari muutmata külgnev DNA (nii 5'- kui 3'-otsa) (homoloogse rekombinatsiooni vektorite kirjeldust vaadake näiteks üllitised Thomas, Capecchi, Cell, 51:503 (1987)). Vektor sisestatakse embrüonaalse tüviraku liini (näiteks elektroporeerimisega) ning selekteeritakse rakud, milles viidud DNA on homoloogset recombineerunud endogeense DNA-ga (vaadake näiteks üllitist Li *et al.*, Cell, 69:915 (1992)). Seejärel süstitakse selekteeritud rakud looma (näiteks hiire või roti) blastotsüsti, et moodustada agregeerumiskimäär (vaadake näiteks Bradley osa teoses *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, E. J. Robertson, toimetaja (IRL, Oxford, 1987), lk 113-152). Kimäärse embrüo võib siirata sobivasse pseudotiinesse emasesse asenduslooma ning embrüost arneb “väljalülitusega” loom. Järglaskonna, kes oma sugurakkudes kannab homoloogset recombineerunud DNA-d, võib identifitseerida standardsete meetoditega ja kasutada loomade, kelle kõikides rakkudes sisaldub homoloogset recombineerunud DNA, aretamiseks. Väljalülitusega loomi võib iseloomustada näiteks nende võime järgi omada kaitset kindlate patoloogiliste seisundite suhtes ning IL-17A/F-polüpeptiidi puudumisest tingitud kindlate patoloogiliste seisundite arenemise järgi.

(0204) IL-17A/F-polüpeptiide kodeerivat nukleiinhapet võib kasutada ka geeniravis. Geeniravi rakendustes viiakse geenid rakkudesse, et saavutada ravivaltoimiva geenisaaduse süntees *in vivo*, näiteks puuduliku geeni asendamiseks. „Geeniravi“ hõlmab nii tavapärasest geeniravi, milles kestab toime saavutamise ühe raviga, ning geeniraviagensite manustamist, mis hõlmab ravivaltoimiva DNA või mRNA ühekordset või korduvat manustamist. Raviagensitena võib kasutada antisenss-RNA-sid ja -DNA-sid, et tõkestada teatud geenide ekspresseerimist *in vivo*. Eelnevalt on juba näidatud, et lühikesi antisenss-oligonukleotiide võib importida rakkudesse, kus need, hoolimata oma madalast rakusisesest kontsentratsioonist, mida põhjustab nende piiratud sisenemine läbi rakumembraani, toimivad inhibiitoritena,

(Zamecnik *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:4143-4146 (1986)). Sisenemise võimendamiseks võib oligonukleotiide muuta, näiteks asendades nende negatiivselt laetud fosfodi-esterrühmad laenguta rühmadega.

(0205) Nukleiinhapete viimiseks elusasse rakku on kättesaadavad mitmesugused meetodid. Meetodid varieeruvad sõltuvalt sellest, kas nukleiinhape viiakse kultiveeritud rakku *in vitro* või valitud peremehe rakkudesse *in vivo*. Nukleiinhappe imetajarakkudesse *in vitro* ülekandmiseks sobivad meetodid hõlmavad liposoomide kasutamist, elektroporeerimist, mikrosüstimist, rakkude liitmist, DEAE-dekstraani, kaltsiumfosfaadiga sadestamise meetodit jne. Käesoleval ajal eelistatavad *in vivo* geeniülekanne meetodid hõlmavad transfekteerimist viirusvektoritega (tüüpiliselt retroviirusvektoritega) ning viiruse kättevalgu - liposoomiga vahendatud transfekteerimist (Dzau *et al.*, Trends in Biotechnology, 11:205-210 (1993)). Mõnes olukorras on soovitatav nukleiinhappe allikat pakkuda koos sihtmärkrakkudele suunava agensiga, nagu raku pinnamembraani valgule või sihtmärkrakule spetsiifiline antikeha, sihtmärkraku retseptori ligand jne. Kui kasutatakse liposoomi, võib sihtmärgistamise suunamiseks ja/või hõlbustamiseks kasutada raku endotsütoosiga seotud pinnavalguga seonduvaid valke, näiteks konkreetse rakutüübi troofsusega kapsiidivalke või nende fragmente, ringluses internaliseerimist läbi tegevate valkude vastaseid antikehasid ning valke, mis suunavad rakusisest paiknemist ja suurendavad rakusisest poolväärtusaega. Retseptorivahendatud endotsütoosi meetodit on kirjeldatud näiteks üllitistes Wu *et al.*, J. Biol. Chem., 262:4429-4432 (1987) ja Wagner *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:3410-3414 (1990). Geenimärgistamise ja geeniravi eeskirjade ülevaateks vaadake Anderson *et al.*, Science, 256:808-813 (1992).

(0206) Siin kirjeldatud IL-17A/F-polüpeptiide võib kasutada ka molekulmassi markeritena valgule elektroforeesiga seotud eesmärkidel ning eraldatud nukleiinhappejärjestusi võib kasutada selliste markerite rekombinantseks ekspresseerimiseks.

(0207) Siin kirjeldatud IL-17A/F-polüpeptiide või nende fragmente kodeerivad nukleiinhappemolekulid on kasutatavad kromosoomi identifitseerimiseks. Sellega seoses on jätkuv vajadus identifitseerida uusi kromosoomimarkereid, kuna käesolevalt on kättesaadavad suhteliselt vähesed kromosoomi markeerivad reagentid, mis tuginevad tegelikele järjestusandmetele. Kõiki leiutisekohaseid IL-17A/F-i nukleiinhappemolekule võib kasutada kromosoomimarkerina.

(0208) Käesoleva leiutise kohaseid IL-17A/F-polüpeptiide ja nukleiinhappemolekule võib kasutada ka diagnostiliselt koe tüpiseerimiseks, kusjuures leiutisekohased IL-17A/F-polüpep-

tiidid võivad erinevalt ekspresseeruda ühes koes võrreldes mõne teise koega, eelistatavalt haigestunud koes võrreldes sama koetüübi normaalse koega. IL-17A/F-i nukleiinhappemolekul leiaks rakendust, et tekitada sonde PCR-iks, *Nothern*-analüüsiks, *Southern*-analüüsiks ja *Western*-analüüsiks.

(0209) Siin kirjeldatud IL-17A/F-polüpeptiide võib kasutada ka raviagensitena. Käesoleva leiutise kohaseid IL-17A/F-polüpeptiide võib valmistada vastavalt tuntud meetoditele, et teha ravimkompositsioone, kusjuures IL-17A/F kombineeritakse seguna farmatseutiliselt vastuvõtava kandajaga. Säilitatavad ravimvormid valmistatakse lüofiliseeritud preparaatide või vesilahuste vormis, segades soovitud puhtusastmega toimeaine vajadusel füsioloogiliselt vastuvõtavate kandajate, abiainetega või stabiliseerijatega (Remington's Pharmaceutical Sciences 16. väljaanne, toimetaja Osol, A. (1980)). Vastuvõtavad kandjad, abiained või stabiliseerijad ei ole kasutatavates annustes ja kontsentratsioonides vastuvõtjale toksilised ning need hõlmavad puhvreid, nagu fosfaat-, tsitraat- ja muude orgaaniliste hapete puhvrid, antioksüdante, sealhulgas askorbiinhapet, madala molekulmassiga (vähem kui umbes 10 jääki) polüpeptiide, valke, nagu seerumi albumiin, želatiin või immunoglobuliinid, hüdrofiilseid polümeere nagu polüvinüülpirrolidoon, aminohappeid, nagu glütsiin, glutamiin, asparagiin, arginiin või lüsiin, monosahhariide, disahhariide ja muid süsivesikuid, sealhulgas glükoosi, mannoosi või dekstriini, kelaativaid agenseid nagu EDTA, sukuralkohole, nagu mannitool või sorbitool, soola moodustavaid vastasioone nagu naatrium ning/või mitteioonseid surfaktante, nagu TWEEN™, PLURONICS™ või PEG.

(0210) *In vivo* manustamiseks kasutatavad preparaadid peavad olema steriilsed. See saavutatakse hõlpsalt filtrimisega läbi steriilsete filtrismembraanide enne või pärast lüofiliseerimist ja taasmoodustamist.

(0211) Siinsed ravikompositsioonid paigutatakse üldiselt steriilse täiteavaga mahutisse, näiteks veenisisese lahuse kotti või hüpodermilise süstlanõelaga läbistatava korgiga viaali.

(0212) Manustamisviis on vastavuses tuntud meetoditega, näiteks veenisisese süstimise või infusiooni, kõhuõõnesisese, ajusisese, lihasesisese, silmasisese, arterisisese või kahjustusesisese viisiga, toopilise manustamise või toimeainet viivitatult vabastava süsteemiga.

(0213) Leiutisekohaste ravimkompositsioonide annused ja soovitud ravimikontsentratsioonid võivad varieeruda, sõltudes konkreetsest ettenähtud rakendusest. Sobiva annuse või manustamisviisi määramine on tavalisele arstile jõukohane. Loomkatsed pakuvad usaldusväärset juhust inimese raviks toimiva annuse määramiseks. Toimivad annused võib liikide vahel

ümber arvutada, järgides printsiipe, mis on paika pandud üllitises Mordenti, J., Chappell, W., "The use of interspecies scaling in toxicokinetics", teoses Toxicokinetics and New Drug Development, toimetajad Yacobi *et al.*, Pergamon Press, New York, 1989, lk 42-96.

(0214) IL-17A/F-polüpeptiidi või selle agonisti või antagonistiga *in vivo* manustamisel võivad normaalsed annuse kogused imetaja kehamassi kohta varieeruda umbes 10 ng/kg kuni 100mg/kg või enam päevas, eelistatavalt umbes 1 µg/kg kuni 10 mg/kg päevas, sõltudes manustamise viisist. Juhiseid konkreetsete annustamise ja kohaletoimetamise meetodite kohta pakutakse kirjanduses, vaadake näiteks US patenti nr 4657760 ,5206344 või 5225212. On ootuspärane, et erinevate raviühendite ja erinevate häirete puhul toimivad erinevad preparaadid ning et ühele organile või koele suunatud manustamine võib näiteks nõuda teistsugust kohaletoimetamise viisi kui mõni teine organ või kude.

(0215) Kui soovitakse IL-17A/F-polüpeptiidi viivitatult vabastatava preparaadi manustamist, mille puhul vabastamise tunnused sobivad mistahes haiguse või häire, mis nõuab IL-17A/F-polüpeptiidi manustamist, raviks, on võimaluseks IL-17A/F-polüpeptiidi mikrokapseldamine. Rekombinantsete valkude mikrokapseldamist viivitatud vabastamiseks on edukalt teostatud inimese kasvuhormooni (*human growth hormone* – rhGH-i), interferooni (rhIFN-i), interleukiin-2 ja MN rgp120-ga (Johnson *et al.*, Nat. Med., 2:795-799 (1996); Yasuda, Biomed. Ther., 27:1221-1223 (1993); Hora *et al.*, Bio/Technology, 8:755-758 (1990); Cleland, "Design and Production of Single Immunization Vaccines Using Polylactide Polyglycolide Microsphere Systems" teoses Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach, toimetajad Powell ja Newman, (Plenum Press: New York, 1995), lk 439-462; WO97/03692, WO96/40072, WO96/07399 ning US patent nr 5654010).

(0216) Need valke viivitatult vabastavad preparaadid töötati välja, kasutades polülaktaatko-glükoolhappe (PLGA) polümeeri selle biosobivuse ning laiaulatuslike biolagundatavate omaduste tõttu. PLGA laguproduktid, piim- ja glükoolhapped, eemalduvad inimese kehas kiiresti. Lisaks võib selle polümeeri lagunemist reguleerida kuudest aastateni, sõltuvalt selle molekulmassist ja koostisest (Lewis, "Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymer", M. Chasin, R. Langer (toimetajad), Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems (Marcel Dekker: New York, 1990), lk 1-41.

(0217) Leiutis hõlmab ühendite skriinimise meetodeid, et identifitseerida selliseid, mis jäljendavad IL-17A/F-polüpeptiidi (agonistid) või hoiavad ära IL-17A/F-polüpeptiidi toime (antagonistid). Antagonistlike ravimikandidaatide jaoks on kujundatud skriinimisanalüüsid, et

identifitseerida ühendeid, mis seonduvad või moodustavad kompleksi siin identifitseeritud geenidega kodeeritavate IL-17A/F-polüpeptiididega, või häirivad muul viisil nende kodeeritavate polüpeptiidide vastasmõju muude rakuliste valkudega. Sellised skriinimisanalüüsid hõlmavad keemiliste kogude suure läbilaskevõimega analüüse, mis teeb need eriti sobivaks väikese molekuliga ravimikandidaatide identifitseerimiseks.

(0218) Analüüse võib teostada mitmesugustes tehnika tasemes hästi iseloomustatud vormides, mille hulgas on valk-valk sidumisanalüüsid, biokeemilised skriinimisanalüüsid, immuunanalüüsid ja rakupõhised analüüsid.

(0219) Kõik anatagonistide analüüsid on sarnased selle poolest, et need vajavad ravimikandidaadi kokkuviiimist siin identifitseeritud nukleiinhappega kodeeritava IL-17A/F-polüpeptiidiga tingimustes ja aja jooksul, mis on piisavad nende kahe koostisosa vastasmõju võimaldamiseks.

(0220) Seandumisanalüüsides on vastasmõjaks seandumine ning moodustunud kompleksi saab reaktsioonisegust eraldada või tuvastada. Konkreetsetes teostuses on IL-17A/F-polüpeptiid, mida kodeeritakse siin identifitseeritud geeniga, või ravimikandidaat immobiliseeritud tahkele faasile, näiteks mikrotiiterplaadile, kovalentsete või mittekovalentsete sidemetega. Mittekovalentne side saavutatakse tavaliselt tahke pinna katmisel IL-17A/F-polüpeptiidi lahusega ja kuivatamisega. Alternatiivselt võib kasutada immobiliseeritava IL-17A/F-polüpeptiidi suhtes spetsiifilist immobiliseeritud antikeha, näiteks võib kasutada IL-17A/F-polüpeptiidi suhtes spetsiifilist immobiliseeritud monokloonset antikeha, et ankurdada IL-17A/F-polüpeptiid tahkele pinnale. Analüüs teostatakse, lisades immobiliseeritud koostisosale, näiteks ankurdatud koostisosa sisaldavale kaetud pinnale, immobiliseerimata koostisosa, mis võib olla märgistatud tuvastatava märgisega. Kui reaktsioon on toimunud, eemaldatakse mittereageerinud koostisosad näiteks pesemisega ning tuvastatakse tahkele pinnale ankurduvad kompleksid. Kui algselt immobiliseerimata koostisosal on tuvastatav märgis, siis viitab pinnale immobiliseerunud märgis kompleksi esinemisele. Kui algselt immobiliseerimata koostisosal ei ole märgist, saab kompleksi moodustumist tuvastada, kasutades näiteks immobiliseeritud kompleksile spetsiifiliselt seonduvat märgistatud antikeha.

(0221) Kui kandidaatühendil on vastasmõju, kuid see ei seonu siin identifitseeritud geeniga kodeeritava IL-17A/F-polüpeptiidiga, saab vastasmõju selle polüpeptiidiga analüüsida valk-valk vastasmõju tuvastamise hästi tuntud meetoditega. Sellised analüüsid hõlmavad tava-päraseid lähenemisi, nagu näiteks ristsidumine, immuunkaassadestamine, kaaspuhastamine

gradientide või kromatograafiliste kolonnidega. Lisaks võib valk-valk vastasmõjusid jälgida, kasutades Fields'i ja kaastöötajate poolt kirjeldatud pärmipõhist geneetilist süsteemi (Fields, Song, *Nature* (London), 340:245-246 (1989); Chien *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:9578-9582 (1991)), nagu on avaldatud ka üllitises Chevray, Nathans, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:5789-5793 (1991). Paljud transkriptsiooni aktiveerijad nagu pärmis GAL4 sisaldavad kahte füüsiliselt eraldatud modulaarset domeeni, millest üks toimib DNA-ga seonduva domeeni ja teine toimib transkriptsiooni aktiveeriva domeenina. Eespool toodud üllitistes kirjeldatud pärmis ekspressioonisüsteemis (nimetatud üldiselt „kaksikhübriidsüsteemiks”) kasutatakse seda omadust ning rakendatakse kahte hübriidset valku – ühte, milles sihtmärkvalk on liidetud GAL4-domeeniga, mis seondub DNA-ga, ja teist, milles kandidaatideks olevad aktiveerivad valgud on liidetud aktiveeriva domeeniga. GAL1-*lacZ* reportergeeni ekspresseerumine GAL4-aktiveeritava promootori kontrolli all sõltub GAL4 aktiivsuse taasmoodustumisest valk-valk vastasmõju kaudu. Vastasmõjus olevaid polüpeptiide sisaldavad kolooniad tuvastatakse β -galaktosidaasi kromogeense substraadiga. Täielik kompleks (MATCHMAKER™) kahe spetsiifilise valgu vaheliste valk-valk vastasmõjude identifitseerimiseks kaksikhübriidmeetodit kasutades on kaubanduslikult saadav firmast Clontech. Seda süsteemi võib ka laiendada valgu spetsiifiliste vastasmõjudega seotud valgudomeenide kaardistamiseks ning ka nendes vastasmõjudes otsustava tähtsusega aminohappejääkide täpseks näitamiseks.

(0222) Ühendeid, mis häirivad siin identifitseeritud IL-17A/F-polüpeptiidi kodeeriva geeni ja muude rakusiseste või –välise koostisosade vastasmõju, võib testida järgnevalt: tavaliselt valmistatakse selle geeni saadust ning rakusisest või –välist koostisosa sisaldav reaktsioonisegu tingimustes ja aja jooksul, mis võimaldab kahe saaduse vastasmõju ning seondumise. Testimaks kandidaatühendi võimet seondumist inhibeerida, viiakse reaktsioon läbi nii testitava ühendi puudumisel kui esinemisel. Lisaks võib kolmandasse reaktsioonisegusse lisada positiivse kontrollina platseebot. Testitava ühendi ning rakusisese või –välise koostisosa vahelise seondumise (kompleksi moodustumise) esinemist segus jälgitakse selliselt, nagu siin eespool on kirjeldatud. Kompleksi moodustumine kontrollreaktsiooni(de)s, kuid mitte testitava ühendit sisaldavas reaktsioonisegus viitab, et testitav ühend häirib testitava ühendi ja selle reaktsioonipartneri vastasmõju.

(0223) Antagonistide analüüsimiseks võib IL-17A/F-polüpeptiidi rakule lisada koos konkreetse aktiivsuse suhtes skriinitava ühendiga ning ühendi võime inhibeerida huvipakkuvat

aktiivsust IL-17A/F-polüpeptiidi esinemisel näitab, et see ühend on IL-17A/F-polüpeptiidi antagonist. Alternatiivselt võib antagonistide tuvastada, kombineerides IL-17A/F-polüpeptiidi ja võimaliku antagonisti IL-17A/F-polüpeptiidi membraaniseoseliste retseptorite või rekombinantsete retseptoritega, sobivates tingimustes konkureeriva inhibeerimise analüüsimiseks. IL-17A/F-polüpeptiidi võib märgistada, näiteks radioaktiivsusega, selliselt, et retseptoriga seotud IL-17A/F-polüpeptiidimolekulide arvu saab kasutada võimaliku antagonisti tõhususe määramiseks. Retseptorit kodeeriva geeni võib identifitseerida mitmete eriala asjatundjatele tuntud meetoditega, näiteks ligandi sortimise (*panning*) ja FACS-sortimisega; Coligan *et al.*, Current Protocols in Immun., 1(2), 5. peatükk (1991). Eelistatavalt rakendatakse ekspressioonipõhist kloonimist, mille kohaselt IL-17A/F-polüpeptiidile reageerivast rakust valmistatakse polüadenüülitud RNA, sellest RNA-st tekitatud cDNA-kogu jaotatakse kogumiteks ning neid kasutatakse COS-rakkude või muude rakkude, mis ei reageeri IL-17A/F-polüpeptiidile, transfekteeerimiseks. Preparaerimisklaasidel kasvatatavaid transfekteeeritud rakke eksponeeritakse märgistatud IL-17A/F-polüpeptiidile. IL-17A/F-polüpeptiidi võib märgistada erineval viisil, sealhulgas jodeerimise või kohtspetsiifilise valgukinaasi äratundmiskoha kaasamisega. Fikseerimise ja inkubeerimise järgselt allutatakse klaasid autoradiograafilisele analüüsile. Tuvastatakse positiivsed kogumid ja valmistatakse alamkogumid, mis transfekteeeritakse uuesti, kasutades interaktiivset alamkogumise ja uuesti skriinimise protsessi, mis lõpuks annab oletatavat retseptorit ekspresseeriva üksiku klooni.

(0224) Alternatiivse lähenemisena retseptori identifitseerimiseks võib märgistatud IL-17A/F-polüpeptiidi fotoafiinsuse abil siduda retseptormolekuli ekspresseeriva raku membraani või sellest valmistatud ekstraktiga. Ristseotud materjal lahutatakse PAGE-geelis ning see eksponeeritakse röntgenfilmile. Retseptorit sisaldava märgistatud kompleksi võib välja lõigata, lahutada peptiidfragmentideks ning allutatada valgu mikrosekveneerimisele. Mikrosekveneerimisega saadud aminohapete järjestust kasutatakse kõdujärjestusega oligonukleotiidsondide kogu valmistamiseks, et oletatavat retseptorit kodeeriva geeni identifitseerimiseks skriinida cDNA-kogu.

(0225) Veel ühe antagonistide tuvastamise analüüsi kohaselt inkubeeritakse retseptorit ekspresseerivaid imetajarakke või membraanipreparaate koos märgistatud IL-17A/F-polüpeptiidiga selliselt, et esineb kandidaatühend. Seejärel võiks mõõta ühendi võimet suurendada või tõkestada seda vastasmõju.

(0226) Võimalike antagonistide spetsiifilisemad näited hõlmavad oligonukleotiidi, mis seonduv immunoglobuliini ja IL-17A/F-polüpeptiidi liitvalkudega, ning eriti antikehasid, sealhulgas, nendega piirdumata, polü- ja monokloonseid antikehasid ja antikehade fragmente, üheaheelalisi antikehasid, idiotüübivastaseid antikehasid ja nende antikehade või fragmentide kimäärseid või humaniseeritud versioone, ning ka inimese antikehasid ja antikehade fragmente. Alternatiivselt võib võimalik antagonist olla väga sarnane valk, näiteks IL-17A/F-polüpeptiidi muteeritud vorm, mis tunneb ära retseptori, kuid ei edasta mõju, inhibeerides seega konkureerivalt IL-17A/F-polüpeptiidi toimet.

(0227) Veel üks võimalik IL-17A/F-polüpeptiidi antagonist on antisenss-RNA- või antisenss-DNA-konstruksioon, mis valmistatakse, kasutades antisenss-tehnoloogiat, mille kohaselt näiteks antisenss-RNA- või antisenss-DNA-molekul toimib mRNA translatsiooni otseselt tõkestades, hübridiseerudes sihtmärk-RNA-ga ja hoides ära valgu transleerimise. Antisenss-tehnoloogiat võib kasutada, et kontrollida geeniekspressiooni antisenss-RNA või -DNA-ga kolmikheeliksi moodustumise kaudu ning mõlemad meetodid põhinevad polünukleotiidi seondumisel DNA või RNA-ga. Näiteks kasutatakse siin toodud kypse IL-17A/F-polüpeptiidi kodeeriva polünukleotiidjärjestuse kodeerivat 5'-osa umbes 10-40 aluspaari pika antisenss-RNA kujundamiseks. DNA-oligonukleotiid kujundatakse komplementaarsena geenipiirkonnale, mis on hõlmatud transkriptsiooni (kolmikheeliksi kohta vaadake üllitisi Lee *et al.*, Nucl. Acids Res., 6:3073 (1979); Cooney *et al.*, Science, 241:456 (1988); Dervan *et al.*, Science, 251:1360 (1991)), hoides sellega ära transkriptsiooni ja IL-17A/F-polüpeptiidi tootmise. Antisenss-RNA-oligonukleotiid hübridiseerub mRNA-ga *in vivo* ning tõkestab mRNA-molekuli transleerimist IL-17A/F-polüpeptiidiks (antisenss-tehnoloogia kohta vaadake: Okano, Neurochem., 56:560 (1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression (CRC Press: Boca Raton, FL, 1988). Eespool kirjeldatud oligonukleotiide saab rakkudesse kohale toimetada ka selliselt, et IL-17A/F-polüpeptiidi tootmise inhibeerimiseks ekspresseeritakse antisenss-RNA-d või -DNA-d *in vivo*. Kui kasutatakse antisenss-DNA-d, siis on eelistatavad oligodesoksüribonukleotiidid, mis pärinevad translatsiooni algatamise kohast, näiteks sihtmärkgeeni nukleotiidjärjestuse asendite -10 ja +10 vahelt.

(0228) Võimalikud antagonistid hõlmavad väikesi molekule, mis seonduvad IL-17A/F-polüpeptiidi aktiivkoha, retseptori või kasvufaktori sidumiskoha või muu asjakohase sidumiskohaga IL-17A/F-polüpeptiidis, tõkestades seega IL-17A/F-polüpeptiidi normaalset bioloogilist aktiivsust. Väikeste molekulide näited hõlmavad, nendega piirdumata, väikesi peptiide

või peptiidisarnaseid molekule, eelistatavalt lahustuvaid peptiide ning sünteetilisi mittepeptiidseid orgaanilisi või anorgaanilisi ühendeid.

(0229) Ribosüümid on ensümaatilised RNA-molekulid, mis on võimelised katalüüsima RNA spetsiifilist lõikamist. Ribosüümid toimivad komplementaarse sihtmärk-RNA-ga järjestuse-spetsiifiliselt hübriidiseerudes, millele järgneb endonukleolüütiline lõikamine. Ribosüümiga lõikamise spetsiifilisi kohti võimalikus sihtmärk-RNA-s võib identifitseerida tuntud meetoditega. Lisaüksikasjade kohta vaadake näiteks üllitist Rossi, *Current Biology*, 4:469-471 (1994) ja PCT publikatsiooni nr WO97/33551 (avaldatud 18. septembril 1997).

(0230) Kolmikheeliksi moodustamises osalevad nukleiinhappemolekulid, mida kasutatakse transkriptsiooni inhibeerimiseks, peaksid olema üheaheelised ja koosnema desoksünukleotiididest. Nende oligonukleotiidide aluste koostis kujundatakse selliselt, et see soodustab kolmikheeliksi moodustumist aluste paardumisega Hoogsteeni reeglite järgi, mis üldiselt nõuavad mahukaid puriinide või pürimidiinidega lõike dupleksi ühes ahelas. Lisaüksikasjade kohta vaadake näiteks PCT publikatsiooni nr WO97/33551, *supra*.

(0231) Neid väikesi molekule võib identifitseerida ühe või enama siin eespool kirjeldatud skriinimisanalüüsi ja/või mis tahes muude, eriala asjatundjatele hästi tuntud skriinimismetoditega.

(0232) Samuti võivad siin avaldatud molekulide diagnostilised ja ravirakendused tugineda positiivsetele signaalidele funktsionaalses analüüsis, mis on avaldatud ja kirjeldatud allpool.

F. Levik kudedes

(0233) IL-17A/F-i ekspresseerivate kudede paiknemise võib identifitseerida, määrares mRNA ekspressiooni inimese erinevates kudedes. Selliste geenide paiknemine pakub teavet selle kohta, milliseid kudesid mõjutab IL-17A/F-polüpeptiidide aktiivsuste stimuleerimine ja inhibeerimine kõige tõenäolisemalt. Geeni paiknemine spetsiifilises koes pakub ka koe-proovi allpool arutluse all olevateks aktiivsuse tõkestamise analüüsideks.

(0234) Nagu eespool on mainitud, võib geeniekspressiooni erinevates kudedes mõõta tavapärase *Southern blot*, mRNA transkriptsiooni kvantiteerimiseks *Northern blot* (Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:5201-5205 (1980)), *dot blot* (DNA-analüüs) analüüsides või *in situ* hübriidiseerimisega, kasutades sobivalt märgistatud sondi, mis põhineb siin pakutavatel järjetustel. Alternatiivselt võib kasutada antikehasid, mis tunnevad ära spetsiifilisi duplekseid,

sealhulgas DNA-duplekseid, RNA-duplekseid ja DNA-RNA-hübriidduplekseid või DNA-vaik-duplekseid.

(0235) Alternatiivselt võib geeniekspressiooni erinevates kudedes mõõta immunoloogiliste meetoditega, nagu koelõikude immunohistokeemiline värvimine ja koekultuuri- või kehavedelike analüüs geenisaaduse ekspresseerumise otseseks kvantifitseerimiseks. Immunohistokeemiliseks värvimiseks ja/või proovivedelike analüüsimiseks kasutatavad antikehad võivad olla monokloonsed või polükloonsed ning neid võib valmistada mistahes imetajas. Antikehad võib sobivalt valmistada IL-17A/F-polüpeptiidi natiivse järjestuse vastu või IL-17A/F-polüpeptiidi kodeerivale DNA-järjestusele tugineva sünteetilise peptiidi vastu või IL-17A/F-polüpeptiidi kodeeriva DNA-ga liidetud eksogeense järjestuse vastu, mis kodeerib spetsiifilise antikeha epitoopi. Antikehade tekitamise üldised meetodeid ja *Northern blot* analüüsi ning *in situ* hübriidiseerimise spetsiifilisi eeskirju pakutakse siin allpool.

G. Antikeha seondumise uuringud

(0236) IL-17A/F-polüpeptiidide aktiivsust võib lisaks tõestada antikeha seondumise uuringutega, mille kohaselt testitakse vastavalt IL-17A/F-vastaste antikehade võimet inhibeerida IL-17A/F-polüpeptiidide mõju koerakkudes. Iseloomulikud antikehad hõlmavad polükloonsid, monokloonsid, humaniseeritud, bispetsiifilisi ja heterokonjugaat-antikehasid, mille valmistamist kirjeldatakse siin allpool.

(0237) Antikeha seondumise uuringud võib teostada mistahes tuntud analüüsimeetodiga, nagu konkureerivad seondumisanalüüsid, otsesed ja kaudsed kihilised analüüsid ja immuunsadestamisanalüüsid; Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, lk 147-158 (CRC Press, Inc., 1987).

(0238) Konkureerivad seondumisanalüüsid tuginevad märgistatud standardi võimele konkureerida testitava analüüdi proovi seondumisega piiratud koguses antikehaga. Sihtmärkvalgu kogus testitavas proovis on pöördvõrdeline standardi kogusega, mis seondub antikehadega. Standardi seonduva koguse määramise hõlbustamiseks on antikehad eelistatavalt muudetud lahustumatuks enne või pärast konkureerimist selliselt, et antikehadega seondunud standardi ja analüüdi võib mugavalt eraldada seondumata jäänud standardist ja analüüdist.

(0239) Kihilised analüüsid hõlmavad kahe antikeha kasutamist, millest kumbki on võimeline seonduma tuvastatava valguga erineva immunogeense osa või epitoobiga. Kihilises analüüsis

seondub testitav analüüdiiproov esimese antikehaga, mis on immobiliseeritud tahkele toendile, ning seejärel seondub analüüdiga teine antikeha, moodustades sellega lahustumatu kolmeosalise kompleksi; vaadake näiteks US patenti nr 4376110. Teine antikeha võib olla märgistatud tuvastatava molekuliosaga (otsesed kihilised analüüsid) või seda võib mõõta, kasutades immunoglobuliinivastast antikeha, mis on märgistatud tuvastatava molekuliosaga (kaudne kihiline analüüs). Näiteks on üks kihilise analüüsi tüüp ELISA-analüüs, milles tuvastatavaks molekuliosaks on mingi ensüüm. Immunohistokeemiaks võib koeproov olla värske või külmutatud või olla sulustatud parafiini ja fikseeritud säilitusaine, näiteks formaliiniga.

H. Rakupõhised analüüsid

(0240) Siin identifitseeritud geenide ja polüpeptiidide vaheliste seoste ning immuunseoselise haiguse arenemise ja patogeneesi edasiseks mõistmiseks võib kasutada rakupõhiseid analüüse ja immuunseoseliste haiguste loomamudeleid.

(0241) Sellest erineva lähenemise kohaselt transfekteeritakse konkreetse immuunseoselise haigusega seotud, tuntud rakutüüpi rakke siin kirjeldatud cDNA-dega ning analüüsitakse nende cDNA-de võimet stimuleerida või inhibeerida immuunfunktsiooni. Sobivaid rakke võib transfekteerida soovitud geeniga ja jälgida immuunfunktsiooni aktiivsust. Seejärel võib selliseid transfekteeritud rakuliine kasutada, et testida polü- või monokloonsete antikehade või antikehakompositsioonide võimet inhibeerida või stimuleerida immuunfunktsiooni, näiteks T-raku prolifererumise moduleerimist või põletikuga seotud raku infiltrerumist. Siin identifitseeritud geenide kodeerivate järjestustega transfekteeritud rakke võib edasi kasutada, et identifitseerida ravimikandidaate immuunseoseliste haiguste ravimiseks.

(0242) Lisaks võib transgeensetest loomadest pärinevaid primaarkultuure (nagu kirjeldatakse allpool) kasutada siin toodud rakupõhistes analüüsides, kuigi eelistatavad on stabiilsed rakuliinid. Transgeensetest loomadest püsivate rakuliinide saamise meetodid on tehnika tasemes hästi tuntud (vaadake näiteks üllitist Small *et al.*, Mol. Cell. Biol., 5:642-648 (1985)).

(0243) Üks sobiv rakupõhine analüüs on lümfotsüütide segareaktsioon (MLR); Current Protocols in Immunology, osa 3. 12; toimetanud J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Marglies, E. M. Shevach, W. Strober, National Institutes of Health, avaldanud kirjastus John Wiley & Sons, Inc. Selles analüüsis analüüsitakse testitava ühendi võimet stimuleerida või

inhibeerida aktiveeritud T-rakkude prolifererumist. Reageerivate T-rakkude suspensiooni kultiveeritakse koos stimuleerivate allogeensete rakkudega ning T-rakkude prolifererumist mõõdetakse triitiumiga märgistatud tümidiini omastamise järgi. See analüüs on T-raku reaktiivsuse üldine mõõt. Kuna aktiveerimisel enamus T-rakkudest reageerib ja toodab IL-2, siis peegeldavad selles analüüsis reageerimise erinevused osaliselt erinevusi IL-2 tootmises reageerivate rakkude poolt. MLR-i tulemusi võib tõestada lümfokiini (IL-2) tuvastamise standardse analüüsiga; Current Protocols in Immunology, eespool, 3. 15, 6. 3.

(0244) T-rakkude proliferatiivne reageerimine MLR-analüüsis võib olla tingitud analüüsitud molekuli otsestest mitogeensetest omadustest või välise antigeeni poolt indutseeritud aktiveerimisest. Lisatõestuse IL-17A/F-polüpeptiidide T-takku stimuleeriva aktiivsuste kohta võib saada kaasstimuleerimisanalüüsiga. T-raku aktiveerumine vajab antigeenspetsiifilist signaali, mida vahendatakse T-raku retseptoriga (TCR-ga), ning kaasstimuleerivat signaali, mida vahendatakse mingi teise ligandi seondumisvastasmõjuga, näiteks B7 (CD80, CD86)/CD28 seondumisvastasmõjuga. CD28 ristseondumine suurendab lümfokiini sekreteerimist aktiveeritud T-rakkude poolt. T-raku aktiveerimist kontrollitakse nii positiivselt kui negatiivselt ligandide, millel on negatiivne või positiivne mõju, seondumise kaudu. CD28 ja CTLA-4 on Ig ülemperokonda kuuluvad sarnased glükovaalid, mis seonduvad B7-ga. CD28 seondumisel B7-ga on positiivne mõju T-raku aktiveerimisele ning vastupidiselt on CTLA-4 seondumisel B7-ga negatiivne mõju T-raku aktiveerimisele; Chambers, C. A., Allison, J. P., Curr. Opin. Immunol., (1997) 9:396. Schwartz, R. H., Cell (1992) 71:1065; Linsley, P. S., Ledbetter, J. A., Annu. Rev. Immunol. (1993) 11:191; June, C. H. *et al.*, Immunol. Today (1994) 15:321; Jenkins, M. K., Immunity (1994) 1:405. Kaasstimuleerimisanalüüsis analüüsitakse IL-17A/F-polüpeptiidide T-raku kaasstimuleeriva või inhibeeriva aktiivsuse suhtes.

(0245) IL-17A/F-polüpeptiidid, mis MLR- ja kaasstimuleerimisanalüüsides määratuna on T-raku prolifererumise stimuleerijad (kaasstimuleerijad) ning agonistid, näiteks agonist-antikehad, on kasutatavad näiteks immuunseoseliste haiguste, mida iseloomustab nõrk, vähem kui optimaalne või ebapiisav immuunfunktsioon, ravimiseks. Neid haigusi ravitakse, stimuleerides T-rakkude prolifererumist ja aktiveerumist (ja T-rakuga vahendatud immuunsust) ning võimendades imetajal immuunvastust stimuleeriva ühendi nagu stimuleerivad IL-17A/F-polüpeptiidid manustamisega. Stimuleeriv polüpeptiid võib olla näiteks IL-17A/F-polüpeptiid või selle agonist-antikeha.

(0246) Leiutisekohase stimuleeriva ühendi otsese kasutamise võib valideerida katsetes glükovalguga 4-1BB, mis on kasvaja nekroosifaktori retseptoriperekonna liige, mis seondub anti-geeniga esmaselt mõjutatud (*primed*) T-rakkudel ekspresseeruva ligandiga (4-1BBL) ning signaalib T-rakkude aktiveerumise ja kasvu kaudu; Alderson, M. E. *et al.*, *J. Immunol.*, 24:2219 (1994).

(0247) Stimuleeriva agonistühendi kasutamine on samuti katseliselt valideeritud. 4-1BB aktiveerimine 4-1BB-vastase agonist-antikehaga töötlemisel võimendab kasvajate hävitamist; Hellstrom, I., Hellstrom, K. E., *Crit. Rev. Immunol.*, 18:1 (1998). Allpool üksikasjalikumalt kirjeldatud immunoadjuvantravi kasvajate ravimiseks on leiutisekohaste stimuleerivate ühendite kasutamise veel üks näide. Immuunsust stimuleeriva või võimendava mõju võib saavutada ka IL-17A/F-i aktiivsuse, mis MLR-analüüsis leitakse kui inhibeeriv, antagonismi või tõkestamisega. Ühendi inhibeeriva mõju vastustamine tekitab stimuleeriva mõju. Sobivad antagonistlikud/tõkestavad ühendid on antikehad või nende fragmendid, mis tunnevad ära ja seonduvad inhibiitorvalguga, tõkestades seega selle valguga tõhusat vastasmõju oma retseptoriga ning inhibeerides signaalimist selle retseptori kaudu. Seda toimet on valideeritud katsetes, milles kasutati CTLA-4-vastaseid antikehasid, mis võimendavad T-raku prolifererumist, eeldatavalt kõrvaldades inhibeeriva signaali, mille põhjustab CTLA-4 seondumine; Walunas, T. L. *et al.*, *Immunity*, 1:405 (1994).

(0248) Alternatiivselt võib immuunsust stimuleeriva või võimendava toime saavutada, manustades IL-17A/F-polüpeptiidi, millel on vaskulaarset läbilaskvust suurendavad omadused. Suurenenud vaskulaarne läbilaskvus võib olla kasulik haiguste puhul, mida võib leevendada immuunrakkude (näiteks monotsüütide, eosinofiilide, PMN-de) paikse infiltreerumise ja põletikuga.

(0249) Teisalt võib IL-17A/F-polüpeptiidi ja lisaks muid ühendeid, mis on T-raku prolifererumise/aktiveerumise, lümfokiinide sekreteerimise ja/või vaskulaarse läbilaskvuse otsesed inhibiitorid, otseselt kasutada immuunvastuse mahasurumiseks. Need ühendid on kasutatavad immuunvastuse määra vähendamiseks ning immuunseoselisi haigusi, mida iseloomustab hüperaktiivne, enam kui optimaalne või autoimmuunne vastus, ravimiseks. Selliste leiutisekohaste ühendite kasutamine on valideeritud eespool kirjeldatud katsetega, mille kohaselt CTLA-4 seondumine retseptoriga B7 inaktiveerib T-rakke. Leiutisekohased otseselt inhibeerivad ühendid toimivad analoogsel viisil. On eeldatav, et vaskulaarset läbilaskvust mahasuruv

ühend vähendab põletikku. Sellised rakendused võivad olla kasulikud ülemäärase põletikuga seotud seisundite ravis.

(0250) Alternatiivselt tekitavad ühendid, näiteks antikehad, mis seonduvad stimuleerivate IL-17A/F-polüpeptiididega ja tõkestavad nende molekulide stimuleerivat toimet, inhibeeriva toime, ning neid võib kasutada T-rakuga vahendatud immuunvastuse mahasurumiseks, inhibeerides T-raku prolifereerumist/aktiveerumist ja/või lümfokiini sekreteerimist. Polüpeptiidide stimuleeriva toime tõkestamine surub maha imetaja immuunvastuse. Seda rakendust on valideeritud katsetes, milles kasutati IL-2-vastast antikeha. Nendes katsetes antikeha seondub IL-2-ga ja tõkestab IL-2 seondumist oma retseptoriga ning sellega saavutatakse T-rakku inhibeeriv toime.

I. Loomamudelid

(0251) Edasi võib rakupõhiste *in vitro* analüüside tulemusi tõestada, kasutades *in vivo* loomamudeleid ja T-raku funktsiooni analüüse. Mõistmaks edasi siin identifitseeritud geenide rolli immuunseoselise haiguse arenemises ja patogeneesis ning kandidaat-raviagensite, sealhulgas antikehade ja natiivsete polüpeptiidide teiste antagonistide, sealhulgas väikese molekuliga antagonistide, tõhususe testimiseks võib kasutada mitmesuguseid hästi tuntud loomamudeleid. Selliste mudelite *in vivo* – olemus võimaldab nendega ennustada vastuseid inim-patsientidel. Immuunseoseliste haiguste loomamudelid hõlmavad nii mitterekombinantseid kui rekombinantseid (transgeenseid) loomi. Mitterekombinantsed loomamudelid hõlmavad näiteks näriliste, näiteks hiiremudeleid. Sellised mudelid võib tekitada rakkude sisestamisega süngeensetesse hiirtesse, kasutades standardseid meetodeid, näiteks nahalusi süstimist, saba-veeni süstimist, põrna siirdamist, kõhuõõnesisest siirdamist, neerukapsli alla siirdamist jne.

(0252) Transplantaadi peremehevastane haigus ilmneb kui immunosupresseeritud või –tolerantsesse patsienti siiratakse immuunkompetentsed rakud. Doonorrakud tunnevad ära peremehe antigeenid ja reageerivad neile. Vastus võib varieeruda eluohtlikust tõsisest põletikust kõhulahtisuse ja kaalukaotuse kergete juhtudeni. Transplantaadi peremehevastase haiguse mudelid pakuvad vahendeid T-rakkude MHC-antigeenide ja siiratud koe minoorsete antigeenide vastase reaktiivsuse hindamiseks. Sobivat toimingut on üksikasjalikult kirjeldatud teoses *Current Protocols in Immunology*, eespool, osas 4.3.

(0253) Siiratud allogeense naha hülgamise loomamudel on vahend, et testida T-rakkude võimet vahendada koe hävitamist *in vivo* ja mõõta nende rolli transplantaadi hülgamises. Kõige tavalisemates ja vastuvõetavamates mudelites kasutatakse hiire sabanaha transplantaate. Korduvad katsed on näidanud, et siiratud naha hülgamist vahendatakse T-rakkude, T-abis-tajarakkude, T-tapja/efektorrakkude ning mitte antikehadega; Auchincloss, H. Jr., Sachs, D. H. *Fundamental Immunology*, 2. väljaanne, toimetanud W. E. Paul, Raven Press, NY, 889-992 (1989). Sobivat toimingut on üksikasjalikult kirjeldatud teose *Current Protocols in Immunology*, eespool, osas 4.4. Muud transplantaadi hülgamise mudelid, mida võib kasutada leiutisekohaste ühendite testimiseks, on allogeense südame siirdamise mudelid, mida on kirjeldatud üllitistes Tanabe, M. *et al.*, *Transplantation*, 58:23 (1994) ja Tinubu, S. A. *et al.*, *J. Immunol.*, 4330-4338 (1994).

(0254) Viivituse tüüpi ülitundlikkuse loomamudelid pakuvad samuti võimalust rakuga vahendatud immuunfunktsiooni analüüsiks. Viivituse tüüpi ülitundlikusreaktsioonid on T-rakuga vahendatud *in vivo* immuunvastus, mida iseloomustab põletik, mis ei saavuta maksimaalset taset enne, kui antigeeniga kokkupuutumisest on möödunud teatud ajavahemik. Sellised reaktsioonid võivad ilmneda ka koospetsiifiliste autoimmuunhaiguste puhul, nagu hulgiskle-roos (*multiple sclerosis* - MS) ja katseline autoimmuunne entsefalomüeliit (*experimental autoimmune encephalomyelitis* – EAE, mis on MS-i mudel). Sobivat toimingut on üksikasja-likult kirjeldatud teoses *Current Protocols in Immunology*, eespool, osas 4.5.

(0255) EAE on T-rakuga vahendatud autoimmuunhaigus, mida iseloomustab T-raku ja mononukleaarse rakuga seotud põletik ning järgnev aksonite demüeliniseerimine kesknärvisüs-teemis. Üldiselt peetakse EAE-d asjakohaseks loomamudeliks inimeste MS-ile; Bolton, C. *Multiple Sclerosis*. 1:143 (1995). Arendatud on nii akuutseid kui halvenemise-paranemisega mudeleid. Leiutisekohaseid ühendeid võib testida T-rakku stimuleeriva või inhibeeriva ak-tiivsuse suhtes, mis on suunatud immuunvahendatud demüeliniseerivale haigusele, kasutades eeskirja, mida on kirjeldatud teose *Current Protocols in Immunology*, eespool, osades 15.1 ja 15.2. Vaadake ka müeliniseeriva haiguse mudeleid, mille kohaselt oligodendrotsüüdid või Schwanni rakud siiratakse kesknärvisüsteemi, nagu on kirjeldatud üllitises Duncan, I. D. *et al.*, *Molec. Med. Today*. 554-561 (1997).

(0256) Kontakt-ülitundlikkus on rakuga vahendatud immuunfunktsiooni lihtne *in vivo* ana-lüüs viivituse tüüpi ülitundlikkuse järgi. Selle toimingu kohaselt toimub naha eksponeerimine eksogeensetele hapteenidele, mille tõttu tekib viivituse tüüpi ülitundlikkusreaktsioon, mis

mõõdetakse ja kvantifitseeritakse. Kontaktundlikkus hõlmab algset tundlikuks muutmise faasi, millele järgneb esilekutsumisfaas. Esilekutsumisfaas ilmneb, kui T-lümfotsüüdid puutuvad kokku rakuga, millega neil oli eelnev kontakt. Ilmneb paistetus ja põletik, mis teeb sellest suurepärase mudeli inimese allergilisele kontaktdermatiidile. Sobivat toimingut on üksikasjalikult kirjeldatud teose Current Protocols in Immunology, toimetajad J. E. Cologan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach ja W. Strober, John Wiley & Sons, Inc., osas 4.2. Vaadake ka üllitist Grabbe, S., Schwarz, T, Immun. Today, 19(1):37-44 (1998).

(0257) Artriidi loomamudeliks on kollageeniga indutseeritud artriit. Sellel mudelil on ühised kliinilised, histoloogilised ja immunoloogilised omadused inimese autoimmuunse reumatoidartriidiga ning see on vastuvõetav inimese autoimmuunse artriidi mudel. Hiire- ja rotimudelid on iseloomustatud liigesepõletiku, kõhre erosiooni ja kõhrealuse luu järgi. Leiutisekohaseid ühendeid võib testida autoimmuunse artriidi vastase aktiivsuse järgi, kasutades eeskirju, mida on kirjeldatud teose Current Protocols in Immunology, eespool, osas 15.5. Vaadake ka CD18-vastast monokloonset antikeha ja VLA-4-integriine rakendavat mudelit, mis on kirjeldatud üllitises Issekutz, A. C. *et al.*, Immunology, 88:569 (1996).

(0258) Kirjeldatud on astmamudelit, mille kohaselt antigeeniga indutseeritav hingamisteede ülitundlikkus, kopsu eosinofiilia ja -põletik indutseeritakse, muutes looma ovalbumiiniga tundlikuks ning viies seejärel looma kokku sama valguga, mis toimetatakse kohale aerosooliga. Mitmetes loomamudelites (merisea-, sea-, roti, inimesest erineva primaadi mudelites) ilmnevad sümptomid, mis on sarnased atoopilise astmaga inimestel, kes puutuvad kokku aerosooli kujul antigeenidega. Hiiremudelitel on inimese astma mitmed tunnused. Sobivaid toiminguid, millega testida leiutisekohaseid ühendeid aktiivsuse ja tõhususe suhtes astma ravis, on kirjeldatud üllitises W. W. *et al.*, Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 18:777 (1998) ja selles tsiteeritud viidetes.

(0259) Lisaks võib leiutisekohaseid ühendeid testida psoriaasi- ja sellega sarnaste haiguste mudelites. On tõendeid, mis viitavad T-rakulisele patogeneesile psoriaasi puhul. Leiutisekohaseid ühendeid võib testida *scid/scid* hiiremudelil, mida on kirjeldatud üllitises Schon, M. P. *et al.*, Nat. Med., 3:183 (1997), ning mille puhul hiirtel ilmnevad psoriaasiga sarnanevad naha histopatoloogilised haiguskolded. Veel üks sobiv mudel on inimese naha / *scid*-hiire kimäärne mudel, mis valmistatakse, nagu on kirjeldatud üllitises Nickoloff, B. J. *et al.*, Am. J. Path., 146:580 (1995).

(0260) Inimesest erinevate loomade rekombinantseid (transgeensed) mudeleid võib kujundada, sisestades huvipakkuvate loomade genoomi siin identifitseeritud geenide kodeerivaid osasid ning kasutades transgeensete loomade tegemiseks standardseid meetodeid. Transgeense manipuleerimise sihtmärgiks olla võivate loomade näited hõlmavad, nendega piirdumata, hiiri, rotte, küülikuid, merisigu, lambaid, kitsi, sigu ja inimesest erinevaid primaate, näiteks paaviane, šimpanse ja pädikuid. Sellistesse loomadesse transgeeni sisestamise meetodid, mis on tehnika tasemes tuntud, hõlmavad mikrosüstimist pronukleusse (Hoppe, Wanger, US patent nr 4873191), retrovirusega vahendatud geeniülekanne iduliinidesse (näiteks Van der Putten *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:6148-615 (1985)), geenile suunamist embrüonaalsetes tüvirakkudes (Thompson *et al.*, Cell, 56:313-321 (1989)), embrüote elektroporeerimist (Lo, Mol. Cel. Biol., 3:1803-1814 (1983)), spermatotsüüdiga vahendatud geeniülekanne (Lavitrano *et al.*, Cell, 57:717-73 (1989)). Ülevaateks vaadake näiteks US patenti nr 4736866.

(0261) Käesoleva leiutise eesmärgil hõlmavad transgeensed loomad loomi, kellel on transgeen vaid osades rakkudes (“mosaiiksed loomad”). Transgeen võib olla integreeritud üksiku transgeeni või konkatemeeridena, näiteks pea-pea- või pea-saba-tandemitena. Samuti on võimalik transgeeni selektiivne sisestamine konkreetsesse rakutüüpi, järgides näiteks üllitises Lasko *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:6232-636 (1992) toodud meetodit.

(0262) Transgeeni ekspressiooni transgeensetes loomades võib jälgida standardsete meetoditega. Näiteks võib kasutada *Southern blot* analüüsi või amplifitseerimist PCR-ga, et tõestada transgeeni integreerumist. Seejärel võib mRNA ekspressioonitaset analüüsida, kasutades meetodeid, nagu *in situ* hübridiseerimine, *Northern blot* analüüs, PCR või immunotsütokeemia.

(0263) Lisaks võib loomi testida immuunhaiguse patoloogia tunnuste järgi, näiteks histoloogilise testimisega, et määrata immuunrakkude infiltrerumist spetsiifilistesse kudedesse. Samuti võib teostada tõkestamiskatseid, mille kohaselt transgeenseid loomi töödeldakse leuitisekohaste ühenditega, et määrata ulatus, millega need ühendid stimuleerivad või inhibeerivad T-raku prolifererumist. Nendes katsetes manustatakse loomale IL-17A/F-polüpeptiidiga seonduvaid tõkestavaid antikehasid, mis valmistatakse selliselt, nagu on kirjeldatud eespool, ning määratakse toime immuunfunktsioonile.

(0264) Alternatiivselt võib konstrueerida “väljalülitusega” loomi, kellel polüpeptiidi kodeeriva endogeense geeni ja sama polüpeptiidi kodeeriva kodeeriva genoomse DNA, mis on

sisestatud looma embrüonaalsesse raku, vahelise homoloogse rekombinatsiooni tulemusel on siin identifitseeritud polüpeptiidi kodeeriv geen puudulik või muutunud. Näiteks võib vastavalt väljakujunenud meetoditele kasutada konkreetset polüpeptiidi kodeerivat cDNA-d, et kloonida genoomne DNA, mis kodeerib seda polüpeptiidi. Osa konkreetset polüpeptiidi kodeerivast genoomsest DNA-st võib eemaldada või asendada mõne muu geeniga, näiteks selektsioonimarkeri, mida saab kasutada integreerumise jälgimiseks, võib asendada kodeeriva geeniga. Tüüpiliselt kaasatakse vektorisse mitu tuhat aluspaari muutmata külgneva DNA (nii 5'- kui 3'-otsa) (homoloogse rekombinatsiooni vektorite kirjeldust vaadake näiteks üllitise Thomas, Capecchi, *Cell*, 51:503 (1987)). Vektor sisestatakse embrüonaalse tüviraku liini (näiteks elektroporeerimisega) ning selekteeritakse rakkude suhtes, milles sisseviidud DNA on homoloogset rekombineerunud endogeense DNA-ga (vaadake näiteks üllitist Li *et al.*, *Cell*, 69:915 (1992)). Seejärel süstitakse selekteeritud rakud looma (näiteks hiire või roti) blastotsüsti, et moodustada agregeerumiskimääre (vaadake näiteks Bradley osa teoses *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, toimetaja E. J. Robertson (IRL, Oxford, 1987), lk 113-152). Kimäärse embrüo võib siirata sobivasse pseudotiinesse emasessa asenduslooma ning embrüost tekitatakse "väljalülitusega" loom. Järglaskonna, kes oma sugurakkudes kannab homoloogset rekombineerunud DNA-d, võib identifitseerida standardsete meetoditega ja kasutada, et aretada loomi, kelle kõigis rakkudes sisaldub homoloogset rekombineerunud DNA. Väljalülitusega loomi võib iseloomustada näiteks nende võime järgi omada kaitset kindlate patoloogiliste seisundite suhtes ning polüpeptiidi puudumisest tingitud kindlate patoloogiliste seisundite arenemise järgi.

J. Immunoadjuvantravi

(0265) Ühes teostuses võib leiutisekohaseid immunostimuleerivaid ühendeid kasutada immunoadjuvantravis, et ravida kasvajaid (vähki). Käesolevalt on hästi teada, et T-rakud tunnevad ära inimese kasvajaspetsiifilisi antigeene. Üks kasvajaantigeenide rühm, mida kodeeritakse perekondadesse MAGE, BAGE ja GAGE kuuluvate geenidega, on kõigis normaalsetes täiskasvanud kudedes vaikivas olekus, kuid neid ekspresseeritakse märkimisväärtetes kogustes kasvajates, nagu melanoomid, kopsukasvajad, pea- ja kaelapiirkonna kasvajakud ja põiekasvajad; DeSmet, C. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:7149 (1996). On näidatud, et T-rakkude kaasstimuleerimine indutseerib kasvaja taandarengu ja kasvjavastase vastuse nii

in vitro kui *in vivo*; Melero, I. *et al.*, Nature Medicine, 3:682 (1997); Kwon, E. D. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94: 8099 (1997); Lynch, D. H. *et al.*, Nature Medicine, 3:625 (1997); Finn, O. J., Lotze, M. T., J. Immunol., 21:114 (1998). Leiutisekohaseid stimuleerivaid ühendeid võib manustada adjuvantidena eraldi või koos kasvu reguleeriva agensi, tsütotoksilise agensi või keemiaraviagensiga, et stimuleerida T-raku prolifererumist/aktiveerumist ja kasvavajavastast vastust kasvajaantigeenide suhtes. Kasvu reguleeriva, tsütotoksilise või keemiaraviagensi võib manustada tavapärasest koguses, kasutades tuntud manustamisrežiime. Leiutisekohaste ühendite immunostimuleeriv aktiivsus võimaldab kasvu reguleeriva, tsütotoksilise või keemiaraviagensite koguste vähendamist, millega potentsiaalselt vähendatakse toksilisust patsiendile.

K. Ravimikandidaatide skriinimisanalüüsid

(0266) Ravimikandidaatide skriinimisanalüüsid kujundatakse, et identifitseerida ühendeid, mis seonduvad või moodustavad kompleksi siin identifitseeritud geenidega kodeeritavate polüpeptiidide või nende bioloogiliselt aktiivse fragmendiga, või mis muul viisil häirivad kodeeritavate polüpeptiidide vastasmõju muude rakuliste valkudega. Sellised skriinimisanalüüsid hõlmaks keemiliste kogude suure läbilaskevõimega skriinimiseks kohaldatavaid analüüse, mis on eriti sobivad väikese molekuliga ravimkandidaatide identifitseerimiseks. Kõne all olevad väikese molekuliga ühendid hõlmavad sünteetilisi orgaanilisi või anorgaanilisi ühendeid, sealhulgas peptiide, eelistatavalt lahustuvaid peptiide, (polü)peptiidi ja immunoglobuliini liitvalke ja eriti antikehasid, mille hulgas on piiranguteta polü- ja monokloonsed antikehad ning antikeha fragmendid, üheaheelalised antikehad, idiotüübivastased antikehad ning selliste antikehade või fragmentide kimäärsed ja humaniseeritud versioonid, ning lisaks inimese antikehad ja nende fragmendid. Analüüse võib teostada erinevates vormides, sealhulgas valk-valk-seondumisanalüüside, biokeemiliste seondumisanalüüside, immuunanalüüside ja rakupõhiste analüüsidenä, mis on tehnika tasemes hästi iseloomustatud. Ühise omadusena on kõikides analüüsides vaja kandidaatravimi ühendusse viimist siin identifitseeritud nukleiinhappega kodeeritava polüpeptiidiga tingimustes ja aja jooksul, mis on piisavad, et võimaldada nende kahe koostiosa vastasmõju.

(0267) Seondumisanalüüsides on vastasmõjukuks seondumine ning moodustunud kompleksi võib reaktsioonisegust eraldada või tuvastada. Konkreetsetes teostuses immobiliseeritakse siin

identifitseeritud geeniga kodeeritav polüpeptiid või ravimikandidaat tahkele faasile, näiteks mikrotiiterplaadile, kovalentsete või mittekovalentsete sidemetega. Üldiselt teostatakse mittekovalentne sidumine, kattes tahke pinna polüpeptiidi lahusega ja kuivatades. Alternatiivselt võib kasutada immobiliseeritava polüpeptiidi suhtes spetsiifilist immobiliseeritud antikeha, näiteks monokloonset antikeha, et ankurdada polüpeptiid tahkele pinnale. Analüüs teostatakse, lisades immobiliseeritud koostisosale, näiteks ankurdatud koostisosa sisaldavale kaetud pinnale, immobiliseerimata koostisosa, mis võib olla märgistatud tuvastatava märgisega. Kui reaktsioon on toimunud, eemaldatakse mittereageerinud koostisosad näiteks pesemisega ning tuvastatakse tahkele pinnale ankurdunud kompleksid. Kui algselt immobiliseerimata koostisosal on tuvastatav märgis, siis viitab pinnale immobiliseerunud märgis kompleksi esinemisele. Kui algselt immobiliseerimata koostisosal ei ole märgist, saab kompleksi moodustumist tuvastada, kasutades näiteks immobiliseeritud kompleksile spetsiifiliselt seonduvat märgistatud antikeha.

(0268) Kui kandidaathendil on vastasmõju, kuid see ei seonu siin identifitseeritud geeniga kodeeritava konkreetse valguga, saab vastasmõju selle polüpeptiidiga analüüsida valk-valk vastasmõju tuvastamise hästi tuntud meetoditega. Sellised analüüsid hõlmavad tavapäraseid lähenemisi, nagu näiteks ristsidumine, immuunkaassadestamine, kaaspuhastamine gradientide või kromatograafiliste kolonnidega. Lisaks võib valk-valk vastasmõjusid jälgida, kasutades Fields'i ja kaastöölise poolt kirjeldatud pärmipõhist geneetilist süsteemi (Fields, Song, Nature (London), 340:245-246 (1989); Chien *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:9578-9582 (1991)), nagu on avaldatud ka üllitises Chevray, Nathans, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5789-5793 (1991). Paljud transkriptsiooni aktiveerijad nagu pärmi GAL4 sisaldavad kahte füüsiliselt eraldatud modulaarset domeeni, millest üks toimib DNA-ga seonduva domeenina ja teine toimib transkriptsiooni aktiveeriva domeenina. Eelspool toodud üllitistes kirjeldatud pärmi ekspressioonisüsteemis (nimetatud üldiselt „kaksikhübriidsüsteemiks”) kasutatakse seda omadust ning rakendatakse kahte hübriidset valku – ühte, milles sihtmärkvalk on liidetud GAL4-domeeniga, mis seondub DNA-ga, ja teist, milles kandidaatideks olevad aktiveerivad valgud on liidetud aktiveeriva domeeniga. GAL1-*lacZ* reportergeeni ekspresseerumine GAL4-aktiveeritava promootori kontrolli all sõltub GAL4 aktiivsuse taasmoodustumisest valk-valk vastasmõju kaudu. Vastasmõjus olevaid polüpeptiide sisaldavad kolooniad tuvastatakse β -galaktosidaasi kromogeense substraadiga. Täielik kompleks (MATCHMAKER™) kahe spetsiifilise valgu vaheliste valk-valk vastasmõjude identifitseerimiseks kaksikhübriid-

meetodit kasutades, on kaubanduslikult saadav firmast Clontech. Seda süsteemi saab ka laiendada valgu spetsiifiliste vastasmõjudega seotud valgudomeenide kaardistamiseks ning ka nendes vastasmõjudes otsustava tähtsusega aminohappejääkide täpseks näitamiseks.

(0269) Ühendite, mis häirivad siin identifitseeritud geeni ja muude rakusiseste või –välise koostisosade vastasmõju, leidmiseks võib testida järgnevalt: tavaliselt valmistatakse selle geeni saadust ning rakusisest või –välist koostisosa sisaldav reaktsioonisegu tingimustes ja aja jooksul, mis võimaldab kahe saaduse vastasmõju ning seondumist. Testimaks kandidaatühendi võimet seondumist inhibeerida, viiakse reaktsioon läbi nii testitava ühendi puudumisel kui esinemisel. Lisaks võib kolmandasse reaktsioonisegusse lisada positiivse kontrollina platseebot. Testitava ühendi ning rakusisese või –välise koostisosa vahelise seondumise (kompleksi moodustumise) esinemist segus jälgitakse selliselt, nagu on kirjeldatud eespool. Kompleksi moodustumine kontrollreaktsiooni(de)s, kuid mitte testitavat ühendit sisaldavas reaktsioonisegus, viitab, et testitav ühend häirib testitava ühendi ja selle reaktsioonipartneri vastasmõju.

L. Kompositsioonid ja meetodid immuunseoseliste haiguste ravimiseks

(0270) Immuunseoseliste haiguste ravimiseks kasutatavad kompositsioonid hõlmavad piiramatult valke, antikehasid, väikesi orgaanilisi molekule, peptiide, fosfopeptiide, antisenss- ja ribosüümmolekule, kolmikheeliksmolekule jne, mis inhibeerivad või stimuleerivad immuunfunktsiooni, näiteks T-raku prolifererumist/aktiveerumist, lümfokiini vabastamist või immuunsusega seotud raku infiltreerumist.

(0271) Näiteks antisenss-RNA- ja antisenss-DNA-molekulid toimivad mRNA transleerimist otseselt tõkestavalt, hübridiseerudes sihtmärk-RNA-ga ja hoides ära valgu transleerimise. Kui kasutatakse antisenss-DNA-d, siis on eelistatavad oligodesoksüribonukleotiidid, mis pärinevad translatsiooni algatamise kohast, näiteks sihtmärkgeeni nukleotiidjärjestuse asendite -10 ja +10 vahelt.

(0272) Ribosüümid on ensümaatilised RNA-molekulid, mis on võimelised katalüüsima RNA spetsiifilist lõikamist. Ribosüümid toimivad komplementaarse sihtmärk-RNA-ga järjestuse-spetsiifiliselt hübridiseerudes, millele järgneb endonukleolüütiline lõikamine. Ribosüümidiga lõikamise spetsiifilisi kohti võimalikus sihtmärk-RNA-s võib identifitseerida tuntud meeto-

ditega. Lisaüksikasjade kohta vaadake näiteks üllitist Rossi, *Current Biology*, 4:469-471 (1994) ja PCT publikatsiooni nr WO97/33551 (avaldatud 18. septembril 1997).

(0273) Kolmikheeliksi moodustamises osalevad nukleiinhappemolekulid, mida kasutatakse transkriptsiooni inhibeerimiseks, peaksid olema üheaahelalised ja koosnema desoksünukleotiididest. Nende oligonukleotiidide aluste koostis kujundatakse selliselt, et see soodustab kolmikheeliksi moodustumist aluste paardumisega Hoogsteeni reeglite järgi, mis üldiselt nõuavad mahukaid puriinide või pürimidiinidega lõike duplexi ühes ahelas. Lisaüksikasjade kohta vaadake näiteks PCT publikatsiooni nr WO97/33551, *supra*.

(0274) Selliseid molekule võib identifitseerida eespool arutluse all olnud skriinimismeetodite mistahes kombinatsiooni ning/või mistahes muu skriinimismeetodiga, mis on eriala asjatundjatele hästi tuntud.

M. IL-17A/F-vastased antikehad

(0275) Ühes teostuses pakutakse leiutises IL-17A/F-vastaseid antikehasid, mis siin võivad leida kasutust ravi- ja/või diagnostiliste agensitena. Iseloomulikud antikehad hõlmavad polükloonseid, monokloonseid, humaniseeritud, bispetsiifilisi ja heterokonjugaat-antikehasid.

1. Polükloonsed antikehad

(0276) Eelistatavalt kutsutakse polükloonsed antikehad loomades esile asjakohase antigeeni ja adjuvandi ühe või mitme nahaalusi (*subcutaneous* - sc) või kõhuõõnesisese (*intraperitoneal* - ip) süstiga. Kasulik võib olla asjakohase antigeeni konjugeerimine immuniseeritavas liigis immunogeense valguga. Näiteks võib antigeeni konjugeerida meriteo (*keyhole limpet*) hemotsüaniini (KLH), seerumi albumiini, veise türoglobuliini või trüpsiini inhibiitoriga soja-oast, kasutades bifunktsionaalset või derivaativat agensit, näiteks maleimidobensoülsulfosuktsiinimiidestrit (konjugeerimine tsüsteiinijääkide kaudu), N-hüdrosüsuktsiinimiidi (lüsiinijääkide kaudu), glutaaraldehüüdi, suktsiinanhüdriidi, SOCl_2 või $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, milles R and R^1 on erinevad alküülrühmad.

(0277) Loomi immuniseeritakse antigeenide, immunogeensete konjugaatide või derivaatide vastu, kombineerides näiteks 100 µg või 5 µg valku või konjugaati (vastavalt küülikute või hiirte jaoks) 3 mahu Freund'i täieliku adjuvandiga ning süstides lahuse nahasiseselt mitmesse

kohta. Kuu aega hiljem võimendatakse loomal toimet 1/5 kuni 1/10 kogusega algsest peptiidi või konjugaadi kogusest Freund'i täielikus adjuvandis, süstides nahaalusi mitmesse kohta. Seitse kuni 14 päeva hiljem võetakse loomadelt verd ja analüüsitakse antikehade tiitrit seerumis. Loomadel võimendatakse toimet seni, kuni tiiter saavutab platoo. Konjugaate võib teha ka liitvalkudena rekombinantse raku kultuuris. Samuti on immuunvastuse võimendamiseks sobiv kasutada agregeerivaid agenseid nagu alum.

2. Monokloonsed antikehad

(0278) Monokloonseid antikehasid võib teha hübriidoomimeetodiga, mida on esimesena kirjeldatud üllitises Kohler *et al.*, Nature, 256:495 (1975), või neid võib teha rekombinantse DNA meetoditega (US patent nr 4816567).

(0279) Hübriidoomimeetodi kohaselt immuniseeritakse selliselt, nagu on kirjeldatud eespool, hiir või muu sobiv peremeesloom nagu hamster, et kutsuda esile lümfotsüüdid, mis toodavad või on võimelised tootma immuniseerimiseks kasutatud valguga spetsiifiliselt seonduvaid antikehasid. Alternatiivselt võib lümfotsüüte immuniseerida *in vitro*. Kasutades sobivat liitvat agensit nagu polüetüleenglükool, liidetakse pärast immuniseerimist eraldatud lümfotsüüdid müeloomi rakuliiniga, et moodustuks hübriidoomirakk (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, lk 59-103 (Academic Press, 1986)).

(0280) Selliselt valmistatud hübriidoomirakud külvatakse ja neid kasvatatakse sobivas kultiveerimiskeskkonnas, mis eelistatavalt sisaldab mitteliitunud lähtemüeloomirakkude (mida nimetatakse ka liitumispartneriteks) kasvu või elumust inhibeerivat ühte või enam ainet. Näiteks kui lähtemüeloomirakkudel puudub ensüüm hüpoksantiinguaniinfosforibosüüli transferaas (HGPRT või HPRT), siis sisaldab hübriidoomide selektiivne kultiveerimiskeskond tüüpiliselt hüpoksantiini, aminopteriini ja tümidiini (HAT-keskkond), mis on HGPRT-puudulike rakkude kasvu ärahoidvad ained.

(0281) Eelistatavad liitumispartneriks olevad müeloomirakud liituvad tõhusalt, toetavad antikeha stabiilset ja kõrgetasemelist tootmist antikeha tootvate valitud rakkude poolt ja on tundlikud selektiivsele keskkonnale, millega selekteeritakse liitumata eellasrakkude vastu. Eelistatavad müeloomi rakuliinid on hiire müeloomiliinid, nagu need, mis on saadud hiire kasvajatelt MOPC-21 ja MPC-11 ja on kättesaadavad Salk'i instituudi rakkude jaotamise keskusest (*Cell Distribution Center*), San Diego, California, US, ning SP-2 ja derivaadid

nagu X63-Ag8-653-rakud mis on kättesaadavad Ameerika tüüpkultuuri kollektsioonist (*American Type Culture Collection*), Manassas, Virginia, US. On kirjeldatud ka inimese müeloomi ja hiire-inimese heteromüeloomi rakuliine inimese monokloonsete antikehade tootmiseks (Kozbor, J. *Immunol.*, 133:3001 (1984) ja Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, lk 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

(0282) Kultiveerimiskeskonda, milles hübriidomirakud kasvavad, analüüsitakse antigeeni vastu suunatud monokloonsete antikehade tootmise suhtes. Eelistatavalt määratakse hübriidomirakkude poolt toodetud monokloonsete antikehade seondumise spetsiifilisus immuun-sadestamise või *in vitro* seondumisanalüüsiga, nagu radioimmuunanalüüs (RIA) või ensüümi-seoseline immunoabsorbentanalüüs (*enzyme-linked immunoabsorbent assay* - ELISA).

(0283) Monokloonse antikeha seondumise afiinsust võib määrata näiteks Scatchardi analüüsiga, mida kirjeldatakse üllitises Munson *et al.*, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

(0284) Kui soovitud spetsiifilisuse, afiinsuse ja/või aktiivsusega antikehasid tootvad hübriidomirakud on identifitseeritud, võib kloone subkloonida piirlahjenduse meetodil ning kasvatada standardsete meetoditega (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 59-103 (Academic Press, 1986)). Selleks eesmärgiks sobiv kultiveerimiskeskond hõlmab näiteks D-MEM- või RPMI-1640-keskkonda. Lisaks võib hübriidomirakke kasvatada *in vivo* astsiidkasvajatena loomas, näiteks rakkude kõhuõõnesiseses süstimise järgselt hiirtes.

(0285) Subkloonide poolt sekreteeritud monokloonsed antikehad eraldatakse sobivalt kultiveerimiskeskonnast, astsiidivedelikust või seerumist antikeha puhastamise tavapäraste toimingutega, näiteks afiinsuskromatograafia (näiteks kasutades A-valku või G-valk-Sepharose'i) või ionvahetuskromatograafia, hüdroksüapatiitkromatograafia, geelelektroforeesi, dialüüsiga jne.

(0286) Monokloonseid antikehasid kodeeriv DNA on hõlpsalt eraldatav ja sekveneeritav, kasutades tavapäraseid toiminguid (näiteks kasutades oligonukleotiidsone, mis on võimelised spetsiifiliselt seonduma hiire monokloonsete antikehade kergeid ja raskeid ahelaid kodeerivate geenidega). Hübriidomirakud on sellise DNA eelistatav allikas. Korra juba eraldatuna võib DNA panna ekspressioonivektoritesse, mis rekombinantsetes peremeesrakkudes monokloonsete antikehade sünteesi saavutamiseks transfekteeritakse seejärel sobivatesse peremeesrakkudesse, nagu *E. coli* rakud, ahvi COS-rakud, hiina hamstri munasarjarakud (CHO) või müeloomirakud, mis muidu antikehavalku ei tooda. Ülevaateartiklid antikeha kodeeriva DNA bakteris rekombinantse ekspresseerimise kohta hõlmavad üllitisi Skerra *et*

al., *Curr. Opinion in Immunol.*, 5:256-262 (1993) ja Pluckthun, *Immunol. Revs.*, 130:151-188 (1992).

(0287) Lisateostuses võib monokloonseid antikehasid või antikeha fragmente eraldada antikeha faagikogudest, mis on tekitatud üllitises McCafferty *et al.*, *Nature*, 348:552-554 (1990) kirjeldatud meetoditega. Üllitistes Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628-(1991) ja Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991) on kirjeldatud vastavalt hiire ja inimese antikehade eraldamist, kasutades faagikogusid. Järgnevates üllitistes on kirjeldatud kõrge afiinsusega (nM skaalas) inimese antikehade tootmist ahela segamisega (*chain shuffling*) (Marks *et al.*, *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992)) ja lisaks kombineeritud nakatamist ja *in vivo* rekombineerimist kui strateegiat väga suurte faagikogude konstrueerimiseks (Waterhouse *et al.*, *Nuc. Acids. Res.*, 21:2265-2266 (1993)). Seega on need monokloonsete antikehade eraldamise meetodid elujõulised alternatiivid traditsioonilistele monokloonse antikeha hübridoomimeetoditele.

(0288) Kimäärsete või liitantikehade polüpeptiidide tootmiseks võib antikeha kodeerivat DNA-d muuta, asendades näiteks inimese raske ahela ja kerge ahela konstantsete domeenide (C_H ja C_L) järjestused hiire homoloogsete järjestuste kohale (US patent nr 4816567 ja Morrison, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984)) või liites immunoglobuliini kodeeriva järjestuse kovalentselt terviku või osaga järjestusest, mis kodeerib immunoglobuliinist erinevat polüpeptiidi (heteroloogset polüpeptiidi). Selliste immunoglobuliinist erinevate polüpeptiididega võib asendada antikeha konstantsed domeenid või asendada antikeha ühe antigeeniseoselise koha varieeruvad domeenid, et tekitada kimäärne bivalentne antikeha, mis sisaldab ühte, mingi antigeeni suhtes spetsiifilist antigeeniseoselist kohta, ning teist, eelmisest erineva antigeeni suhtes spetsiifilist antigeeniseoselist kohta.

3. Inimese ja humaniseeritud antikehad

(0289) Leitud kohased IL-17A/F-vastased antikehad võivad lisaks hõlmata humaniseeritud antikehasid või inimese antikehasid. Mitte inimese päritoluga (näiteks närilise) antikehade humaniseeritud vormid on kimäärsed immunoglobuliinid, immunoglobuliinahelad või nende fragmendid (nagu F_v, Fab, Fab', F(ab')₂ või antikehade muud antigeeniseoselised alamjärjestused), mis sisaldavad minimaalselt inimesest erineva päritoluga immunoglobuliini järjestust. Humaniseeritud antikehad hõlmavad inimese immunoglobuliini (retsipient-antikeha), milles

retsipiendi komplementaarsust määrava piirkonna (*complementary determining region* - CDR) jäägid on asendatud muude liikide kui inimene, nagu hiir, rott või küülik, CDR-i jääkidega, millel on soovitatav spetsiifilisus, afiinsus ja võimekus. Mõnel juhul asendatakse inimese immunoglobuliini Fv-raamistiku jäägid vastavate inimesest erineva päritoluga jääkidega. Humaniseeritud antikehad võivad sisaldada ka jääke, mida ei leidu retsipient-antikehas ega ka sissetoodud CDR-i või raamistiku järjestustes. Üldiselt sisaldab humaniseeritud antikeha praktiliselt vähemalt ühte ning tüüpiliselt kahte tervet varieeruvat domeeni, milles kõik või praktiliselt kõik CDR piirkonnad vastavad inimesest erineva päritoluga immunoglobuliinile ning kõik või praktiliselt kõik FR-piirkonnad on inimese immunoglobuliini konsensusjärjestusega. Optimaalselt sisaldab humaniseeritud antikeha vähemalt osa immunoglobuliini, mis tüüpiliselt on inimese immunoglobuliin, konstantsest piirkonnast (Fc-st) (Jones *et al.*, Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature, 332:323-329 (1988) ning Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596 (1992)).

(0290) Inimesest erineva päritoluga antikehade humaniseerimise meetodid on tehnika tasemes hästi tuntud. Üldiselt on humaniseeritud antikehas üks või enam aminohappejääki, mis on sellesse viidud inimesest erineva päritoluga algmaterjalist. Neid inimesest erineva päritolu aminohappejääke nimetatakse tihti „sissetoodud” jääkideks, mis tüüpiliselt on võetud „sissetoodud” varieeruvast domeenist. Humaniseerimist võib praktiliselt teostada Winteri ja kaastöölise meetodiga (Jones *et al.*, Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyen *et al.*, Science, 239:1534-1536 (1988)), asendades närilise CDR-id või CDR-i järjestused inimese antikehade vastavate järjestustega. Sellised „humaniseeritud” antikehad on kimäärsed antikehad (USA patent nr 4816567), milles vastava inimesest erinevatest liikidest pärinevate järjestusega on asendatud oluliselt vähem kui terve inimese varieeruv domeen. Tegelikuses on humaniseeritud antikehad tüüpiliselt inimese antikehad, milles mõned CDR-i jäägid, ja võimalik, et mõned FR-i jäägid, on asendatud jääkidega närilise antikeha analoogsetest kohtadest.

(0291) Antigeesuse ja HAMA (*human anti-mouse antibody* - hiire antikeha vastase inimese antikeha) vastuse vähendamiseks on humaniseeritud antikehade valmistamiseks kasutatavate inimese varieeruvate domeenide, nii kerge kui raske, valik väga tähtis. Vastavalt niinimetatud „parima sobitumise“ meetodile skriinitakse närilise antikeha varieeruva domeeni järjestust inimese tuntud varieeruvate domeenide järjestuste täieliku kogu vastu. Identifitseeritakse hiire järjestusele kõige lähedasem inimese V-domeeni järjestus ning selles olevat inimese

raamistiku (FR-) piirkonda kasutatakse humaniseeritud antikehas (Sims *et al.*, J. Immunol., 151:2296 (1993), Chothia *et al.*, J. Mol. Biol., 196:901 (1987)). Veel ühe meetodi kohaselt kasutatakse konkreetset raamistikupiirkonda, mis tuletatakse kõikide konkreetseesse alamrühma kuuluvate inimese antikehade kergete või raskete ahelate konsensusjärjestusest. Sama raamistikku võib kasutada mitme erineva humaniseeritud antikeha jaoks (Carter *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta *et al.*, J. Immunol., 151:2623 (1993)).

(0292) Lisaks on tähtis, et humaniseerimisega säiliks antikehadel kõrge seondumisafiinsus antigeeni suhtes ning muud kasulikud bioloogilised omadused. Vastavalt selle eesmärgi saavutamise eelistatavale meetodile, valmistatakse humaniseeritud antikehasid lähtejärjestuste ja mitmesuguste kontseptuaalsete humaniseeritud saaduste analüüsiprotsessiga, kasutades lähte- ja humaniseeritud järjestuste kolmemõõtmelisi mudeleid. Immunoglobuliini kolmemõõtmelised mudelid on eriala asjatundjatele harilikult kättesaadavad ja tuttavad. Kättesaadavad on arvutiprogrammid, mis illustreerivad ja kuvavad valitud kandidaat-immunoglobuliini järjestuste tõenäolisi kolmemõõtmelisi konformatsioonilisi struktuure. Nende kuvade ülevaatamine võimaldab analüüsida jääkide tõenäolist rolli kandidaat-immunoglobuliini järjestuse toimimises, see tähendab jääkide, mis mõjutavad kandidaat-immunoglobuliini seondumist sellele omase antigeeniga, analüüsimist. Sel viisil võib valida ja kombineerida vastuvõtvast ja importjärjestustest pärinevaid FR-i jääke selliselt, et saavutatakse soovitud antikeha tunnus nagu suurenenud afiinsus sihtmärkantigeeni(de) suhtes. Üldiselt on hüpervarieeruva piirkonna jäägid otseselt ja kõige sisulisemalt hõlmatud antigeeniga seondumise mõjutamisse.

(0293) Peetakse võimalikuks IL-17A/F-vastast humaniseeritud antikeha. Näiteks võib humaniseeritud antikeha olla antikeha fragment, nagu Fab, mis immunokonjugaadi tekitamiseks on valikuliselt konjugeeritud ühe või enama tsütotoksilise agensiga. Alternatiivselt võib humaniseeritud antikeha olla terviklik antikeha nagu terviklik IgG₁-antikeha.

(0294) Alternatiivina humaniseerimisele võib tekitada inimese antikehasid. Näiteks on tänapäeval võimalik teha transgeenseid loomi (näiteks hiiri), kes on immuniseerimise puhul võimelised tootma inimese antikehade täielikku repertuaari ja kellel puudub endogeense immunoglobuliini tootmine. Näiteks on kirjeldatud, et antikeha raske ahela ühendava piirkonna (J_H) geeni homosügootne deletsioon kimäärsetes ja idutee-mutatsiooniga hiirtes annab tulemuseks endogeense antikeha tootmise täieliku inhibeerimise. Inimese immunoglobuliini idutee geenirivi ülekanne sellistesse idutee-mutatsiooniga hiirtesse annaks antigeeni eksponeerimisel tulemuseks inimese antikehade tootmise; vaadake näiteks üllitisi Jakobovits *et al.*,

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits *et al.*, Nature, 362:255-258 (1993); Bruggemann *et al.*, Year in Immuno. 7:33 (1993); US patendid nr 5545806, 5569825, 5591669 (kõik kuuluvad firmale GenPharm), 5545807; ning WO97/17852.

(0295) Alternatiivselt võib kasutada faagimeetodi tehnoloogiat (McCafferty *et al.*, Nature, 348:552-553 (1990)), et immuniseerimata doonoritest pärinevatest immunoglobuliini varieeruva (V) domeeni geeni repertuaarist teha inimese antikehasid ja antikeha fragmente *in vitro*. Vastavalt sellele meetodile kloonitakse antikeha V-domeeni geenid samas lugemisraamis filamentse bakteriofaagi, nagu M13 või fd, suure või väikese kattevalgu geeniga ning neid esitletakse faagiosakese pinnal antikeha funktsionaalsete fragmentidena. Kuna filamentne osake sisaldab faagi genoomi üheaheelalise DNA koopiat, siis annavad antikeha funktsionaalsetele omadustele põhinevad selekteerimised tulemuseks ka nende omadustega antikeha kodeeriva geeni selekteerimise. Seega matkib faag mõnda B-raku omadustest. Faagiga esitlemist võib teostada mitmesugustes vormides ning nende kohta on ülevaated näiteks üllitistes Johnson, Kevin S., Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3:564-571 (1993). Faagiga esitlemiseks võib kasutada V-geeni segmentide mitmeid allikaid. Üllitise Clarkson *et al.*, Nature, 352:624-628 (1991) kohaselt eraldati rida erinevaid oksasooloni-vastaseid antikehasid V-geenide väikesest juhuslikult kombineeritud kogust, mis pärines immuniseeritud hiirte põrnadest. V-geenide repertuaari võib konstrueerida immuniseerimata inimdoonoritest ning eraldada rea erinevate antigeenide (sealhulgas autoantigeenide) vastaseid antikehasid, näiteks järgides peamiselt meetodeid, mida on kirjeldatud üllitises Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991) või Griffith *et al.*, EMBO J., 12:725-734 (1993); vaadake ka US patente nr 5565332 ja 5573905.

(0296) Nagu arutletakse eespool, võib inimese antikehasid tekitada ka *in vitro* aktiveeritud B-rakkudega (vaadake US patente nr 5567610 ja 5229275).

4. Antikeha fragmendid

(0297) Kindlatel asjaoludel on eeliseid pigem antikeha fragmentide kui terviklike antikehade kasutamisel. Fragmentide väiksem suurus võimaldab kiiremat organismist eemaldamist ja võib kaasa tuua parema ligipääsu tahketele kasvajatele.

(0298) Antikeha fragmentide tootmiseks on arendatud mitmesuguseid meetodeid. Traditsiooniliselt derivaaditakse need fragmendid terviklike antikehade proteolüütilise lõikamisega

(vaadake näiteks üllitisi Morimoto *et al.*, Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 24:107-117 (1992) ja Brennan *et al.*, Science, 229:81 (1985)). Siiski võib tänapäeval neid fragmente otseselt toota rekombinantsete peremeesrakkudega. Antikeha Fab-, Fv- ja scFv-fragmente võib ekspresseerida ja sekreteerida *E. coli* rakkudest, võimaldades seega nende fragmentide suurte koguste hõlpsat tootmist. Antikeha fragmente võib eraldada faagi antikehahakogudest, mille üle arutletakse eespool. Alternatiivselt võib Fab'-SH fragmente koguda otseselt *E. coli*'st ning keemiliselt kokku siduda, et moodustada F(ab')₂-fragmente (Carter *et al.*, Bio/Technology, 10:163-167 (1992)). Vastavalt veel ühele lähenemisele võib F(ab')₂-fragmente eraldada otseselt rekombinantse peremeesraku kultuurist. Fab- ja F(ab')₂-fragmenti, millel on suurenenud poolväärtusaeg *in vivo* ja mis sisaldavad päästeretseptoriga (*salvage receptor*) seonduvat epitoopi, on kirjeldatud US patendis nr 5869046. Muud meetodid antikeha fragmentide tootmiseks on erialal praktiseerijale ilmsed. Teistes teostustes on valitud antikeha üheaheelaline Fv-fragment (scFv); vaadake üllitist WO 93/16185, US patente nr 5571894 ja 5587458. Fv ja sFv on ainukesed terviklike ühinevate kohtadega liigid, millel ei ole konstantseid piirkondi ning seega võivad need olla sobivad mittespetsiifilise sidumise vähendamiseks, kui kasutatakse *in vivo*. Võib konstrueerida sFv-ga liitvalke, et saada efektorvalgu ühendumist kas scFv amino- või karboksüterminusega; vaadake teost Antibody Engineering, toimetanud Borrebaeck, *supra*. Antikeha fragment võib olla ka „lineaarne antikeha“, nagu on kirjeldatud näiteks US patendis nr 5641870. Sellised lineaarsed antikeha fragmentid võivad olla monospetsiifilised või bispetsiifilised.

5. Bispetsiifilised antikehad

(0299) Bispetsiifilised antikehad on antikehad, millel on seondumisspetsiifilisus vähemalt kahe erineva epitoobiga. Iseloomulikud bispetsiifilised antikehad võivad seonduda siin kirjeldatud valgu IL-17A/F kahe erineva epitoobiga. Teistes sellistes antikehades võib IL-17A/F-i sidumiskoht olla kombineeritud valgu mõne muu sidumiskohaga. Alternatiivselt võib IL-17A/F-vastane õlg olla kombineeritud õlaga, mis seondub leukotsüüdil oleva vallandava molekuliga, nagu T-raku retseptori molekul (näiteks CD2 või CD3) või Fc-retseptorid IgG jaoks (FcγR), nagu on FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) ja FcγRIII (CD16), keskendudes ja paiknedes selliselt IL-17A/F-i ekspresseeriva raku rakulistele kaitsemehhanismidele. Bispetsiifilisi antikehasid võib kasutada, et paigutada tsütotoksilisi agenseid rakkudesse, mis eks-

presseerivad IL-17A/F-i. Neil antikehadel on IL-17A/F-ga seonduv õlg ja õlg, mis seondub tsütotoksilise agensiga (näiteks saporini, interferoon α vastase agensi, *Vinca* alkaloidi, ritsiini A-ahela, metotreksaadi või radioisotoop-hapteeniga). Bispetsiifilisi antikehasid võib valmistada täispikkade antikehade või antikeha fragmentidena (näiteks bispetsiifiliste antikehade F(ab')₂-fragmentidena).

(0300) Üllitises WO96/16673 on kirjeldatud bispetsiifilist ErbB2/anti-Fc γ RIII-vastast antikeha ning US patendis nr 5837234 on avaldatud bispetsiifiline ErbB2/Fc γ RI-vastane antikeha. Üllitises WO98/02463 on näidatud bispetsiifiline ErbB2/Fc α -vastane antikeha. US patendis nr 5821337 on õpetus bispetsiifilise ErbB2/CD3-vastase antikeha kohta.

(0301) Bispetsiifiliste antikehade tegemise meetodid on tehnika tasemes tuntud. Täispikkade bispetsiifiliste antikehade traditsiooniline tootmine põhineb immunoglobuliini kahe raske ahela - kerge ahela paari, milles kahel ahelal on erinevad spetsiifilisused, koos ekspresseerimisel (Millstein *et al.*, Nature, 305:537-539 (1983)). Tänu immunoglobuliini raskete ja kergete ahelate juhuslikule valikule toodavad need hübriidomid (kvadroomid) 10 erineva võimaliku antikehamolekuli segu, millest ainult ühel on õige bispetsiifiline struktuur. Õige molekuli puhastamine, mida tavaliselt tehakse afiinsuskromatograafia etappides, on pigem kohmakas ning saaduse saagis on madal. Sarnased toimingud on avaldatud üllitistes WO93/08829 ja Traunecker *et al.*, EMBO J., 10:3655-3659 (1991).

(0302) Vastavalt teistsugusele lähenemisele liidetakse antikeha varieeruvad domeenid, millel on soovitud seondumise spetsiifilisus (antikeha antigeeniseoselised kohad), immunoglobuliini konstantse domeeni järjestustega. Eelistatavalt liidetakse immunoglobuliini raske ahela konstantse domeeniga, mis sisaldab vähemalt osaliselt liigend-, C_H2- ja C_H3-piirkondi. Eelistatav on, et vähemalt ühes liites esineks esimene raske ahela konstantne piirkond (C_H1), mis sisaldab kerge ahela sidumiseks vajalikku kohta. Immunoglobuliini raske ahela liiteid ja, soovi korral, ka immunoglobuliini kerget ahelat kodeerivad DNA-d võib sisestada eraldi ekspresioonivektoritesse, mida võib koos transfekteerida sobivasse peremeesrakku. See tagab suurema paindlikuse kolme polüpeptiidifragmendi vastastikuste osakaalude kohandamisel teostustes, mille puhul konstruktsioonis kasutatud kolme polüpeptiidiahela ebavõrdsed suhted tagavad soovitud bispetsiifilise antikeha optimaalse saagise. Siiski, kui vähemalt kahe polüpeptiidiahela võrdses suhtes ekspressioon annab kõrgeid saagised või juhul, kui suhetel ei ole olulist mõju ahelate soovitud kombinatsiooni saagisele, on võimalik sisestada kahe või kõigi kolme polüpeptiidiahela kodeerivad järjestused ühte ekspresioonivektorisse.

(0303) Selle lähenemise kohases eelistatavas teostuses koosnevad bispetsiifilised antikehad esimese seondumise spetsiifilisusega hübriidse immunoglobuliini raskest ahelast ühes õlas ning hübriidse immunoglobuliini raske ahela – kerge ahela paarist (mis pakub teist seondumise spetsiifilisust) teises õlas. On leitud, et selline asümmeetriline struktuur soodustab soovitud bispetsiifilise ühendi eraldamist immunoglobuliiniahelate ebasoovitavatest kombinatsioonidest, kuna immunoglobuliini kerge ahela esinemine ainult ühes bispetsiifilise molekuli pooles pakub eraldamiseks hõlpsa viisi. See lähenemine on avaldatud üllitises WO94/04690. Bispetsiifiliste antikehade tekitamise enamate üksikasjade kohta vaadake näiteks üllitist Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

(0304) Vastavalt veel ühele, US patendis nr 5731168 kirjeldatud lähenemisele, võib antikehamolekulide paari vahelise liidese kujundada selliselt, et saavutada rekombinantse raku kultuurist kogutavate heterodimeeride maksimaalne protsent. Eelistatav liides hõlmab vähemalt osa domeenist C_H3. Selles meetodi kohaselt asendatakse esimese antikehamolekuli liideses ühe või enama aminohappe väikesed külghelad suuremate (näiteks türosiini või trüptofaani) külghelatega. Teise antikehamolekuli liideses tekitatakse kompenseerivad, samasuguse või sarnase suurusega „õõnsused“, asendades aminohapete suured külghelad väiksematega (näiteksalaniini või treoniini omaga). See pakub mehhanismi heterodimeeri saagise suurendamiseks ebasoovitavate lõppsaaduste nagu homodimeerid suhtes.

(0305) Bispetsiifilised antikehad hõlmavad ristseotud või „heterokonjugaat“-antikehasid. Näiteks võib üks heterokonjugaadis olev antikeha olla seotud avidiini ja teine biotiiniga. Sellised antikehad on näiteks kavandatud suunamiseks soovimatutele rakkudele immuunsüsteemi rakkude hulgas (US patent nr 4676980) ning HIV-nakkuse ravimiseks (WO91/00360, WO92/00373 ja EP 03089). Heterokonjugaat-antikehasid võib teha, kasutades mistahes sobivat ristsidumise meetodit. Sobivad ristsiduvad agensid on tehnika tasemes hästi tuntud ning avaldatud, samuti paljud ristsidumise meetodid, näiteks US patendis nr 4676980.

(0306) Kirjanduses on samuti kirjeldatud antikeha fragmentidest bispetsiifiliste antikehade tekitamise meetodeid. Näiteks võib bispetsiifilisi antikehasid valmistada, kasutades keemilist sidumist. Üllitises Brennan *et al.*, *Science*, 229:81 (1985) on kirjeldatud toimingut, mille kohaselt terviklikke antikehasid lõigatakse proteolüütiliselt, et saada F(ab')₂-fragmente. Neid fragmente redutseeritakse ditiooli komplekseeriva agensi naatriumarseniidi juuresolekul, et stabiliseerida vitsinaalseid ditioole ning hoida ära molekulidevaheliste disulfiidide moodustumist. Seejärel muundatakse tekitatud Fab'-fragmendid tionitrobensoaadi (TNB) derivaati-

deks. Üks Fab'-TNB-derivaatidest muundatakse merkaptotüülamiiniga redutseerides taas Fab'-tiooliks ning see segatakse võrdmolaarses koguses teise Fab'-TNB-derivaadiga, et moodustuks bispetsiifiline antikeha. Toodetud bispetsiifilisi antikehasid võib kasutada ensüümide selektiivse immobiliseerimise agensitena.

(0307) Hiljutised arengud on hõlbustanud Fab'-SH fragmentide, mida võib keemiliselt siduda bispetsiifiliste antikehade moodustamiseks, otsest kogumist *E. coli*'st. Üllitises Shalaby *et al.*, *J. Exp. Med.*, 175:217-225 (1992) on kirjeldatud täielikult humaniseeritud bispetsiifilise antikeha $F(ab')_2$ -molekuli tootmist. Iga Fab'-fragment sekreteeriti eraldi *E. coli*'st ning allutati suunatud keemilisele sidumisele *in vitro*, et moodustuks bispetsiifiline antikeha. Selliselt moodustunud bispetsiifiline antikeha oli võimeline siduma retseptorit ErbB2 üleekspresserivate rakkude ja inimese normaalsete T-rakkudega ning lisaks vallandama inimese tsütotoksiliste lümfotsüütide lüütilise aktiivsuse inimese rinnakasvajas olevate sihtmärkide vastu. Samuti on kirjeldatud mitmesuguseid meetodeid bispetsiifilise antikeha fragmentide otseseks valmistamiseks ja eraldamiseks rekombinantse raku kultuurist. Näiteks on bispetsiifilisi antikehasid toodetud, kasutades leutsiiniharke; Kostelny *et al.*, *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992). Valkudest Fos ja Jun pärinevad leutsiinharkpeptiidid seoti kahe erineva antikeha Fab'-osadega, kasutades geenide liitmist. Monomeeride moodustamiseks antikeha homodimeerid redutseeriti liigendpiirkonnas ning seejärel need oksüdeeriti taas, et moodustuksid antikeha heterodimeerid. Seda meetodit võib rakendada ka antikeha homodimeeride tootmiseks. Üllitises Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993) kirjeldatud „diakeha“ tehnoloogia pakub alternatiivset mehhanismi bispetsiifilise antikeha fragmentide tegemiseks. Fragmentid hõlmavad domeeni V_H , mis on V_L -ga ühendatud linkeriga, mis on liiga lühike, et võimaldada kahe samas ahelas oleva domeeni paardumist. Vastavalt on ühe fragmendi domeenid V_H ja V_L sunnitud paarduma teise fragmendi komplementaarsete domeenidega V_L ja V_H , moodustades sellega kaks antigeeniseoselist kohta. Teatatud on veel ühest bispetsiifilise antikeha fragmentide tegemise strateegiast, kasutades üheaahelise Fv (sFv) dimeere; vaadake üllitist Gruber *et al.*, *J. Immunol.*, 152:5368 (1994).

(0308) Peetakse võimalikuks ka enam kui kahe valentsiga antikehasid. Näiteks võib valmistada trispetsiifilisi antikehasid (Tutt *et al.*, *J. Immunol.*, 147:60 (1991)).

6. Heterokonjugaat-antikehad

(0309) Avaldatud on heterokonjugaat-antikehad. Heterokonjugaat-antikehad on koostatud kahest kovalentselt seotud antikehast. Selliseid antikehasid on näiteks kujundatud suunamiseks soovimatutele rakkudele immuunsüsteemis (US patent nr 4676980) ning HIV-nakkuse raviks (WO91/00360, WO92/200373, EP 03089). Peetakse võimalikuks antikehade valmistamist *in vitro*, kasutades sünteetiliselt valgukeemias tuntud meetodeid, sealhulgas ristsiduvaid agenseid hõlmavaid. Näiteks võib konstrueerida immunotoksiine, kasutades disulfidi vahetusreaktsiooni, või moodustades tioetersideme. Selleks eesmärgiks sobivate reagentide näited hõlmavad iminiolaati ja metüül-4-merkaptobutüürimidaati ning näiteks US patendis nr 4676980 avaldatuid.

7. Multivalentset antikehad

(0310) Multivalentset antikeha võib rakk, mis ekspresseerib antikehaga seonduvat antigeeni, internaliseerida (ja/või kataboliseerida) kiiremini kui bivalentset antikeha. Käesoleva leiutise kohased antikehad võivad olla kolme või enama antikeha siduva kohaga (näiteks tetravalentsed) multivalentset antikehad (mis ei kuulu IgM klassi), mida võib hõlpsalt toota antikeha polüpeptiidahelaid kodeeriva nukleiinhappe rekombinantse ekspresseerimisega. Multivalentne antikeha võib sisaldada dimeerumisdomeeni ning kolme või enam antigeeniseoselist kohta. Eelistatav dimeerumisdomeen sisaldab (või koosneb nendest) Fc-piirkonda või liigendpiirkonda. Selle stsenaariumi järgi sisaldab antikeha Fc-piirkonda ning kolme või enam Fc-piirkonnast aminoterminuse pool paiknevat antigeeniseoselist kohta. Siin eelistatav multivalentne antikeha sisaldab (või koosneb nendest) kolme kuni kaheksat, kuid eelistatavalt nelja antigeeniseoselist kohta. Multivalentne antikeha sisaldab vähemalt ühte polüpeptiidahelat (eelistatavalt kahte polüpeptiidahelat), milles polüpeptiidahel(ad) sisaldab (sisaldavad) kahte või enam varieeruvat domeeni. Näiteks võib polüpeptiidahel(ad) hõlmata $VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc$, kus VD1 on esimene varieeruv domeen, VD2 on teine varieeruv domeen, Fc on Fc-piirkonna üks polüpeptiidahel, X1 ja X2 tähistavad aminohapet või polüpeptiidi ning n on 0 või 1. Näiteks võib(vad) polüpeptiidahel(ad) hõlmata järgnevat: V_H-C_{H1} / painduv linker / $V_H-C_{H1}-Fc$ -piirkond või V_H-C_{H1} / V_H-C_{H1} / Fc-piirkond. Eelistatavalt sisaldab multivalentne antikeha siin lisaks vähemalt kahte (eelistatavalt nelja) kerge

ahela varieeruva domeeni polüpeptiidi. Siin võib multivalentne antikeha sisaldada näiteks umbes kahte kuni umbes kaheksat kerge ahela varieeruva domeeni polüpeptiidi. Siin võimalikuks peetava kerge ahela varieeruva domeeni polüpeptiidid sisaldavad kerge ahela varieeruvat domeeni ja lisaks vajadusel C_L-domeeni.

8. Efektorfunktsiooni kujundamine

(0311) Soovitud võib olla leiutisekohase antikeha efektorfunktsiooniga seonduva muutmine, näiteks antikeha antikehasõltuva rakulise tsütotoksilisuse (ADCC) ja/või komplemendisõltuva tsütotoksilisuse (CDC) võimendamiseks. Selle võib saavutada, sisestades antikeha Fc-piirkonda ühe või mitu aminohappeasendust. Alternatiivselt või lisaks võib Fc-piirkonda viia tsüsteiinijäägi(d), võimaldades selliselt ahelatevahelise disulfiidsideme moodustumist selles piirkonnas. Selliselt tekitatud homodimeer-antikehal võib olla parenenud internaliseerumisvõime ja/või suurenenud komplemendivahendatud raku tapmise võime ning antikehasõltuv rakuline tsütotoksilisus (ADCC); vaadake üllitisi Caron *et al.*, *J. Exp Med.*, 176:1191-1195 (1992) ja Shopes, *J. Immunol.*, 148:2918-2922 (1992). Võimendatud kasvavastase aktiivsusega homodimeer-antikehasid võib valmistada ka heterobifunktsionaalseid ristsidujaid kasutades, nagu on kirjeldatud üllitises Wolff *et al.*, *Cancer Research*, 53:2560-2565 (1993). Alternatiivselt võib kujundada antikeha, millel on kaks Fc-piirkonda ning seetõttu võib sellel olla võimendunud komplemendisõltuva lüüsimise ja ADCC-võimekus, vaadake üllitist Stevenson *et al.*, *Anti-Cancer Drug Design*, 3:219-230 (1989). Antikeha poolväärtusaja suurendamiseks seerumis võib antikeha (eriti antikeha fragmendi) koosseisu liita „päästeretseptoriga seonduva epitoobi“, nagu näiteks on kirjeldatud US patendis nr 5739277. Siin kasutatuna tähistab mõiste „päästeretseptoriga seonduv epitoop“ IgG-molekuli (näiteks IgG₁, IgG₂, IgG₃, või IgG₄) Fc-piirkonna epitoopi, mis vastutab IgG-molekuli poolväärtusaja suurenemise eest seerumis.

9. Immunokonjugaadid

(0312) Avaldatud on ka immunokonjugaadid, mis hõlmavad antikeha, mis on konjugeeritud tsütotoksilise agensiga, nagu keemiaraviagens, kasvu inhibeeriv agens, toksiin (näiteks bak-

teriaalsest, taimsest, seen-, või loomsest allikast pärinev ensümaatiliseltselt aktiivne toksiin või selle fragmendid) või radioaktiivne isotoop (st radiokonjugaat).

(0313) Selliste immunokonjugaatide tekitamiseks kasutatavaid keemiaraviagenseid on kirjeldatud eespool. Ensümaatiliseltselt aktiivsed toksiinid ja nende fragmendid, mida võib kasutada, hõlmavad difteeria A-ahelat, difteeriatoksiini mittesiduvaid aktiivseid fragmente, eksotoksiini A-ahelat (*Pseudomonas aeruginosa*'st), ritsiini A-ahelat, abriini A-ahelat, modeksiini A-ahelat, alfa-sartsiini, *Aleurites fordii* valke, diantiinivalke, *Phytolaca americana* valke (PAPI, PAPII ja PAP-S), *Momordica charantia* inhibiitorit, kurtsiini kroitiini, *Sapaonaria officinalis*'e inhibiitorit, geloniini, mitogelliini, restritotsiini, fenomütsiini, enomütsiini ning trikotetseene. Radiokonjugeeritud antikehade tootmiseks on kättesaadavad mitmesugused radionukliidid. Näited hõlmavad ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y ja ^{186}Re . Antikeha ja tsütotoksilise agensi konjugaate tehakse, kasutades mitmesuguseid bifunktsionaalseid valke siduvaid agenseid, nagu N-suktsiinimidüül-3-(2-püridüülditiool)propionaat (SPDP), iminotiolaan (IT), imidoestrite bifunktsionaalsed derivaadid (nagu dimetüüladiipimidaat-HCl), aktiivsed estrid (nagu disuktsiinimidüülsuberaat), aldehyüdid (nagu glutaaraldehyüdid), bisasido-ühendid (nagu bis(p-asidobensüül)heksaandiamiin), bisdiasooniumderivaadid (nagu bis(p-diasooniumbensüül)etüleendiamiin), diisotsüanaadid (nagu toluuen-2,6-diisotsüanaat), ja bis-aktiivsed fluoriühendid (nagu 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenseen). Ritsiini immunotoksiini võib näiteks valmistada nii, nagu on kirjeldatud üllitises Vitetta *et al.*, Science, 238:1098 (1987). ^{14}C -märgistatud 1-isotiotsüanatobensüül-3-metüüldietüleentriaminopentaäädikhape (MX-DTPA) on iseloomulik kelaativ agens antikeha konjugeerimiseks radionukleotiidiga; vaadake WO94/11026.

(0314) Samuti peetakse siin võimalikuks antikeha konjugaate ühe või enama väikese molekuliga toksiiniga, nagu on kalihheamütsiin, maitansinoidid, trikotetseen ja CC1065, ning nende toksiinide derivaadid, millel on toksiooni aktiivsus.

Maitansiin ja maitansinoidid

(0315) Alternatiivseltselt konjugeeritakse leiutisekohane IL-17A/F-vastane antikeha (täispikk või selle fragmendid) ühe või enama maitansinoidmolekuliga.

(0316) Maitansinoidid on mitoosi inhibiitorid, mis toimivad, inhibeerides tubuliini polümeriseerumist. Maitansiin eraldati esmalt Ida-Aafrika porsist *Maytenus serrata* (US patent nr

3896111). Järgnevalt avastati, et kindlad mikroobid toodavad samuti maitansinoide, nagu maitansinool ja C-3-maitansinoolestrid (US patent nr 4151042) Sünteetiline maitansinool ning selle derivaadid ja analoogid on avaldatud näiteks US patentides nr 4137230, 4248870, 4256746, 4260608, 4265814, 4294757, 4307016, 4308268, 4308269, 4309428, 4313946, 4315929, 4317821, 4322348, 4331598, 4361650, 4364866, 4424219, 4450254, 4362663 ja 4371533.

Maitansinoidi ja antikeha konjugaadid

(0317) Nende raviindeksi parandamise eesmärgil on maitansiini ja maitansinoide konjugeeritud antikehadega, mis spetsiifiliselt seonduvad kasvajaraku antigeenidega. Maitansinoide sisaldavad immunokonjugaadid, nende tegemise meetodid ja nende ravirakendus on avaldatud näiteks US patentides nr 5208020, 5416064, 6441163 ja Euroopa patendis EP 0 425 235 B1. Üllitises Liu *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996) on kirjeldatud immunokonjugaate, mis sisaldavad maitansinoidi DM I, mis on seotud inimese pärasoolevähi rakkude vastu suunatud monokloonse antikehaga C242. Leiti, et see konjugaat on väga tsütotoksiline käärsoolevähi kultiveeritud rakkudele ning selle puhul ilmnes kasvajakasvatane aktiivsus kasvaja kasvu analüüsis *in vivo*. Üllitises Chari *et al.*, Cancer Research 52:127-131 (1992) kirjeldatakse immunokonjugaate, milles maitansinoid oli disulfidlinkeri kaudu konjugeeritud hiire antikehaga A7, mis seondub antigeeniga inimese käärsoolekasvaja rakuliinidel, või hiire veel ühe monokloonse antikehaga TA.1, mis seondub onkogeeniga HER-2/neu. *In vitro* testiti TA.1 ja maitansinoidi konjugaadi tsütotoksilisust inimese rinnavähi rakuliinil SK-BR-3, mis ekspresseerib 3×10^5 pinnaantigeeni HER-2 molekuli raku kohta. Ravimkonjugaat saavutas sama tsütotoksilisuse määra, mis on vabal maitansinoidravimil ning seda võis võimendada, suurendades maitansinoidmolekulide arvu antikehamolekuli kohta. A7 ja maitansinoidi konjugaadi puhul ilmnes vähene süsteemne tsütotoksilisus hiirtes.

IL-17A/F-polüpeptiidi vastase antikeha ja maitansinoidi konjugaadid (immunokonjugaadid)

(0318) Keemiliselt valmistatakse IL-17A/F-vastase antikeha ja maitansinoidi konjugaate, sidudes IL-17A/F-vastase antikeha maitansinoidmolekuliga, ilma et märkimisväärselt väheneks antikeha või maitansinoidmolekuli bioloogiline aktiivsus. On näidatud, et antikehamo-

lekuli kohta konjugeeritud keskmiselt 3-4 maitansinoidmolekulil on sihtmärkrakkude suhtes tsütotoksilisust võimendav mõju, ilma et see mõjuks negatiivselt antikeha funktsioonile või lahustuvusele, kuigi isegi ühe toksiini/antikeha molekuli puhul oleks eeldatav tsütotoksilisuse võimendumine võrreldes konjugeerimata antikeha kasutamisega. Maitansinoidid on tehnika tasemes hästi tuntud ja neid võib sünteesida tuntud meetoditega või eraldada looduslikest allikatest. Sobivaid maitansinoide on avaldatud näiteks US patendis nr 5208020 ja teistes patentides ning patendist erinevates üllitistes, millele on viidatud siin eespool. Eelistatavad maitansinoidid on maitansinool ja maitansinooli analoogid, nagu mitmesugused maitansinooli estrid, millel on muudatused aromaatses tsüklis või maitansinoidmolekuli muudes asendites.

(0319) Antikeha ja maitansinoidi konjugaatide tegemiseks on tehnika tasemes tuntud palju siduvaid rühmi, mis hõlmavad näiteks US patendis nr 5208020 või EP patendis 0 425 235 B1 ning üllitises Chari *et al.*, Cancer Research 52:127-131 (1992) avaldatuid. Siduvad rühmad hõlmavad disulfiidrühmi, tioeterrühmi, happetundlikke rühmi, valgustundlikke rühmi, peptidaasitundlikke rühmi või esteraasitundlikke rühmi, nagu on avaldatud eespool nimetatud patentides, eelistatavad on disulfiid- ja tioeterrühmad.

(0320) Antikeha ja maitansinoidi konjugaate võib teha, kasutades mitmesuguseid bifunktsionaalseid valke siduvaid agenseid, nagu N-suktsiinimidüül-3-(2-püridüülditiool)propionaat (SPDP), suktsiinimidüül-4-(N-maleimidometüül)tsükloheksaan-1-karboksülaad, iminotiolaan (IT), imidoestrite bifunktsionaalsed derivaadid (nagu dimetüüladipimidaat-HCl), aktiivsed estrid (nagu disuktsiinimidüülsuberaat), aldehüüdid (nagu glutaaraldehüüd), bisasidoühendid (nagu bis(p-asidobensüül)heksaandiamiin), bisdiasooniumderivaadid (nagu bis(p-diasooniumbensoüül)etüleendiamiin), diisotsüanaadid (nagu toluen-2,6-diisotsüanaad) ja aktiivsed bisfluoriühendid (nagu 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenseen). Eriti eelistatavad disulfiidsidet pakuvad siduvad agensid on N-suktsiinimidüül-3-(2-püridüülditiool)propionaat (SPDP) (Carlsson *et al.*, Biochem. J. 173:723-737 (1978)) ja N-suktsiinimidüül-4-(2-püridüültio)pentanoat (SPP).

(0321) Sõltuvalt ühenduse tüübist võib linkeri maitansinoidmolekuliga siduda mitmesugustes asendites. Näiteks estersideme võib moodustada reageerimisel hüdroksüülrühmaga, kasutades tavapäraseid sidumise meetodeid. Reaktsioon võib toimuda asendis C-3, kus on hüdroksüülrühm, asendis C-14, mis on modifitseeritud hüdroksümetüülrühmaga, asendis C-15, mis on modifitseeritud hüdroksüülrühmaga ning asendis C-20, kus on hüdroksüülrühm.

Eelistatavas teostuses moodustatakse ühendus maitansinooli või maitansinooli analoogi asendis C-3.

Kalihheamütsiin

(0322) Veel üks huvipakkuv immunokonjugaat hõlmab IL-17A/F-vastast antikeha, mis on konjugeeritud ühe või enama kalihheamütsiinimolekuliga. Antibiootikumide kalihheamütsiiniperekond on väiksematel kui pikomolaarsetel kontsentratsioonidel võimeline tekitama kaheahelalise DNA katkestusi. Kalihheamütsiiniperekonna konjugaatide valmistamiseks vaa-dake US patente nr 5712374, 5714586, 5739116, 5767285, 5770701, 5770710, 5773001, 5877296 (kõik kuuluvad firmale American Cyanamid Company) Kasutatavad kalihheamüt-siini struktuursed analoogid hõlmavad, nendega piirdumata, järgnevaid: γ_1^I , α_2^I , α_3^I , N-at-setüül- γ_1^I , PSAG ja θ_1^I (Hinman *et al.*, Cancer Research, 53:3336-3342 (1993), Lode *et al.*, Cancer Research, 58:2925-2928 (1998) ja firmale American Cyanamid kuuluvad eespool nimetatud US patendid). Veel üks kasvjavastane ravim, millega antikeha võib konjugeerida, on QFA, mis on folaadivastane agens. Nii kalihheamütsiin kui QFA toimivad rakusiseselt ning ei läbi hõlpsalt plasmamembraani. Seega nende agensite rakusisene kasutamine anti-kehavahendatud internaliseerimise kaudu võimendab tugevalt nende tsütotoksilisi toimeid.

Muud tsütotoksilised agensid

(0323) Muud kasvjavastased agensid, mida võib konjugeerida leiutisekohaste IL-17A/F-vastaste antikehadega, hõlmavad BCNU-d, streptosototsiini, vinkristiini, 5-fluorouratsiili, US patentides nr 5053394, 5770710 kirjeldatud ja ühiselt kompleksina LL-E33288 tuntud agen-site perekonda ning lisaks esperamütsiine (US patent 5877296).

(0324) Ensümaatilisel aktiivsed toksiinid ja nende fragmendid, mida võib kasutada, hõl-mavad difteeriatoksiini A-ahelat, difteeriatoksiini mitteseonduvaid aktiivseid fragmente, ek-sotoksiini A-ahelat (*Pseudomonas aeruginosa*'st), ritsiini A-ahelat, abriini A-ahelat, modekt-siini A-ahelat, α -sartsiini, *Aleurites fordii* valke, diantiin-valke, *Phytolaca americana* valke (PAPI, PAPII ja PAP-S), *Momordica charantia*'st pärinevat inhibiitorit, krutsiini, krotiini, *Sapaonaria officinalis*'est pärinevat inhibiitorit, geloniini, mitogelliini, restriktotsiini, feno-

mütsiini, enomütsiini ja trikotetseene; vaadake näiteks üllitist WO93/21232, mis on avaldatud 28. oktoobril 1993.

(0325) Samuti on avaldatud immunokonjugaat, mis moodustatakse antikeha ja nukleolüütilise aktiivsusega ühendi (näiteks ribonukleaasi või DNA endonukleaasi, nagu desoksüribonukleaas, DNAas) vahel.

(0326) Kasvaja selektiivseks hävitamiseks võib antikeha sisaldada väga radioaktiivset aatomit. IL-17A/F-vastaste radiokonjugeeritud antikehade tootmiseks on kättesaadavad mitmesugused radioaktiivsed isotoobid. Näited hõlmavad At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} ja Lu radioaktiivseid isotoope. Kui konjugaati kasutatakse diagnoosimiseks, võib see sisaldada radioaktiivset aatomit stsintigraafilisteks uuringuteks, näiteks ^{99m}Tc või ^{123}I või tuuma magnetresonantsi (TMR) kuvamiseks (tuntud ka kui magnetresonantskuvaamine MRK) spin-märgist, nagu ^{123}I , ^{131}I , ^{111}In , ^{19}F , ^{13}C , ^{15}N , ^{17}O , gadoliinium, mangaan või raud.

(0327) Radio- ja muid märgiseid võib konjugaatidesse sisestada tuntud viisidel. Näiteks võib sobivaid aminohapete prekursoreid kasutades biosünteesida või aminohapete keemilise sünteesiga sünteesida peptiidi, milles vesiniku asemel on näiteks ^{19}F . Märgiseid, nagu ^{99m}Tc või ^{123}I , ^{186}Re , ^{188}Re ja ^{111}In , võib siduda peptiidis oleva tsüsteiinijäägi kaudu. ^{90}Y võib siduda lüsiinijäägi kaudu. ^{123}I koosseisu liitmiseks võib kasutada IODOGEN meetodit (Fraker *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 80:49-57 (1978)). Teoses Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy (Chatal, CRC Press, 1989) on üksikasjalikult kirjeldatud muid meetodeid.

(0328) Antikeha ja tsütotoksilise agensi konjugaate tehakse, kasutades valke siduvaid erinevaid bifunktsionaalseid agenseid, nagu N-suktsiinimidüül-3-(2-püridüülditiool)propionaat (SPDP), suktsiinimidüül-4-(N-maleimidometüül)tsükloheksaan-1-karboksülaat (SMCC), iminotiolaan (IT), imidoestrite bifunktsionaalsed derivaadid (nagu dimetüüladipimidaat-HCl), aktiivsed estrid (nagu disuktsiinimidüülsuberaat), aldehüüdid (nagu glutaaraldehüüd), bisasidoühendid (nagu bis(p-asidobensüül)heksaandiamiin), bisdiasooniumderivaadid (nagu bis(p-diasooniumbensoüül)etüleendiamiin), diisotsüanaadid (nagu tolueen-2,6-diisotsüanaat) ja aktiivsed bisfluoriühendid (nagu 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenseen). Ritsiini immunotoksiini võib näiteks valmistada selliselt, nagu on kirjeldatud üllitises Vitetta *et al.*, Science, 238:1098 (1987). ^{14}C -märgistatud 1-isotiotsüanatobensüül-3-metüüldietüleentriaminopentaäädikhape (MX-DTPA) on iseloomulik kelaativ agens antikeha konjugeerimiseks radionukleotiidiga;

vaadake üllitist WO94/11026. Linker võib olla „lõigatav linker“, mis soodustab tsütotoksilise ravimi vabanemist rakus. Näiteks võib kasutada happetundlikku linkerit, peptidaasitundlikku linkerit, valgustundlikku linkerit, dimetüüllinkerit või disulfiidi sisaldavat linkerit (Chari *et al.*, Cancer Research, 52:127-131 (1992), US patent nr 5208020).

(0329) Alternatiivselt võib IL-17A/F-vastast antikeha ja tsütotoksilist agensit hõlmava liitvalgu valmistada näiteks rekombinantsete meetodite või peptiidsünteesiga. DNA-molekulis võivad vastavad piirkonnad, mis kodeerivad konjugaadi kahte osa, sisalduda teineteisega külgnevalt või olla eraldatud linkerpeptiidi, mis ei kahjusta konjugaadi soovitud omadusi, kodeeriva piirkonnaga.

(0330) Alternatiivselt võib antikeha olla konjugeeritud „retseptoriga“ (nagu streptavidiin), et kasutada seda kasvajale eelsuunamises ning mille kohaselt patsiendile manustatakse antikeha ja retseptori konjugaat, millele järgneb mitteseondunud konjugaadi eemaldamine ringlusest, kasutades puhastavat agensit, ning seejärel manustatakse „ligand“ (näiteks avidiin), mis on konjugeeritud tsütotoksilise agensiga (näiteks radionukleotiidiga).

10. Immunoliposoomid

(0331) Siin kirjeldatud IL-17A/F-vastaseid antikehasid võib valmistada immunoliposoomidena. "Liposoom" on erinevat tüüpi lipiididest, fosfolipiididest ja/või pindaktiivsest aineist koosnev väike vesiikul, mis on kasutatav ravimi kohaletoimetamiseks imetajasse. Harilikult on liposoomi koostisosad paigutatud kahekihilises vormis, mis on sarnane bioloogiliste membraanide lipiidide paigutusega. Antikehasid sisaldavaid liposoomide valmistatakse tehnika tasemes tuntud meetoditega, nagu on kirjeldatud üllitistes Epstein *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688 (1985); Hwang *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030 (1980); US patentides nr 4485045 ja 4544545 ning üllitises WO97/38731, mis on avaldatud 23. oktoobril 1997. Pikendatud ringlusajaga liposoomid on avaldatud US patendis nr 5013556.

(0332) Eriti kasulikke liposoomide võib valmistada pöördfaasilise aurutamise meetodiga koos fosfatidüülkoliini, kolesterooli ja PEG-derivaaditud fosfatidüületanolamiini (PEG-PE) sisaldava lipiidse kompositsiooniga. Soovitud läbimõõduga liposoomide saamiseks surutakse liposoomid läbi määratud poorisuurusega filtreid. Leiutisekohase antikeha Fab'-fragmente võib liposoomidega konjugeerida disulfiidi vahetusreaktsiooniga, nagu on kirjeldatud ülliti-

ses Martin *et al.*, J. Biol. Chem., 257:286-288 (1982). Valikuliselt sisaldub liposoomis keemiaraviagens; vaadake üllitist Gabizon *et al.*, J. National Cancer Inst., 81(19):1484 (1989).

N. IL-17A/F-ga seonduvad oligopeptiidid

(0333) IL-17A/F-ga seonduvad oligopeptiidid on oligopeptiidid, mis seonduvad, eelistatavalt spetsiifiliselt, siin kirjeldatud IL-17A/F-polüpeptiidiga. IL-17A/F-ga seonduvad oligopeptiidid võib keemiliselt sünteesida või valmistada ja puhastada rekombinantset tehnoloogiat kasutades. Harilikult on IL-17A/F-ga seonduvad oligopeptiidid vähemalt umbes 5 aminohappe pikkused, alternatiivselt vähemalt umbes 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 või 100 aminohappe pikkused või pikemad, kusjuures sellised oligopeptiidid on võimeliselt seonduma, eelistatavalt spetsiifiliselt, siin kirjeldatud IL-17A/F-polüpeptiidiga. IL-17A/F-ga seonduvaid oligopeptiidide võib hästi tuntud meetodeid kasutades identifitseerida liigse katsetamiseta. Sellega seoses olgu märgitud, et mingi sihtmärkoligopeptiidiga spetsiifilise seondumisvõimega oligopeptiidide suhtes oligopeptiidikogude skriinimise meetodid on tehnika tasemes hästi tuntud (vaadake näiteks US patente nr 5556762, 5750373, 4708871, 4833092, 5223409, 5403484, 5571689, 5663143; PCT publikatsioone WO84/03506 ja WO84/03564; Geysen *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:3998-4002 (1984); Geysen *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:178-182 (1985); Geysen *et al.*, Synthetic Peptides as Antigens, 130-149 (1986); Geysen *et al.*, J. Immunol. Meth., 102:259-274 (1987); Schoofs *et al.*, J. Immunol., 140:611-616 (1988), Cwirla, S. E. *et al.*, (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378; Lowman, H. B. *et al.*, (1991) Biochemistry, 30:10832; Clackson, T. *et al.*, (1991) Nature, 352:624; Marks, J. D. *et al.*, (1991), J. Mol. Biol., 222:581; Kang, A. S. *et al.*, (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8363 ja Smith, G. P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2:668).

(0334) Seoses sellega on bakteriofaagimeetod (faagimeetod) üks hästi tuntud meetod, mis võimaldab skriinida oligopeptiidide suuri kogusid, et identifitseerida selliste kogude liige (liikmed), mis on võimelised spetsiifiliselt seonduma sihtmärkpolüpeptiidiga. Faagimeetod on meetod, mille kohaselt variantseid polüpeptiide esitletakse bakteriofaagiosakese pinnal

liitvalkudena kattevalguga (Scott, J. K., Smith, G. P. (1990) *Science* 249:386). Faagimeetodi rakendamine tugineb asjaolule, et selektiivsete juhuslike valguvariantide (või juhuslikult kloonitud cDNA-de) suuri kogusid saab kiiresti ja tõhusalt sortida selliste järjestuste suhtes, mis seonduvad sihtmärkmolekuliga suure afiinsusega. Peptiidi- (Cwirla, S. E. *et al.*, (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:6378) või valgukogude (Lowman, H. B. *et al.*, (1991) *Biochemistry*, 30:10832; Clackson, T. *et al.*, (1991) *Nature*, 352:624; Marks, J. D. *et al.*, (1991), *J. Mol. Biol.*, 222:581; Kang, A. S. *et al.*, (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:8363) esitlemist faagil võib kasutada miljonite polüpeptiidide või oligopeptiidide skriinimiseks spetsiifiliste seondumisomadustega liikmete suhtes (Smith, G. P. (1991) *Current Opin. Biotechnol.*, 2:668). Juhuslike mutantide faagikogude sortimine vajab suure variantide arvu konstrueerimise ja paljundamise strateegiat, sihtmärkretseptorit kasutavat afiinsuspuhastamist ning vahendit seondumise rikastamise tulemuste hindamiseks; US patendid nr 5223409, 5403484, 5571689 ja 5663143.

(0335) Kuigi enamuse faagimeetodite puhul on kasutatud filamentseid faage, on samuti tuntud λ -faagimeetodi süsteemid (WO95/34683; US 5627024), T4-faagimeetodi süsteemid (Ren, Z-J. *et al.*, (1998) *Gene*, 215:439; Zhu, Z. (1997) *CAN*, 33:534; Jiang, J. *et al.*, (1997) *can*, 128:44380; Ren, Z-J. *et al.*, (1997) *CAN*, 127:215644; Ren, Z-J. (1996) *Protein Sci.*, 5:1833; Efimov, V. P. *et al.*, (1995) *Virus Genes*, 10:173) ja T7-faagimeetodi süsteemid (Smith, G. P., Scott, J. K. (1993) *Methods in Enzymology*, 217:228-257; US 5766905).

(0336) Praeguseks on põhilise faagimeetodi kontseptsiooni lisatud palju muid täiustusi ja variatsioone. Need täiustused parendavad meetodi ja süsteemide võimet skriinida peptiidikogusid valitud sihtmärkmolekulidega seondumise suhtes ning võimet esitleda funktsionaalseid valke koos võimekusega skriinida neid valke soovitud omaduste suhtes. Faagimeetodi tarbeks on töötatud välja kombinatoorse reaktsiooni seadmed (WO98/14277) ning faagimeetodi kogusid on kasutatud bimolekulaarsete vastasmõjude (WO98/20169; WO98/20159) ja pinges heelikspeptiidide analüüsimiseks ja kontrollimiseks (WO98/20036). Üllitises WO97/35196 on kirjeldatud afiinsusligandi eraldamise meetodit, mille kohaselt seonduvate ligandide selektiivseks eraldamiseks viiakse faagikogu ühendusse ühe lahusega, milles ligand seondub sihtmärkmolekuli ning teise lahusega, milles afiinsusligand ei seonu sihtmärkmolekuliga. Üllitises WO97/46251 on kirjeldatud juhuslike faagide kogu, mis koos afiinsuspuhastatud antikehaga kujutab biosortimise meetodit, mille järel eraldatakse seonduv faag ning sellele järgneb mikrosortimine, kus suure afiinsusega seonduva faagi eraldamiseks kasutatakse mik-

roplaadi süvendeid. Samuti on teatatud *Staphylococcus aureus*'e A-valgu kasutamisest afiinsusmärgisena (Li *et al.*, (1998) Mol Biotech., 9:187). Üllitises WO97/47314 on kirjeldatud substraadi lahutamise kogude (*substrate subtraction libraries*) kasutamist, et kombinatoorset kogu, mis võib olla faagimeetodi kogu, kasutades eristada ensüüme spetsiifilisuse järgi. Üllitises WO97/09446 on kirjeldatud detergendilahustes kasutamiseks sobivate ensüümide selekteerimise meetodit, kasutades faagimeetodit. Spetsiifiliselt seonduvate valkude selekteerimise lisameetodeid on kirjeldatud US patentides nr 5498538, 5432018 ja üllitises WO98/15833.

(0337) Peptiidikogude tekitamise ja nende kogude skriinimise meetodid on avaldatud ka US patentides nr 5723286, 5432018, 5580717, 5427908, 5498530, 5770434, 5734018, 5698426, 5763192 ja 5723323.

O. IL-17A/F-ga seonduvad orgaanilised molekulid

(0338) IL-17A/F-ga seonduvad orgaanilised molekulid on orgaanilised molekulid, mis pole siin määratletud oligopeptiidid või antikehad ning mis seonduvad, eelistatavalt spetsiifiliselt, siin kirjeldatud IL-17A/F-polüpeptiidiga. IL-17A/F-ga seonduvaid orgaanilisi molekule võib identifitseerida ja keemiliselt sünteesida, kasutades tuntud meetodikat (vaadake näiteks PCT publikatsioone nr WO00/00823 ja WO00/39585). Tavaliselt on IL-17A/F-ga seonduvate orgaaniliste molekulide suurus väiksem kui 2000 daltonit, alternatiivselt väiksem kui 1500, 750, 500, 250 või 200 daltonit, kusjuures selliseid orgaanilisi molekule, millel on võime seonduda, eelistatavalt spetsiifiliselt, siin kirjeldatud IL-17A/F-polüpeptiidiga, võib hästi tuntud meetodeid kasutades identifitseerida liigse katsetamiseta. Sellega seoses võib märkida, et orgaaniliste molekulide kogude mingi sihtmärkpolüpeptiidiga spetsiifiliselt seonduvate molekulide suhtes skriinimise meetodid on tehnika tasemes hästi tuntud (vaadake näiteks PCT publikatsioone nr (WO00/00823 ja WO00/39585). IL-17A/F-ga seonduvad orgaanilised molekulid võivad olla näiteks aldehüüdid, ketoonid, oksiidid, hüdrasoonid semikarbasoonid, karbasiidid, primaarsed amiinid, sekundaarsed amiinid, tertsiarsed amiinid, N-asendatud hüdrasiinid, hüdrasiidid, alkoholid, eetrid, tiolid, tioeetrid, disulfiidid, karboksüülhapped, estrid, amiidid, uuread, karbamaadid, karbonaadid, ketaalid, tioketaalid, atsetaalid, tioatsetaalid, arüülhaliidid, arüülsulfonaadid, alküülhaliidid, alküülsulfonaadid, aromaatsed ühendid, heterotsükliilised ühendid, aniliinid, alkeenid, alküünid, dioolid, aminoalkoholid, oksasolidii-

nid, oksasoliinid, tiasolidiinid, tiasoliinid, eenamiinid, sulfoonamiidid, epoksiidid, asiridiinid, isotsüanaadid, sulfonüülkloriidid, diasoühendid, happekloriidid või muud taolised.

P. IL-17A/F-vastaste antikehade, IL-17A/F-ga seonduvate oligopeptiidide ja IL-17A/F-ga seonduvate orgaaniliste molekulide skriinimine soovitud omaduste suhtes

(0339) Eespool on kirjeldatud IL-17A/F-polüpeptiididega seonduvate antikehade, oligopeptiidide ja orgaaniliste molekulide tekitamise meetodeid. Lisaks võib valida antikehasid, oligopeptiide või muid orgaanilisi molekule, millel on kindlad soovitud bioloogilised omadused.

(0340) Leiutisekohase L-17A/F-vastase antikeha, oligopeptiidi või muu orgaanilise molekuli kasvu inhibeerivat mõju võib hinnata tehnika tasemes tuntud meetoditega, näiteks kasutades rakke, mis ekspresseerivad IL-17A/F-polüpeptiidi endogeenselt või pärast transfekteerimist IL-17A/F-i geeniga. Näiteks võib sobivaid kasvajakaku liine ja IL-17A/F-ga transfekteeritud rakke mõne (näiteks 2-7) päeva jooksul töödelda leiutisekohase IL-17A/F-vastase monokloonse antikeha, oligopeptiidi või erinevates kontsentratsioonides orgaanilise molekuliga ning värvida kristallvioleti või MTT-ga või analüüsida mõne muu kolorimeetrilise analüüsiga. Prolifereerumise mõõtmise veel üks meetod oleks ³H-tümidüüni omastamise võrdlemine rakkude puhul, mida töödeldi leiutisekohase IL-17A/F-vastase antikeha, IL-17A/F-ga seonduva oligopeptiidi või IL-17A/F-ga seonduva orgaanilise molekuli esinemisel või puudumisel. Pärast töötlemist rakud kogutakse ning stsintillatsiooniloenduriga kvantifitseeritakse DNA-sse liitunud radioaktiivsus. Kohased positiivsed kontrollid hõlmavad valitud rakuliini töötlemist kasvu inhibeeriva antikehaga, mille puhul on teada, et see inhibeerib antud rakuliini kasvu. Kasvajakakkude kasvu inhibeerimise *in vivo* võib määrata tehnika tasemes tuntud erinevate meetoditega. Eelistatavalt on kasvajakakk IL-17A/F-polüpeptiidi üleekspresseeriv rakk. Ühes teostuses, kui antikeha kontsentratsioon on umbes 0,5-30 µg/ml, inhibeeriks IL-17A/F-vastane antikeha, IL-17A/F-ga seonduv oligopeptiid või IL-17A/F-ga seonduv orgaaniline molekul eelistatavalt IL-17A/F-i ekspresseeriva kasvajakaku prolifererumist *in vitro* ja *in vivo* umbes 25-100% võrreldes töötlemata kasvajakakuga, enam eelistatavalt inhibeeriks umbes 30-100% ning veel enam eelistatavalt umbes 50-100% või 70-100%. Kasvu inhibeerimine on mõõdetav antikeha kontsentratsiooni puhul, mis rakukultuuris on umbes 0,5-30 µg/ml või umbes 0,5-200 nM, kusjuures kasvu inhibeerimine määratakse 1-10 päeva pärast kasvajakakkude eksponeerimist antikehale. Antikeha on *in vivo* kasvu inhibee-

riv, kui IL-17A/F-vastase antikeha manustamine koguses umbes 1 µg kuni umbes 100 mg ühe kilogrammi kehamassi kohta annab tulemuseks kasvaja suuruse vähenemise või kasvajaraku proliferatsioonide vähenemise umbes 5 päeva kuni 3 kuu jooksul, eelistatavalt umbes 5-30 päeva jooksul alates antikeha esimesest manustamisest.

(0341) Rakusurma indutseeriva IL-17A/F-vastase antikeha, IL-17A/F-ga seonduva oligopeptiidi või IL-17A/F-ga seonduva orgaanilise molekuli valimiseks võib kontrolli suhtes hinnata membraani terviklikuse kadumist, mida näitab näiteks propiidiidumjodiidi (PJ), trüpaansinise või 7AAD omastamine. PJ-i omastamise analüüsi võib teha komplemendi ja immuunefektor-rakkude puudumisel. IL-17A/F-polüpeptiidi ekspresseerivaid kasvajakasvatusi inkubeeritakse ainult keskkonnas või keskkonnas, mis sisaldab kohast IL-17A/F-vastast antikeha (näiteks umbes 10 µg/ml), IL-17A/F-ga seonduvat oligopeptiidi või IL-17A/F-ga seonduvat orgaanilist molekuli. Rakke inkubeeritakse 3 päeva. Iga töötlemise järel rakud pestakse ja alikvooditakse 35 mm sõelkorkidega (*strainer-capped*) 12 x 75 tuubidesse (1ml tuubi kohta, 3 tuubi töötamise rühmas), et eemaldada rakuklombid. Seejärel pannakse tuubidesse PJ (10 µg/ml). Proove võib analüüsida, kasutades voolutsütomeetrit FACSCAN[®] ja tarkvara FACSCONVERT[®] CellQuest (Becton Dickinson). Need IL-17A/F-vastased antikehad, IL-17A/F-ga seonduvad oligopeptiidid või IL-17A/F-ga seonduvad orgaanilised molekulid, mis PJ-i omastamise järgi indutseerivad statistiliselt olulistel tasemetel rakusurma, võib valida rakusurma indutseerivateks IL-17A/F-vastasteks antikehadeks, IL-17A/F-ga seonduvateks oligopeptiidideks või IL-17A/F-ga seonduvateks orgaanilisteks molekulideks.

(0342) Antikehade, oligopeptiidide või muude orgaaniliste molekulide, mis seonduvad mingi epitoobiga, mis on huvipakkuva antikehaga seondunud IL-17A/F-polüpeptiidis, suhtes skriinimiseks võib teostada tavapärase risttõkestamisanalüüsi, nagu seda on kirjeldatud teoses *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, toim. Harlow, David Lane (1988). Seda analüüsi võib kasutada, et määrata, kas testitav antikeha, oligopeptiid või muu orgaaniline molekul seondub sama koha või epitoobiga, millega seondub mingi tuntud IL-17A/F-vastane antikeha. Alternatiivselt või lisaks võib tehnika tasemes tuntud meetoditega teostada epitoopide kaardistamist. Näiteks võib ühenduses olevaid jääke identifitseerida antikeha järjestuse muteerimisega, näiteksalaniiniga skaneerides. Esmalt testitakse mutantset antikeha seondumise suhtes polükloonsel antikehaga, et veenduda õiges voltumises. Sellest erineva meetodi kohaselt võib IL-17A/F-polüpeptiidi erinevatele piirkondadele vasta-

vaid peptiide kasutada analüüsidest testitavate antikehadega konkureerimise või testitava antikeha ja antikehaga, mille epitoop on iseloomustatud või tuntud, konkureerimise analüüsidest.

Q. Ravimkompositsioonid

(0343) Leiutisekohaseid aktiivseid IL-17A/F-molekule (näiteks IL-17A/F-polüpeptiide, IL-17A/F-vastaseid antikehasid ja/või nende mõlemate variante) ning lisaks muid molekule, mis on identifitseeritud eespool avaldatud skriinimisanalüüsidega, võib ravimkompositsioonide vormis manustada immuunseoseliste haiguste raviks. Aktiivse IL-17A/F-molekuli, eelistatavalt leiutisekohase polüpeptiidi või antikeha, ravimpreparaadid valmistatakse säilitamiseks, segades soovitud puhtusastmega aktiivse molekuli vabalt valitud farmatseutiliselt vastuvõetavate kandjate, abiainetega või stabiliseerijatega (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16. trükk, toimetaja Osol, A. (1980)). Vastuvõetavad kandjad, abiained või stabiliseerijad ei ole saajatele kasutatavates annustes ja kontsentratsioonides toksilised ning need hõlmavad puhvreid, nagu fosfaat-, tsitraat- ja muude orgaaniliste hapete puhvrid, antioksütante, sealhulgas askorbiinhapet ja metioniini, säilitusaineid (nagu oktaetsüüldimetüülbensüülammooniumkloriid, heksametooniumkloriid, bensalkooniumkloriid, benseetooniumkloriid, fenool, butüül- või bensüülalkohol, alküülparabeenid, nagu metüül- või propüülparabeen, katehool, resortsiinool, tsükloheksanool, 3-pentanool ja m-kresool), väikese molekulmassiga (vähem kui umbes 10 jäägiga) polüpeptiide, valke, nagu seerumi albumiin, želatiin või immunoglobuliinid, hüdrofiilseid polümeere nagu polüvinüülpürrolidoon, aminohappeid, nagu glütsiin, glutamiin, asparagiin, histidiin, arginiin või lüsiin, monosahhariide, disahhariide ja muid süsivesikuid, sealhulgas glükoosi, mannoosi või dekstriini, kelaativaid agenseid nagu EDTA, suhkruid, nagu sahharoos, mannitool, trehaloos või sorbitool, sooli moodustavad vastasioone nagu naatrium, metallikomplekse (näiteks Zn-valgu komplekse) ning/või mitteioonseid pindaktiivseid aineid, nagu TWEEN™, PLURONICS™ või polüetüleenglükool (PEG).

(0344) Siin avaldatud skriinimisanalüüsidega identifitseeritud ühendeid võib valmistada analoogsel viisil, kasutades tehnika tasemes hästi tuntud standardseid meetodeid.

(0345) IL-17A/F-molekuli kohaletoimetamiseks rakkudesse võib kasutada ka lipofektsiooni või liposoomi. Kui kasutatakse antikeha fragmente, on eelistatav väikseim inhibeeriv fragment, mis seondub spetsiifiliselt sihtmärkvalku siduva domeeniga. Näiteks võib antikeha varieeruva piirkonna järjestustele tuginedes kujundada peptiidmolekule, mis säilitavad võime

seonduda sihtmärkvalgu järjestusega. Selliseid peptiide võib sünteesida keemiliselt ja/või toota rekombinantse DNA tehnoloogiaga (vaadake näiteks üllitist Marasco *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90.7889-7893 (1993)).

(0346) Kui see on vajalik konkreetseks ravitavaks näidustuseks, võib preparaat sisaldada ka enam kui ühte aktiivset ühendit, eelistatavalt selliseid, millel on täiendavad aktiivsused, mis ei mõjuta teineteist ebasoodsalt. Alternatiivselt või lisaks võib kompositsioon sisaldada keemiaravi agensit, tsütotoksilist agensit, tsütokiini või kasvu inhibeerivat agensit. Sellised molekulid esinevad kombinatsioonides sobivalt kogustena, mis on sihtotstarbel tõhusad.

(0347) Aktiivsed IL-17A/F-molekulid võib ka sulgeda mikrokapslitesse, mis on valmistatud näiteks koatservatsioonimeetoditel või interfatsiaalse polümeriseerimisega, näiteks vastavalt hüdroksümetüülselluloos- või želatiinmikrokapslite ja polü(metüülmetakrülaat)mikrokapslitena ravimi kolloidsetes ülekandesüsteemides (näiteks liposoomides, albumiini mikrokerakestes, mikroemulsioonis, nanoosakestes ja nanokapslites) või makroemulsioonides. Sellised meetodid on avaldatud teoses Remington's Pharmaceutical Sciences, 16. väljaanne, toimetaja Osol, A. (1980).

(0348) *In vivo* manustamiseks kasutatavad preparaadid peavad olema steriilsed. See on hõlpsalt saavutatav filtrimisega läbi steriilsete filtermembraanide.

(0349) Võib valmistada IL-17A/F-molekule viivitatult vabastavaid preparaate. Toimeainet viivitatult vabastavate preparaatide sobivad näited hõlmavad antikeha sisaldavate tahkete hüdrofoobsete polümeeride poolläbilaskvaid matrikseid, mis on kindla kujuga esemete, näiteks kilede või mikrokapslite vormis. Toimeainet viivitatult vabastavate matriksite näited hõlmavad polüestereid, hüdrogeele (näiteks polü(2-hüdroksüetüülmetakrülaati) või polü(vinüülalkoholi)), polülaktiide (US patent nr 3773919), L-glutamiinhappe ja γ -etüül-L-glutamaadi kopolümeere, mittelagunevat etüleenvinüülatsetaati, lagunevaid piimhappe-glükoolhappe kopolümeere, nagu LUPRON DEPOT™ (piimhappe-glükoolhappe kopolümeerist ja leuproliidatsetaadist koosnevad süstitavad mikrokerakesed) ning polü-D(-)-3-hüdroksüvõihapet. Kuigi mõned polümeerid, nagu etüleenvinüülatsetaat ja piimhappe-glükoolhappe, on võimalised molekulid vabastama enam kui 100 päeva, vabastavad teatud hüdrogeelid valke lühemate ajavahemike jooksul. Kui kapseldatud antikehad jäävad kehasse pikaks ajaks, võivad need 37 °C juures niiskusega kokkupuutumise tõttu denatureeruda või agregeeruda, mille tulemuseks on bioloogilise aktiivsuse kadu ja võimalikud muutused immunogeensuses. Sõltuvalt mehhanismist võib stabiliseerimiseks välja töötada otstarbekohased strateegiad.

Näiteks kui avastatakse, et agregeerumise mehhanismiks on molekulidevahelise S-S sideme moodustumine tiodisulfiidi vahetuse kaudu, võib stabiliseerimise saavutada sulfhüdrüüljääkide muutmise, happelistest lahustest lüofiliseerimise, niiskusesisalduse kontrollimise, sobivate lisandite kasutamise ning spetsiifiliste polümeermaatriksite kompositsioonide arendamisega.

R. Ravimeetodid

(0350) Peetakse võimalikuks, et leiutisekohaseid polüpeptiide, antikehasid ja muid aktiivseid ühendeid võib kasutada, et ravida erinevaid immuunseoselisi haigusi ja seisundeid, nagu T-rakuga vahendatud haigused, sealhulgas need, mida iseloomustab põletikuga seotud rakkude infiltreerumine koesse, T-raku prolifereerumise stimuleerimine, T-raku prolifereerumise inhibeerimine, suurenenud või vähenenud vaskulaarne läbilaskvus või selle inhibeerimine.

(0351) Iseloomulikud seisundid või häired, mida ravitaks leiutisekohaste polüpeptiidide, antikehade või muude ühenditega, on, nendega piirdumata, järgmised: süsteemne erütematoosluupus, reumatoidartriit, juveniilne krooniline artriit, spondüloartropaatiad, süsteemne sklerosis (skleroderma), idiopaatilised põletikulised müopaatiad (dermatomüosiit, polümüosiit), Sjörgeni sündroom, süsteemne vaskuliit, sarkoidoos, autoimmuunne hemolüütiline aneemia (immuun-pantsütopeenia, paroksüsmaalne öine hemoglobinuuria), autoimmuunne trombotsütopeenia (idiopaatiline trombotsütopeeniline purpura, immuunvahendatud trombotsütopeenia), türeoidiit (Grave'i tõbi, Hashimoto türeoidiit, juveniilne lümfotsütoosne türeoidiit, atroofiline türeoidiit), diabeet, immuunvahendatud neeruhaigus (glomerulonefriit, tubulointerstitiaalne nefriit), kesk- ja perifeerse närvisüsteemi demüeliniseerivad haigused, nagu hulgisklerosis, idiopaatiline demüeliniseeriv polüneuropaatia või Guillaini-Barré'i sündroom ja krooniline põletikuline demüeliniseeriv polüneuropaatia, maksa-sapihaigused, nagu nakkuslik hepatiit (A-, B-, C-, D-, E- ja muud, mittehepatotroofilistest viirustest tingitud), krooniline aktiivne autoimmuunne hepatiit, esmane sapitsirroos, granulomatoosne hepatiit ja skleroseeruv kolangiit, põletikuline soolehaigus (haavandiline koliit, Crohni tõbi), gluteeni-tundlik eneteropaatia ja Whipple tõbi, autoimmuunsed või immuunvahendatud nahahaigused, mille hulgas on naha villtõved, mitmekujuline erüteem ja kontaktdermatiit, psoriaas, allergilised haigused, nagu astma, allergiline nohu, atoopiline dermatiit, toidu suhtes ülitundlikkus ja nõgestõbi, immunoloogilised kopsuhaigused, nagu eosinofiilne kopsupõletik, idiopaatiline

kopsufibroos ja ülitundlikkusega seotud kopsupõletik, siirdamisega seotud haigused, sealhulgas transplantaadi hülgamine ja transplantaadi peremehevastane haigus.

(0352) Süsteemse erütematoosluupuse puhul on haiguse keskne vahendaja oma valkude/kudedede vastaste autoreaktiivsete antikehade tootmine ning järgnev immuunvahendatud põletiku tekkimine. Antikehad vahendavad otseselt või kaudselt koekahjustust. Kuigi pole näidatud, et T-lümfotsüüdid oleksid otseselt hõlmatud koekahjustusse, on T-lümfotsüüdid vajalikud autoreaktiivsete antikehade arenemiseks. Haiguse teke sõltub seega T-lümfotsüütidest. Kliiniliselt tabab haigus paljusid organeid ja süsteeme, mille hulgas on neer, kops, lihas- ja tugisüsteem, nahk ja limaskestad, silm, kesknärvisüsteem, südame- ja veresoonekonnasüsteem, seedekulgla, luuüdi ja veri.

(0353) Reumatoidartriit (RA) on peamiselt mitmete liigeste sünoviaalmembraane hõlmav krooniline süsteemne autoimmuunne põletikuline haigus, mille tulemuseks on liigesekõhre kahjustus. Patogenees sõltub T-lümfotsüütidest ja on seotud reumafaktorite, milleks on oma IgG vastased autoantikehad, tootmise ning selle tulemusena immuunkomplekside, mis saavutavad kõrge taseme liigesevedelikus ja veres, moodustumisega. Liigeses võivad need kompleksid indutseerida tähelepanuväärse lümfotsüütide ja monotsüütide infiltraadi sünooviumis ja järgnevaid tähelepanuväärseid liigesemuutusi: liigeseruumi/vedelikku infiltreeruvad sarnased rakud ja lisaks arvukalt neutrofiile. Haigestuvad koed on peamiselt liigesed, tihti sümmeetrilise mustrina. Siiski ilmneb ka liigeseväline haigus, millel on kaks vormi. Ühe vormi puhul arenevad liigesevälised haiguskolded koos jätkuvalt progresseeruva liigesehaiguse ning kopsufibroosi, vaskuliidi ja nahahaavandite tüüpiliste haiguskolletega. Liigesevälise haiguse teine vorm on niinimetatud Felty sündroom, mis ilmneb RA-haiguse kulus hilisena, mõnikord pärast liigesehaiguse vaibumist, ning see hõlmab neutropeenia, trombotsütopeenia ja põrna suurenemise esinemist. Sellega võib kaasneda vaskuliit paljudes organites, millega koos moodustuvad nekroosid, nahahaavandid ja gangreen. Tihti arenevad patsientidel haigestunud liigeseid katva naha aluses koes reumatoidsed sõlmed, hilises staadiumis on sõlmedel nekrootilised keskmed, mida ümbritseb erinevate, põletikuga seotud rakkude infiltraat. Muud ilmingud, mis RA puhul võivad esineda, hõlmavad perikardiiti, pleuriiti, koronaararterite põletikku, interstitsiaalset kopsupõletikku koos kopsufibroosiga, kuiva keratiokonjunktiviiti ja reumatoidseid sõlmi.

(0354) Juveniilne krooniline artriit on krooniline idiopaatiline põletikuline haigus, mis tihti algab vähem kui 16 aasta vanuselt. Selle fenotüübil on mõned sarnasused RA-ga; mõned

patsiendid, kellel reumafaktor on positiivne, on liigitatud juveniilse reumatoidartriidiga patsientideks. Haigus on liigitatav kolmeks peamiseks alamkateooriaks, milleks on pausi-artikulaarne, poliartikulaarne ja süsteemne. Artriit võib olla tõsine ning tüüpiliselt on see hävitav ja toob kaasa liigese anküloosi ja pidurdunud kasvu. Muud ilmingud võivad hõlmata kroonilist anteriorset uveiiti ja süsteemset amüloidoosi.

(0355) Spondüloartropaatiad on rühm häireid, millel on ühised kliinilised tunnused ja ühine seos geenisaaduse HLA-B27 ekspressiooniga. Häired hõlmavad anküloseerivat spondüliiti, Reiteri sündroomi (reaktiivset artriiti), põletikulise soolehaigusega seotud artriiti, psoriaasiga seotud spondüliiti, lapseas algavat spondüloartropaatiat ja liigitamata spondüloartropaatiat. Eristavad tunnused hõlmavad sakroileitiiti spondüliidiga või ilma, põletikulist asümmeetrilist artriiti, seost HLA-B27-ga (MHC klassi I lookuse HLA-B seroloogiliselt määratletud alleeliga), silmapõletikku ja muu reumatoidse haigusega seotud autoantikehade puudumist. Kesksena haiguse indutseerimisse kaasatud rakk on CD8⁺ T-lümfotsüüt, mille sihtmärgiks on MHC klassi I kuuluvate molekulidega esitletud antigeen. CD8⁺ T-rakud võivad reageerida MHC klassi I alleeliga HLA-B27 selliselt, nagu MHC klassi I molekulidega oleks ekspresseeritud võõrpeptiid. On püstitatud hüpotees, et HLA-B27 epitoop jälgendab bakteriaalset või muu mikroobi antigeenset epitoopi ning seega indutseeritakse CD8⁺ T-rakkude vastus.

(0356) Süsteemsel skleroosil (skleroderma) on tundmatu etioloogia. Haiguse iseloomulik tunnus on naha kõvastumine, mis tõenäoliselt indutseeritakse aktiivse põletikulise protsessiga. Skleroderma võib olla paikne või süsteemne, tavalised vaskulaarsed haiguskolded ning endoteeliraku vigastus mikroveresoonkonnas on süsteemse skleroosi arenemise varane ja oluline sündmus; see vaskulaarne vigastus võib olla immuunvahendatud. Immunoloogiline alus on seotud mononukleaarsete rakuinfiltreatide esinemisega naha haiguskolletes ning tuumavastaste antikehade esinemisega paljudel patsientidel. Tihti on naha haiguskolletes fibroblastide rakupinnal ülesreguleeritud ICAM-1, mis viitab, et nende rakkude vastasmõjul T-rakuga võib olla roll haiguse patogeneesis. Muud hõlmatud organid on seedekulgla: silelihase atroofia ja fibroos, mille tulemuseks on ebanormaalne peristaltika/liigutused; neer: kontsentriline endoteelialune intimaalne proliferatsioon, mis mõjutab väikeseid kõverdunud ja interlobulaarseid arterid, mille tulemuseks on vähenenud verevool neerukoos, mille tulemuseks on proteiinuuria, asoteemia ja kõrgenenud vererõhk; skeletilihas: atroofia, interstitsiaalne fibroos, põletik; kops: interstitsiaalne kopsupõletik ja interstitsiaalne fibroos; ning süda: kokkutõmbevööndi nekroos, armistumine/fibroos.

(0357) Idiopaatilised põletikulised müopaatiad hõlmavad dermatomüosiiti, polümüosiiti ja muid tundmatu etioloogiaga kroonilisi lihasepõletikke, mille tulemuseks on lihasnõrkus. Lihase kahjustus/põletik on tihti sümmeetriline ja progresseeruv. Enamike vormidega on seotud autoantikehad. Need müosiidispetsiifilised autoantikehad on suunatud valgusünteesi hõlmatud koostisosade, milleks on valgud ja RNA-d, vastu ja inhibeerivad nende funktsiooni.

(0358) Sjörgeni sündroom on tingitud immuunvahendatud põletikust ja järgnevast pisara- ja süljenäärmete funktsionaalsest kahjustusest. Haigus võib olla seotud või kaasneda põletikuliste sidekoehaigustega. Haigus on seotud antigeenide Ro ja La, millised mõlemad on väikese RNA ja valgu kompleksid, vastaste autoantikehade tootmisega. Haiguskollete tulemuseks on kuiv keratokonjunktiviit, kserostoomia koos muude ilmingute või seostega, mille hulgas on sapitsirroos, perifeerne või sensoorne neuropaatia ja palpeeritav purpura.

(0359) Süsteemsed vaskuliidid on haigused, mille puhul esmaseks haiguskoldeks on vere-soonte põletik ja järgnev kahjustus, mille tulemuseks on haigestunud soontega varustatavate kudede isheemia/nekroos/taandareng ning, mõnel juhul, lõpuks lõpporgani puudulik toimimine. Vaskuliit võib ilmned ka muude immuunsuse-põletikuga vahendatud haiguste, nagu reumatoidartriit, süsteemne skleroos jne, eriti immuunkomplekside moodustumisega seotud haiguste, teisese haiguskolde või nähuna. Esmaste süsteemsete vaskuliitide rühma kuuluvad haigused hõlmavad nekrotiseerivat vaskuliiti, mille hulgas on sõlmjas polüarteriit, allergiline angiit ja granulomatoos, polüangiiti, Wegeneri granulomatoosi, lümfomatoidset granulomatoosi ja hiidrakulist arteriiti. Mitmesugused vaskuliidid hõlmavad naha- ja limaskesta lümfisõlme sündroomi (*mucocutaneous lymph node syndrome* – MLNS-i ehk Kawasaki tõbe), kesknärvisüsteemi eraldatud vaskuliiti, Behet'i tõbe, oblitereerivat tromboangiiti (Buergeri tõbe) ja naha nekrotiseerivat venuliiti. Arvatakse, et enamuse loetletud vaskuliiditüüpide patogeensuse mehhanism on tingitud immuunkomplekside sadenemisest soone seinas ja järgnevast põletikulise vastuse indutseerimisest ADCC, komplemendi aktiveerimise või nende mõlema kaudu.

(0360) Sarkoidoos on tundmatu etioloogiaga seisund, mida iseloomustab epiteelsete granuloomide esinemine kehas peaaegu ükskõik millises koes, kõige tavalisemalt kopsus. Patogenees hõlmab aktiveeritud makrofaagide ja lümfirakkude püsivust haigestunud kohtades ning järgnevaid kroonilisi nähtusid, mis tulenevad nende rakutüüpide poolt vabastatavate, paikset ja süsteemselt aktiivsete saaduste vabastamisest.

(0361) Autoimmuunne hemolüütiline aneemia, sealhulgas autoimmuunne hemolüütiline aneemia, immuunpantsütopeenia ja paroksüsmaalne öine hemoglobiinuuria, on erütrotsüütide (ja mõnel juhul teiste vererakkude, sealhulgas ka trombotsüütide) pinnal ekspresseeritavate antigeenide vastaste antikehade tootmise tulemus, peegeldades selliste antikehaga kaetud rakkude eemaldamist komplemendivahendatud lüüsimise ja/või ADCC/Fc-retseptoriga vahendatud mehhanismidega.

(0362) Autoimmuunse trombotsütopeenia, sealhulgas trombotsütopeeniline purpura ja immuunvahendatud trombotsütopeenia, puhul ilmneb trombotsüütide hävitamine/eemaldamine, mis tuleneb trombotsüütidele antikeha või komplemendi kinnitumisest ja trombotsüütide järgnevast eemaldamisest komplemendivahendatud lüüsimise, ADCC või Fc-retseptoriga vahendatud mehhanismidega.

(0363) Türeoidiit, sealhulgas Grave tõbi, Hashimoto türeoidiit, juveniilne lümfotsütaarne türeoidiit ja atroofiline türeoidiit, on kilpnäärme antigeenide vastase autoimmuunvastuse ning antikehade, mis reageerivad kilpnäärmes esinevate ja tihti selle koe suhtes spetsiifiliste valkudega, tootmise tulemus. On katsemudelid, mis hõlmavad spontaanseid mudeleid, nagu rotid (BUF- ja BB-rotid) ja kanad (rasvunud kanade liin) ning indutseeritavaid mudeleid, milleks on loomade immuniseerimine türoglobuliini või kilpnäärme mikrosomaalse antigeeniga (kilpnäärme peroksüdaasiga).

(0364) Esimest tüüpi diabeet või insuliinsõltuv diabeet on kõhunäärme saarekeserakkude (*islet cells*) autoimmuunne hävitamine ning seda hävitamist vahendatakse autoantikehade ja autoreaktiivsete T-rakkudega. Insuliini- või insuliini retseptori vastased antikehad võivad samuti tekitada insuliinile vastuse puudumise fenotüübi.

(0365) Immuunvahendatud neeruhaigused, sealhulgas glomerulonefriit ja tubulointerstitsiaalne nefriit, tulenevad neerukoe otsesest, antikeha- või T-rakuga vahendatud kahjustusest, mis on neeru antigeenide vastaste autoreaktiivsete antikehade või T-rakkude tootmise tulemus, või kaudsest kahjustusest, mis on antikehade ja/või immuunkomplekside, mis on reaktiivsed muude, mitte-neeru antigeenide suhtes, sadenemisest neerus. Seega võivad ka muud immuunvahendatud haigused, mille tulemusena moodustuvad immuunkompleksid, kaudselt indutseerida immuunvahendatud neeruhaigust. Nii otseste kui kaudsete immuunmehhanismide tulemuseks on põletikuvastus, mis tekitab/indutseerib haiguskolde arenemise neerukudedes ning selle tulemuseks on organi toimimise halvenemine ja mõnel juhul neerupuudu-

likuse progresseerumine. Haiguskollete patogeneesi võivad olla hõlmatud nii humoraalsed kui rakulised mehhanismid.

(0366) Arvatakse, et kesk- ja perifeerse närvisüsteemi demüeliniseerivatel haigustel, mille hulgas on hulgiskleroos, idiopaatiline demüeliniseeriv polüneuropaatia ehk Guillaini-Barré'i sündroom ja krooniline põletikuline demüeliniseeriv polüneuropaatia, on autoimmuune alus ning need tulenevad närvi demüeliniseerumisest, mis on oligodendrotsüütidele või otseselt müeliinile põhjustatud kahjustuse tulemus. MS-i tuhul on tõendeid, mis osutavad, et haiguse indutseerimine ja progresseerumine sõltub T-lümfotsüütidest. Hulgiskleroos on demüeliniseeriv haigus, mis sõltub T-lümfotsüütidest ning on halveneva-paraneva või krooniliselt progresseeruva kuluga. Etioloogia on tundmatu, kuid siiski panustavad nii viirusnakkused, geneetiline eelsoodumus, keskkond kui autoimmuunsus. Haiguskolded sisaldavad valdavalt T-lümfotsüütidega vahendatud infiltraate, mikroglia rakke ja infiltreeruvaid makrofaage ning haiguskolletes on valdavaks rakutüübiks CD4⁺ T-lümfotsüüdid. Oligodendrotsüütide rakuurma ja järgneva demüeliniseerumise mehhanism pole teada, kuid tõenäoliselt juhitakse seda T-lümfotsüütidega.

(0367) Põletikuline ja fibroosne kopsuhaigus, sealhulgas eosinofiilne kopsupõletik, idiopaatiline kopsufibroos ja ülitundlikkusest tingitud kopsupõletik, võib hõlmata vääreguleeritud immuun-põletikuvastust. Selle vastuse inhibeerimisel oleks ravitoime.

(0368) Autoimmuun- või immuunvahendatud nahahaigus, mille hulgas on naha villtõved, mitmekujuline erüteem ja kontaktdermatiit, on vahendatud autoantikehadega, mille teke sõltub T-lümfotsüütidest.

(0369) Psoriaas on T-lümfotsüütidega vahendatud põletikuline haigus. Haiguskolded sisaldavad T-lümfotsüütide, makrofaagide ja antigeeni töötlevate rakkude infiltraate ning mõningal määral neutrofiile.

(0370) Allergilised haigused, sealhulgas astma, allergiline nohu, atoopiline dermatiit, ülitundlikkus toidu suhtes ja nõgestõbi sõltuvad T-lümfotsüütidest. Valdavalt vahendatakse neid haigusi T-lümfotsüüdi poolt indutseeritud põletiku, IgE-vahendatud põletiku või nende mõlema kombinatsiooniga.

(0371) Siirdamisega seotud haigused, sealhulgas transplantaadi hülgamine ja transplantaadi peremehevastane haigus (*graft-versus-host-disease* – GVHD) sõltuvad T-lümfotsüütidest ning T-lümfotsüüdi funktsiooni inhibeerimisel on leevendav toime.

(0372) Muud haigused, mille puhul immuun- ja/või põletikuvastusesse sekkumine on kasulik, on nakkushaigused, sealhulgas, nendega piirdumata, viirusnakkus (sealhulgas, nendega piirdumata, AIDS, A-, B-, C-, D-, E-hepatiit ja herpes), bakteriaalne nakkus, seennakkused ning algloomade ja parasiitide nakkused (MLR-i stimuleerivaid molekule (või nende derivaate/agoniste) saab kasutada raviks, et võimendada nakkuslike agensite vastast immuunvastust), immuunpuudulikkushaigused (MLR-i stimuleerivaid molekule/derivaate/agoniste saab kasutada raviks, et võimendada immuunvastust päriliku, omandatud, nakkusega indutseeritud (nagu HIV-ga nakatumisel) või iatogeense (näiteks keemiaravist tingitud) immuunpuudulikkuse ja kasvaja puhul).

(0373) On näidatud, et mõnel vähiga inimpatsiendil areneb antikehade ja/või T-lümfotsüütide vastus kasvajarakkude antigeenide vastu. Samuti on kasvajate loomamudelites näidatud, et immuunvastuse võimendamise tulemusel võib esineda selle konkreetse kasvaja hülgamine või taandareng. Molekulidel, mis võimendavad T-lümfotsüütide vastust MLR-is, on rakendus *in vivo* kasvjavastase immuunvastuse võimendamises. Molekule, mis võimendavad T-lümfotsüüdi proliferatiivset vastust MLR-is (või väikese molekuliga agoniste või antikehasid, mis mõjutavad sama retseptorit antagonistlikult), saab kasutada vähiraviks. Molekulid, mis inhibeerivad lümfotsüüdi vastust MLR-is, toimivad ka kasvaja puhul *in vivo*, surudes maha kasvjavastast immuunvastust, ning selliseid molekule võivad ekspresseerida kasvajarakud ise või nende ekspressioon muudes rakkudes indutseeritakse kasvaja poolt. Antagonism selliste inhibeerivate molekulide suhtes (antikeha, väikese molekuliga antagonistidega või muul viisil) võimendab kasvaja immuunvahendatud hülgamist.

(0374) Lisaks võib põletikku soodustavate omadustega molekulide inhibeerimisel olla ravi- toime reperfusioonkahjustuse, insuldi, südameinfarkti, arteroskleroosi, ägeda kopsukahjustuse, hemorraagilise šoki, põletuse, sepsise / septilise šoki, ägeda tubulaarse nekroosi, endometriooosi, taandarenguga liigesehaiguse ja pankreatiidi puhul. Käesoleva leiutise kohaseid ühendeid, näiteks polüpeptiide või antikehasid, manustatakse imetajale, eelistatavalt inimesele, vastavalt tuntud meetoditele, nagu veenisisene manustamine boolusena või pidev infundeerimine aja jooksul, manustamine lihasesiseselt, kõhuõõnesiseselt, ajusiseselt, nahaalusi, liigesesiseselt, intrasünoviaalselt, intratekaalselt, suu kaudu, toopilisel või inhaleerimisega (ninasiseselt, kopsusiseselt). Eelistatav on polüpeptiidide ja antikehade manustamine veeniseselt või inhaleerimisega.

(0375) Immunoadjuvantravis võib muid ravirežiime nagu vähivastase agensi manustamine kombineerida leiutisekohaste valkude, antikehade või ühendite manustamisega. Näiteks võib patsiendile, keda ravitakse leiutisekohase immunoadjuvandiga, anda ka vähivastast agensit (keemiaraviagensit) või teha kiiritusravi. Selliste keemiaraviagensite valmistamiseks ja annustamisskeemide jaoks võib kasutada valmistajate juhiseid või erialal praktiseerija võib need empiiriliselt määrata. Sellise keemiaravi valmistamist ja annustamisskeeme on kirjeldatud ka teoses *Chemotherapy Service*, toimetajad M. C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992). Keemiaraviagensi manustamine võib eelneda või järgneda immunoadjuvandi manustamisele või neid võib anda samaaegselt. Lisaks võib östrogeenivastast ühendit nagu tamoksifeen või progesteronivastast ühendit nagu onapristoon (vaadake üllitist EP 616812) anda annustena, mis on tuntud selliste molekulide kasutamiseks.

(0376) Soovitav võib olla manustada muu immuunseoselise haigusega seotud antigeenide või kasvujärgsete antigeenide vastaseid antikehasid, nagu on antikehad, mis seonduvad CD20, CD11a, CD18, ErbB2, EGFR-i, ErbB3, ErbB4 või vaskulaarse endoteeli faktoriga (VEGF-ga). Alternatiivselt või lisaks võib patsiendile manustada koos kahte või enam antikeha, mis seonduvad sama või kahe või enama erineva siin avaldatud antigeeniga. Mõnikord võib olla kasulik manustada patsiendile ühte või enam tsütokiini. Ühes teostuses manustatakse IL-17A/F-polüpeptiidi koos kasvu inhibeeriva agensiga. Näiteks võib kasvu inhibeeriva agensi manustada esimesena ning sellele järgneb IL-17A/F-polüpeptiidi manustamine. Siiski peetakse võimalikuks samaaegset manustamist või IL-17A/F-polüpeptiidi manustamist esimesena. Kasvu inhibeeriva agensi sobivad annused on sellised, mida käesolevalt kasutatakse ning neid võib vähendada tänu kasvu inhibeeriva agensi ja IL-17A/F-polüpeptiidi kombineeritud toimele (sünergismile).

(0377) Leiutisekohase ühendi annus, mis sobib immuunseoselise haiguse ravimiseks või selle tõsiduse vähendamiseks, sõltub ravitava haiguse tüübist, nagu on määratletud eespool, haiguse tõsidusest ja kulust, sellest, kas antikeha manustatakse ennetavatel või ravivatel eesmärkidel, eelnevast ravist, patsiendi haigusloost ja reageerimisest ühendile ning raviarsti vabast valikust. Antikeha manustatakse sobivalt patsiendile ühekordselt või raviseeriatena.

(0378) Sõltuvalt haiguse tüübist ja tõsidusest on polüpeptiidi või antikeha algne kandidaat-annus umbes 1 µg/kg kuni 15 mg/kg (näiteks 0,1-20 mg/kg), manustamiseks patsiendile näiteks ühe või enama eraldi korra või pideva infusioonina. Tüüpiline päevane annus võib olla vahemikus umbes 1 mg/kg kuni umbes 100 mg/kg, sõltudes eespool mainitud teguritest.

Korduval annustamisel mitme päeva jooksul või kauem, jätkatakse sõltuvalt tingimustest ravi, kuni ilmneb haigussümptomite soovitud mahasurumine. Siiski võivad olla kasutatavad muud annustamisrežiimid. Selle ravi edenemist võib hõlpsalt jälgida tavapäraste meetodite ja analüüsidega.

S. Tootmisartiklid

(0379) Leiutise veel ühes teostuses pakutakse tootmisartiklit, mis sisaldab eespool kirjeldatud häirete diagnoosimiseks või ravimiseks kasutatavaid materjale (sisaldades näiteks IL-17A/F-molekuli). Tootmisartikkel hõlmab mahutit ja juhust. Sobivad mahutid hõlmavad näiteks pudeleid, viaale, süstlaid ja testtubet. Mahutid võivad olla tehtud mitmesugustest materjalidest, nagu klaas või plast. Mahuti sisaldab seisundi diagnoosimiseks või ravimiseks tõhusat kompositsiooni ning sellel võib olla steriilne ligipääsuava (näiteks võib mahuti olla veenisise lahuse kott või viaal, millel on hüpodermilise süstlanõelaga läbistatav kork). Harilikult on kompositsioonis olev aktiivne agens leiutisekohane polüpeptiid või antikeha. Mahutiga seotud juhust või etikett näitab, et kompositsiooni kasutatakse valitud seisundi diagnoosimiseks või ravimiseks. Lisaks võib tootmisartikkel sisaldada veel teist mahutit, mis sisaldab farmatseutiliselt vastuvõetavat puhvrit, nagu fosfaadiga puhverdatud sool, Ringeri lahus ja dekstroosilahus. See võib lisaks sisaldada teisi, kaubanduslikust ja kasutaja seisukohast soovitavaid materjale, sealhulgas muid puhvreid, lahusteid, filtreid, nõelu, süstlaid ja pakendi infolehti, millel on kasutusjuhised.

T. Immuunseoselise haiguse diagnoosimine ja prognoosi määramine

(0380) Rakupinna valgud, nagu on kindlate immuunseoseliste haiguste puhul üleekspresseeritud valgud, on suurepärased sihtmärgid ravimikandidaatidele või haiguse ravimiseks. Nendel valkudel ning sekreteeritavatel valkudel, mida kodeeritakse immuunseoselise haiguse staadiumites amplifitseeritavate geenidega, on lisarakendus selliste haiguste diagnoosimisel ja prognoosi määramisel. Näiteks võib antikehasid, mis on suunatud hulgiskleroosi, reumatoidartriidi, põletikulise soolehäire või muu immuunseoselise haiguse puhul amplifitseeritavate geenide saaduste vastu, kasutada agensitena diagnoosimiseks või prognoosi määramiseks.

(0381) Näiteks võib antikehasid, sealhulgas antikeha fragmente, kasutada amplifitseeritud või üleekspresseeritud geenidega kodeeritavate valkude (“markergeenide saaduste”) ekspressiooni kvalitatiivseks või kvantitatiivseks tuvastamiseks. Eelistatavalt on antikeha varustatud tuvastatava, näiteks fluorestseeruva, märgisega ning seondumist võib jälgida valgusmikroskoopia, voolutsütomeetria, fluoromeetria või muude meetoditega, mis on tehnika tasemes tuntud. Need meetodid on eriti sobivad, kui üleekspresseeritav geen kodeerib rakupinna valku. Praktiliselt teostatakse sellised seondumisanalüüsid selliselt, nagu on kirjeldatud eespool.

(0382) Võib teostada antikeha markergeeni saadusega seondumise tuvastamise *in situ*, näiteks immunofluorestsents- või immunoelektronmikroskoopiaga. Sellel eesmärgil võetakse patsiendilt histoloogiline proov ja sellele rakendatakse märgistatud antikeha, eelistatavalt kattes bioloogilise proovi antikehaga. See toiming võimaldab ka määrata markergeeni saaduse levikut uuritavas koes. Eriala asjatundjatele oleks ilmne, et *in situ* tuvastamiseks on vabalt kättesaadavad väga mitmesugused histoloogilised meetodid.

(0383) Järgnevaid näiteid pakutakse vaid illustreerivatel eesmärkidel ning need pole mõeldud piirama käesoleva leiutise ulatust mistahes viisil.

NÄITED

(0384) Kui pole osutatud teisiti, siis kaubandusest saadavaid reagente, millele näidetes viidatakse, kasutati vastavalt valmistajate juhistele. Järgnevates näidetes ja kõikjal kirjelduses identifitseeritud rakkude, mida identifitseeritakse ATCC vastuvõtnumbriga, allikas on Ameerika tüüpkultuuride kollektsioon, Manassas, VA.

NÄIDE 1

IL-17A/F-na identifitseeritud uudse IL-17-tsütokiini rekombinantne ekspressioon

Inimese 293-neerurakkude transfekteerimine IL-17 ja IL-17F-i kodeerivate cDNA-ekspressioonivektoritega

(0385) Inimese 293-neerurakud transfekteeriti inimese IL-17, IL-17C ja IL-17F-i gene kodeerivate plasmiidide võrdsete kogustega, kasutades kaltsiumfosfaadiga sadestamist. Iga

50-80% laadunud T-150-kolvi jaoks segati 50 µg igat plasmidi, et moodustada sade rakkude kohal olevas kihis. Üks päev pärast transfekteerimist eemaldati 10% FCS-i, 5 mM glutamiini ja penitsilliini-streptomütsiini sisaldav 50 : 50 suhtega F12 : DMEM keskkond, see asendati seerumivaba PS24-keskkonnaga ning kultiveeriti veel neli päeva. Nelja päeva pärast konditsioneeritud keskkond koguti, tsentrifugeeriti ja filtriti steriilselt enne puhastamist.

Rekombinantse IL-17A/F-i puhastamine

A. Algne fraktsioneerimisetapp 1

(0386) Kaks ja pool liitrit rekombinantse IL-17A/F-ga konditsioneeritud keskkonda, mis pärines inimese 293-neerurakkude transientsetest kultuuridest, kontsenteeriti ja dialüüsiti 480 ml mahuni 20 mM naatriumatsetaadi, pH 5, 0,1 mM naatriumasiidi (puhver A) lahuse vastu, kasutades 10 kD poorisuurusega membraani, ning seejärel rakendati Pharmacia kolonni HiLoad S Sepharose 26/10 voolukiirusega 6 ml minutis. Kolonni elueeriti lineaarse gradiendiga kuni 100% puhvrini B (20 mM naatriumatsetaat, 1 M NaCl, 1 mM naatriumasiid, pH 5,0) kiirusega 1% minutis ja voolukiirusega 6 ml minutis, kogudes 12 ml fraktsioonid. Sellest kolonnist kogutud fraktsioonidele teostati SDS PAGE analüüs. Valgud muudeti nähtavaks hõbedaga värvides. Fraktsioonides 25-37 sisalduva geeli puhul on näidatud molekulmassimarker (joonis 2). Fraktsioonid 31 ja 32 sisaldasid valku, mille näiv molekulmass 33 kD vastab IL-17A/F-le.

B. IL-17A/F-i puhastamine

(0387) Neli milliliitrit fraktsioonist 32 (joonis 2) hapestati 0,1% trifluoroäädikhappega, seejärel viidi see voolukiirusega 0,5 ml minutis kolonni Vydac C4, mis oli tasakaalustatud 0,1% trifluoroäädikhappega (puhver C), ning elueeriti gradiendiga kuni 100% puhvrit D (0,1% trifluoroäädikhapet 100% atsetonitriilis), kasutades kolmeastmelist gradienti (0-35% D 10 minutit, 35-50% D 35 minutit, 50-100% D 10 minutit). Joonisel 2 on näidatud elueeritud valkude kromatogramm, mõõdetuna 214 nm ja 280 nm juures. Atsetonitriili astmeline gradient katab kogu profiili. Aminohapete analüüsiga leiti, et valgu kontsentratsioon fraktsioonis 38 oli 0,536 mg/ml. Geelid, blotid, aminohapete järjestuse määramine ja aktiivsuse analüüsid tehti selle fraktsiooniga.

(0388) Fraktsioon 31 ja fraktsiooni 32 järelejäänud maht, mis pärinesid kolonnist HiLoad S Sepharose, ühendati ja dialüüsiti puhvri A vastu 8 tundi, kasutades 10 kD poorisuurusega membraani, ning filtriti läbi 0,2 µm poorisuurusega filtri. Saadud materjal viidi voolukiirusega 1 ml minutis puhvriga A tasakaalustatud kolonni Mono S, ning elueeriti kuni 100% puhvrini B, kasutades kolmeastmelist gradienti (0-35% B 10 kolonnimahtu, 35-75% B 45 kolonnimahtu, 75-100% B 10 kolonnimahtu) ja kogudes 1 ml fraktsioonid. Fraktsioone 26-43 analüüsiti ning aminohapete analüüsiga määrati valgu kontsentratsioonid. Fraktsioonides 31, 32 ja 33 olid kontsentratsioonid vastavalt 0,258, 0,359 ja 0,291 mg/ml. Geelid, blotid, aminohapete järjestuse määramine, massispektrofotomeetria ja aktiivsuse analüüsid teostati peamiselt fraktsioonidega 32 ja 33. Kromatograafiaga tekitatud fraktsioone analüüsiti IL-7 ja IL-17F-i sisalduse suhtes *Western blot* analüüsiga. IL-17 või IL-17F-i vastu suunatud antikeha, mille kontsentratsioon oli 1 µg/ml, kasutati, et tuvastada IL-17 või IL-17F-i esinemist proovides.

IL-17A/F-i massispektromeetriline analüüs

(0389) Kypse IL-17A/F-i aminohapete järjestus ja ahelatevahelised disulfiidsidemed määrati massispektromeetrilise analüüsiga (vaadake joonist 4A; heterodimeer-polüpeptiid IL-17A/F on näidatud koos ahelatevaheliste ja ahelasiseste disulfiidühendustega). Polüpeptiidahelate IL-17 ja IL-17F vahel tuvastati kaks ahelatevahelist disulfiidühendust (vastavalt jäägi 47_{IL-17F} ja jäägi 129_{IL-17} vahel ning jäägi 137_{IL-17F} ja jäägi 33_{IL-17} vahel) (poolpaksud jooned joonisel 4A). Lisaks moodustub kaks ahelasisest disulfiidsidet igas IL-17-homodimeeri polüpeptiidahelas (jääkide 102 ja 152 vahel ning jääkide 107 ja 154 vahel) ning IL-17F-homodimeeri polüpeptiidahelas (jääkide 94 ja 144 vahel ning jääkide 99 ja 146 vahel) (peenikesed mustad jooned joonisel 4A). Aminohapped on nummerdatud kummagi prekursor-polüpeptiidahela algatava metioniini suhtes (joonis 4A). Joonisel 4B on skemaatiliselt näidatud IL-17- ja IL-17F-ahela vahelisi disulfiidsidemeid sisaldavad IL-17A/F-peptiidfragmendid, mis on oodatavad, kui IL-17A/F-i lõigatakse trüpsiiniga (vastavalt on disulfiidsidemega IL-17A/F-fragment nr 1 tähistatud kui SEQ ID NO: 7 ning disulfiidsidemega IL-17A/F-fragment nr 2 on tähistatud kui SEQ ID NO: 8). Nendes fragmentides sisalduvad aminohapped on näidatud ja nummerdatud kummagi ahela algatava metioniini suhtes.

(0390) Fragmentide, mis oleks täheldatavad massispektromeetriaga, arvutuslikud ligikaudsed molekulmassid on näidatud joonisel 4B kui 3410,58 Da ja 2420,05 Da (vastavalt disulfiidsidemega IL-17A/F-fragmendi nr 1 ja nr 2 jaoks). Maatriks-laser-desorptsioonionisatsiooni lennuaja massispektromeetriaga (MALDI-TOF-ga) teostati peptiidide kaardistamine (joonis 4C). Puhvris, mis koosnes 400 mM NaCl, 20 mM NaOAc, pH 5, olevat 55 pmol IL-17A/F-i lõigati üle öö Promega sekveneerimispuhtusega trüpsiiniga. Maatriks-laser-desorptsioonionisatsiooni lennuaja massispektromeetria (MALDI-TOF) teostati viivitatud ekstraheerimisega positiivse iooni peegeldusrežiimis, kasutades 2',4',6'-trihüdroksüatsetofenoon-maatriksit. Saadud peptiidikaart sisaldas piike, mille puhul $(M + H)^+ = 2420,12$ Da fragmendi nr 2 ja 3410,60 Da fragmendi nr 1 jaoks, mis vastavad disulfiidsidemega seotud peptiididele (joonis 4C). Proovi teine alikvoot lõigati pH-väärtusel 8, millele järgnes disulfiidsidemete redutseerimine ditiotreitooliga ja sulfüdrüülrühmade alküülimine jodoatsetamiidiga. Selle proovi MALDI-TOF-spektril nimetatud piigid puudusid, kinnitades nende disulfiidset olemust. Lisaks iseloomustati redutseerimata proovi vedelikukromatograafia-elektropihustusionisatsiooni massispektromeetriaga (LC-ESI-MS-ga) (joonis 4D). Ioonkromatogrammide esindavad (ülalt alla) kogu ioonkromatogrammi, disulfiidsidemega IL-17A/F-fragmendi nr 2 $(M + 2H)^{2+}$ ja disulfiidsidemega IL-17A/F-fragmendi nr 1 $(M + 2H)^{3+}$ rekonstrueeritud ioonkromatogrammi (RIC). Täheldati mõlemale heterodimeerile vastavaid piike, samas kui homodimeersete peptiidide eeldatavate masside kohal ei täheldatud keemilisest müra-st eristuvaid piike, osutades IL-17 ja IL-17F-i homodimeeride puudumisele. Seejärel kinnitati disulfiidsidemetega seotud heterodimeeride koostis tandem-massispektromeetriaga. Topeltlaenguga prekursori kokkupõrkega indutseeritud dissotsieerumine väärtusel m/z 1210,9 vastas IL-17A/F-i disulfiidsidemega fragmendile nr 2 ja väärtusel m/z 1138,0 kolmiklaenguga prekursori puhul vastas see IL-17A/F-i disulfiidsidemega fragmendile nr 1. Vastavas spektris olid täheldatavad b- ja y-iooniseeria fragmentide ennustatud piigid.

Faagikogu skriinimine IL-17A/F-ga seonduvate antikehade suhtes

(0391) IL-17A/F-ga seonduvate antikehade identifitseerimiseks skriiniti sünteetiliste Fab-antikehade faagikogu. Identifitseeriti kolmkümmend neli (34) sõltumatut klooni, mis kodeerisid Fab-antikeha eristuvaid järjestusi, mis olid võimelised vahendama seondumist IL-17A/F-ga. Inimese antikeha järjestuste faagikogu valmistati ja skriiniti antigeenispetsiifiliste

Fab-ide suhtes viisil, mis on sarnane eelnevalt kirjeldatuga (Gerstner, R. B. *et al.*, J. Mol. Biol. 321(5):851-62(2002)). Lühidalt öeldes kasutati faagil esitletava Fab-kogu konstrueerimiseks alusstruktuurina (*scaffold*) humaniseeritud monokloonset antikeha 4D5, mis on HER2-vastane antikeha. Neid Fab-e esitleti faagil monovalentselt või divalentselt, liidetuna homodimeeri moodustava võimega leutsiinihargiga. Kogu paljususe tekitamiseks otsustati randomiseerida pinnal eksponeeritavad raske ahela CDR-jäägid, millel on suur lahknevus ka looduslike antikehade Kabat-andmebaasis ja mis moodustavad piiritletud pinna. Lisaks kasutati kohtsuunatud mutageneesi koodonite plaanipäraselt varieeruvaks muutmiseks, et tekitada aminohapete paljusus, mis jäljendas iga CDR-koha looduslikku immuunrepertuaari. Raske ahela kahe esimese CDR-i, H1 ja H2, puhul võimaldati Herceptin'ile omase pikkusega piiratud paljusust, samas kui H3 puhul kujundati suur varieeruvus pikkusega vahemikus 7 kuni 19. Kõigil antikehadel, mis tekitati algselt valitud kogust, oli identne kerge ahel. Täispika IgG või Fab-i saab tekitada raske ahela varieeruva domeeni üheastmelise kloonimisega vektorisse, millega pakutakse soovitud isotüübi-spetsiifilist konstantse piirkonna järjestust. Raske ahela kogust pärinevate seonduvate liikmete afiinsuse edasiseks parendamiseks võib rakendada teist, kerge ahela CDR-de randomiseerimise etappi. IL-17A/F-ga seonduva Fab-i raske ahela varieeruva domeeni piirkonna, mis sisaldab kolme (3) CDR-i (H1-H3), aminohapete järjestus on näidatud joonisel 6. Näidatud on ennustatud aminohapete järjestusega piirkonna joondus 34 Fab-klooni puhul, mis kodeerivad antikeha raske ahela eristuvaid järjestusi, millel on võime seonduda IL-17A/F-ga. Raske ahela kolm CDR-i, mis on vastavalt näidatud kui CDR-H1, CDR-H2 ja CDR-H3, on viirutatud. Igale kloonile vastab SEQ ID NO tunnus järgmiselt:

kloon nr 1 = SEQ ID NO: 9; kloon nr 2 = SEQ ID NO: 10; kloon nr 3 = SEQ ID NO: 11;
kloon nr 4 = SEQ ID NO: 12; kloon nr 5 = SEQ ID NO: 13; kloon nr 6 = SEQ ID NO: 14;
kloon nr 7 = SEQ ID NO: 15; kloon nr 8 = SEQ ID NO: 16; kloon nr 9 = SEQ ID NO: 17;
kloon nr 10 = SEQ ID NO: 18; kloon nr 11 = SEQ ID NO: 19; kloon nr 12 = SEQ ID NO: 20;
kloon nr 13 = SEQ ID NO: 21; kloon nr 14 = SEQ ID NO: 22; kloon nr 15 = SEQ ID NO:
23; kloon nr 16 = SEQ ID NO: 24; kloon nr 17 = SEQ ID NO: 25; kloon nr 18 = SEQ ID
NO: 26; kloon nr 19 = SEQ ID NO: 27; kloon nr 20 = SEQ ID NO: 28; kloon nr 21 = SEQ ID
NO: 29; kloon nr 22 = SEQ ID NO: 30; kloon nr 23 = SEQ ID NO: 31; kloon nr 24 = SEQ
ID NO: 32; kloon nr 25 = SEQ ID NO: 33; kloon nr 26 = SEQ ID NO: 34; kloon nr 27 =

SEQ ID NO: 35; kloon nr 28 = SEQ ID NO: 36; kloon nr 29 = SEQ ID NO: 37; kloon nr 30 = SEQ ID NO: 38; kloon nr 31 = SEQ ID NO: 39; kloon nr 32 = SEQ ID NO: 40; kloon nr 33 = SEQ ID NO: 41; kloon nr 34 = SEQ ID NO: 42.

(0392) Lisaks on kõigile kolmekümne neljale (34) kloonile vastavad kodeerivad DNA-järjestused näidatud tabelis 7 allpool (vastavalt SEQ ID NO: 43 kuni SEQ ID NO: 76).

Table 7

SEQ ID NO:43:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTAGTGATTCCGCTATACACTGGGTGCGTCAGGCCCCCG
GGTAAGGGCCTGGAATGGGTTGCTGGGATTACTCCTTATAGCGGTTATACTGACTATGCCGATAG
CGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACA
GCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCAAAAGAGGCCCGCGAGGGCTACGACGTC
GGCTACGCTATGGACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:44:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTAGTGATTCCCTATATACACTGGGTGCGTCAGGCCCCCG
GGTAAGGGCCTGGAATGGGTTGCTGAAATTTCTCCTCCTGGCGGCGATACTTACTATGCCGATAG
CGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACA
GCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGTCTCTTGTGCTGGTGGGACGGGGCT
ATGGACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:45:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTACTAATACTTGGATACACTGGGTGCGTCAGGCCCCG
GGTAAGGGCCTGGAATGGGTTGCTGTTATTACTCCTTATGGCGGTGCTACTTACTATGCCGATAG
CGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACA
GCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCAAGAGAGATGTGGAGTAAGTTCGAC
TACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:46:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTAATAGTTCTGCTATACACTGGGTGCGTCAGGCCCCG
GGTAAGGGCCTGGAATGGGTTGTTATATTACTCCTGATAACGGTGATACTAACTATGCCGATAG
CGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACA
GCTTAATAGCTGAGGATACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGCGGCCACGGCAACTTCTACGGTACC
TGGGCGGCTATGGACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:47:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTAGTGGTCTGATATACACTGGGTGCGTCAGGCCCCG
GGTAAGGGCCTGGAATGGGTTGCTTATATTAATCCTTATGGCGGTTCTACTGACTATGCCGATAG
CGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACA
GCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGTGCGTACGAGATGTGGTACGTTATG
GACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:48:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTACTAATTCCTGGATACACTGGGTGCGTCAGGCCCCG
GGTAAGGGCCTGGAATGGGTTGGTGTATTACTCCTTCTAGCGGTTCTACTTACTATGCCGATAG
CGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACA
GCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGTGAGGTCTTCCCCGACATCGGGGAC
TGCAGCAACGCCTACTGCTACGCTATGGACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:49:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTACTAGTACTTATATACACTGGGTGCGTCAGGCCCCG
GGTAAGGGCCTGGAATGGGTTGCTTGGATTTCTCCTTATAGCGGTTATACTGACTATGCCGATAG
CGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACA
GCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGTGAGGTGGGGTGGGGGACTCGTAC
GCTATGGACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:50:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTAGTGGTTCTTGGATACACTGGGTGCGTCAGGCCCCG
GGTAAGGGCCTGGAATGGGTTGCTGGGATTTATCCTTATGACGGTTATACTTACTATGCCGATAG
CGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACA
GCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGTGAGGCCGAGGGCCTGTACCAGTCC
GGGATCTACGACGCGGGTATGGACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:51:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTACTAGTTACTATATACACTGGGTGCGTCAGGCCCCG
GGTAAGGGCCTGGAATGGGTTGCTTGGATTTATCCTGCTGACGGTGCTACTTACTATGCCGATAG
CGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACA
GCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGTGGGTCCTACTTCGGGGGCTACGAT
ATGGACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:52:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTAATGATTCTGATATACACTGGGTGCGTCAGGCCCCG
GGTAAGGGCCTGGAATGGGTTGGTATTATTTATCCTTATGACGGTTATACTTACTATGCCGATAG
CGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACA
GCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCAAGAAGCAACCTGGACAACAACCTTGTT
GACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:53:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTAATGGTACTGGATACACTGGGTGCGTCAGGCCCCG
GGTAAGGGCCTGGAATGGGTTGCTGATATTAATCCTAATGGCGTTCTACTAACTATGCCGATAG
CGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACA
GCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGTGCCTACCGGTGCGGCGGGCTCGCC
GACTGGGCCGCGGGCTATGGACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:54:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTAGTGGTTCTTGGATACACTGGGTGCGTCAGGCCCCG
GGTAAGGGCCTGGAATGGGTTGCTATTACTCCTTCTGGCGGTAATACTGACTATGCCGATAG
CGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACA
GCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGTGAGGTCTTCGCCGTGTCGACCGCC
GGCTACCCCTGGGTTATGGACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:55:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTACTGATTCTTGGATACACTGGGTGCGTCAGGCCCG
GGTAAGGGCCTGGAATGGGTTGGTTCTATTACTCCTTATAACGGTAATACTGACTATGCCGATAG
CGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACA
GCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGCAGGGGGGAGTCCGACGAGGCCTAC
GCCGCGTTATGGACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:56:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTAGTAGTTCGGATATACACTGGGTGCGTCAGGCCCG
GGTAAGGGCCTGGAATGGGTTGGTACTATTAATCCTGCTAGCGGTTCTACTGACTATGCCGATAG
CGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACA
GCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGCGGCCAACAGCAGCTTCTACGCG
CTCCAGTACGTTATGGACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:57:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTACTGATAATTATATACACTGGGTGCGTCAGGCCCG
GGTAAGGGCCTGGAATGGGTTGGTTGGATTTCTCCTTATAGCGGTTATACTTACTATGCCGATAG
CGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACA
GCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGTGAGACCCTCTTCTACGACAAGGAC
CAGTACTCCTACGTTATGGACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:58:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTAGTAGTTCCTTATATACACTGGGTGCGTCAGGCCCG
GGTAAGGGCCTGGAATGGGTTGCTTGGATTTCTCCTTATAGCGGTTATACTGACTATGCCGATAG
CGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACA
GCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGTGAGGGGCTCCTGCGGTGGGGCTAC
GCTATGGACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:59:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTACTGATAATGGGATACACTGGGTGCGTCAGGCCCG
GGGTAAGGGCCTGGAATGGGTTGGTTGGATTACTCCTACTAGCGGTTATACTAACTATGCCGATA
GCGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAAC
AGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGCGACGGGGACACCTGGAAGTGGG
ACGCCCCGTACGTTATGGACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:60:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTACTAATACTTATATACACTGGGTGCGTCAGGCCCCCG
GGTAAGGGCCTGGAATGGGTTGGCTTGGATTTCTCCTTATAGCGGTTATACTGACTATGCCGATAG
CGTCAAGGACCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACA
GCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGCGAGATCTTGCTGGACTACGGTTCC
GCGGGCTACGCTATGGACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:61:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTACTAGTACCTGGATACACTGGGTGCGTCAGGCCCCCG
GGTAAGGGCCTGGAATGGGTTGGTGTATTACTCCTACTAACGGTTCTACTTACTATGCCGATAG
CGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACA
GCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGCGAGGTGTGGTGGTGGGGCGACGGC
CACGGCTACGTTATGGACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:62:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTAGTAGTTCTGCTATACACTGGGTGCGTCAGGCCCCCG
GGTAAGGGCCTGGAATGGGTTGGTGGGATTACTCCTGCTAGCGGTTATACTTACTATGCCGATAG
CGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACA
GCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGCTCGCCCCGCGGGGTGTTCTGTCGAC
GGCGGGGTTATGGACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:63:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTAATAGTACTGATATACACTGGGTGCGTCAGGCCCCCG
GGTAAGGGCCTGGAATGGGTTGGTAGGATTAATCCTTCTGGCGTTCTACTAACTATGCCGATAG
CGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACA
GCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGTACCAGCGCGTACACCACGTGGGGC
GTCGACTGGTTCATCGGCTACGTTATGGACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:64:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTACTGGTTACGGGATACACTGGGTGCGTCAGGCCCCCG
GGGTAAGGGCCTGGAATGGGTTGCTTGGATTTCTCCTTCTAACGGTTATACTTACTATGCCGATA
GCGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAAC
AGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGTCGCGTCAGTACTACGTCTACAG
GCACGACTGGGTCAGGGGCTACGTTATGGACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:65:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTACTGATACCTGGATACACTGGGTGCGTCAGGCCCCG
GGTAAGGGCCTGGAATGGGTTGGTGTATTACTCCTTATGGCGGTTATACTTACTATGCCGATAG
CGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACA
GCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCAAGAGACGGGGGCTTCTTCGATTACTGG
GGTCAA

SEQ ID NO:66:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTAGTGATTCCTCTATACACTGGGTGCGTCAGGCCCCG
GGTAAGGGCCTGGAATGGGTTGCTTTTATTTATCCTACTAGCGGTTCTACTTACTATGCCAATAGC
GTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACAG
CTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCACGTGCCTCGTACGGGGTGAGCAAGTGGA
CCTTTGACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:67:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTACTGGTTACGGGATACACTGGGTGCGTCAGGCCCC
GGGTAAGGGCCTGGAATGGGTTGCTTGGATTTCTCCTTCTAACGGTTATACTTACTATGCCGATA
GCGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCATAACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAAC
AGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGTCGCGTCAGCTACTACGTCTACAG
GCACGACTGGGTCAGGGGCTACGTTATGGACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:68:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTACTGGTACTTATATACACTGGGTGCGTCAGGCCCCG
GGTAAGGGCCTGGAATGGGTTGCTTGGATTTCTCCTTATAGCGGTTATACTAACTATGCCGATAG
CGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACA
GCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCAAGAGAGGCCCGCTCCTCGTTGAGCGCG
GACTACGCTATGGACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:69:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTACTGATAATTATATACACTGGGTGCGTCAGGCCCCG
GGTAAGGGCCTGGAATGGGTTGCTTGGATTTCTCCTTATAGCGGTTATACTTACTATGCCGATAG
CGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACA
GCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGTGAGTCCGGCTTCTCCGCGTGCAAC
ACGCGGGCGTACGCTATGGACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:70:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTACTGATTCTTGGATACACTGGGTGCGTCAGGCCCCG
GGTAAGGGCCTGGAATGGGTTGGTTCTATTACTCCTTATAACGGTAATACTGACTATGCCGATAG
CGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACA
GCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGCAGGGGGAGTCCGACGAGGCCTAC
CCCGCGTTTATGGACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:71:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTACTAGTACCGCTATACACTGGGTGCGTCAGGCCCCG
GGTAAGGGCCTGGAATGGGTTGCTTGGATTACTCCTTATGACGGTTATACTGACTATGCCGATAG
CGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACTAATGAACA
GCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGTACGTGGTTCACGCTGGCCTCGGCT
ATGGAACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:72:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTACTGGTAATGGGATACACTGGGTGCGTCAGGCCCC
GGGTAAGGGCCTGGAATGGGTTGCTTGGATTTCTCTACTAACGGTTCTACTTACTATGCCGATA
GCGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAAC
AGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGTAGGGTCGACTACCAGGTCTACCA
CGACCGCTTCGAGGAGGGGTACGCTATGGACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:73:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTAATAGTTATTGGATACACTGGGTGCGTCAGGCCCCG
GGTAAGGGCCTGGAATGGGTTGGTTGGATTTCTCTGATAACGGTGCTACTAACTATGCCGATAG
CGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACA
GCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGTAAGTTCTGGGGCTGGGACTGGGG
GGTATGGACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:74:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTAGTATTCTTATATACACTGGGTGCGTCAGGCCCCG
GGTAAGGGCCTGGAATGGGTTGGTGATTAATACTCCTACTGACGGTTATACTGACTATGCCGATAG
CGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACA
GCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGTAACTTGATGTGGTGGGACTCGTCG
GCTATGGACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:75:

TTGTCCCTGTGCAGCTTCTGGCTTACCATTAGTGATTCTGGGATACACTGGGTGCGTCAGGCCCC
 GGGTAAGGGCCTGGAATGGGTTGGTTTTATTTATCCTAATGGCGGTTCTACTTACTATGCCGATA
 GCGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAAC
 AGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGTATGTCGTTGATCGGGTTCTCGTA
 CGCTATGGACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:76:

TTGTCCCTGTGCAGCTTCTGGCTTACCATTAATAGTACCTGGATACACTGGGTGCGTCAGGCCCC
 GGGTAAGGGCCTGGAATGGGTTGCTTGGATTAATCCTTATAACGGTTCTACTTACTATGCCGATA
 GCGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAAC
 AGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCAAGAGACTTGTACGACTACGACATCGG
 CTTCGACTACTGGGGTCAA

Rakupõhised analüüsid - IL-17A/F indutseerib IL-8 ja IL-6 tootmise

(0393) Eespool kirjeldatud fraktsioone, mis eraldati kolonniga Vydac C4 puhastamise etapis (joonis 3), analüüsiti IL-17A/F-i võime järgi indutseerida IL-8 tootmist. Fraktsioone testiti, inkubeerides neid TK-10-rakkudega 24 tundi (0,033 µl fraktsiooni ühes milliliitris rakkude kultiveerimiskeskkonnas). Seejärel konditsioneeritud keskkond koguti ja iga fraktsiooni puhul mõõdeti IL-8 ja IL-6 kontsentratsioon ELISA-ga. Leiti, et fraktsioon 38 on tugevalt aktiivne. Aminohapete analüüsiga leiti, et fraktsioonis 38 oli valgu kontsentratsioon 0,536 mg/ml. Geelid, blotid, aminohapete järjestuse määramine ja aktiivsuse analüüsid tehti selle fraktsiooniga (joonis 3). Alternatiivselt ühendati fraktsioon 31 ja fraktsiooni 32 järelejäänud maht, mis pärinesid kolonnist HiLoad S Sepharose, ja dialüüsiti 8 tundi puhvri A vastu, kasutades 10 kD poorisuurusega membraani, ning filtriti läbi 0,2 µm poorisuurusega filtri. Saadud materjal viidi puhvriga A tasakaalustatud kolonni Mono S, kasutades volukii-rust 1 ml minutis, ning elueeriti kuni 100% puhvrini B kolmeastmelise gradiendiga (0-35% B 10 kolonnimahtu, 35-75% B 45 kolonnimahtu, 75-100% B 10 kolonnimahtu), kogudes 1 ml fraktsioonid. Fraktsioone 26-43 analüüsiti ning aminohapete analüüsiga määrati valgu kontsentratsioonid. Puhas IL-17A/F identifitseeriti fraktsioonides 31-33, kui ainus valk näiva molekulmassiga 30-35 kD. Fraktsioonides 31, 32 ja 33 olid kontsentratsioonid vastavalt 0,258, 0,359 ja 0,291 mg/ml. Geelid ja valgu järjestuse analüüs näitas, et see materjal oli identne kolonnis C4 puhastatud IL-17A/F-ga (eespool). Joonisel 5 on näidatud annusest sõltuvad kõverad, kui võrreldi IL-8 ja IL-6 indutseerimist IL-17A/F-i, IL-17 ja IL-17F-ga. Näidatud kontsentratsioonidega IL-17A/F-i, IL-17 ja IL-17F-i inkubeeriti koos TK-10-rakkudega

24 tundi. TK-10-rakkude konditsioneeritud keskkond koguti ja analüüsiti IL-8-ELISA ja IL-6-ELISA-ga.

Arutelu

(0394) IL-17 ja IL-17F-i mRNA-de koos ekspresseerimine toob kaasa uudse valguliigi, mis on võimeline seonduma nii kindlate IL-17-ga seondumise võimega antikehade kui ka kindlate IL-17F-ga seondumise võimega antikehadega, sekreteerimise. See uudne valguliik on siin tähistatud kui interleukiin-17A/F (IL-17A/F). Seda liiki ei täheldata, kui inimese 293-neerurakkudes ekspresseeritakse IL-17 või IL-17F-i eraldi. Transfekteeritud rakkudelt saadud konditsioneeritud keskkond immuunsadestati (IS) antikehadega, mis on võimelised ära tundma IL-17 (rajad 1-5) või IL-17F-i (rajad 6-10), nagu on näidatud joonistel 1A ja 1B. Seejärel lahutati immuunsadestatud valgud *Western blot* analüüsiga, blottides IL-17 (joonis 1A) või IL-17F-i (joonis 1B) vastaste antikehadega. IL-17A/F-i tuvastamine IL-17, mis on dimeerses kompleksis IL-17F-ga, esinemise järgi on näidatud joonise 1A rajal 8 ja joonise 1B rajal 3. Selle liigi molekulmass, mis määrati mitteredutseerivas SDS-PAGE geelis, on ligikaudu 30-35 kD, vastates liigile, mis koosneb ühest IL-17-molekulist ja ühest IL-17F-molekulist, mis on ühendatud kovalentse sidemega. Selle uudse liigi (IL-17A/F-i) esinemist võib tuvastada ka valguna, mille elektroforeetiline liikuvus eristub liikuvusest, mida täheldatakse, kui IL-17 või IL-17F-i ekspresseeritakse eraldi. Sellisena võib seda uut liiki visualiseerida ka antikehasid kasutamata, vaid rakendades muid valgu tuvastamise meetodeid nagu tavapärasel valgus värvimise meetodid.

(0395) Konditsioneeritud keskkonnas esinevate valkude lahutamisel pöördfaasi kromatograafiaga täheldati samuti uudse valguliigi, mille tekitas IL-17 ja IL-17F-i koos ekspresseerimine, esinemist. Võrreldes valgufraktsioone, mida täheldati IL-17 ja IL-17F-i koos ekspresseeritavatest rakkudest sekreteeritud valkude puhul, mustritega, mida täheldati ainult IL-17 või IL-17F-i tootvate rakkude puhul, ilmnes lisavalguliigi esinemine. See valguliik, milleks on IL-17A/F, puhastati ja eraldati kolonnkromatograafiaga homogeensuseeni (joonised 2 ja 3).

(0396) Mitteredutseerivas SDS-PAGE geelis määratuna liikus puhastatud valk ühe ligikaudu 30-35 kD vöödina (joonis 3A). Siiski ilmnes redutseerivates tingimustes kaks selgelt eristuvat vööti, mille näivad molekulmassid olid umbes 15-18 kD (ei ole näidatud). Seega on IL-17A/F kovalentne dimeer. Selle uudse valgu uurimine sõltumatu vahendiga, milleks oli pep-

tiidjärjestuse N-terminaalne analüüs, näitas samuti selgelt, et eraldatud IL-17A/F sisaldab nii IL-17- kui IL-17F-peptiide (joonis 3B). Tuvastatud peptiidjärjestused on identsed IL-17 ja IL-17F-i N-terminaalses otsas sisalduvate järjestustega (joonis 3C). *Western blot* analüüs näitas, et see uudne valguliik on samuti võimeline vastasmõjaks nii antikehaga, millel on võime seonduda IL-17-ga, kui antikehaga millel on võime seonduda IL-17F-ga. Kõik need vaatlused ja uudse eraldatud valgu eristuv molekulmass viitavad, et eraldatud valk IL-17A/F on uudne valguliik, mis koosneb kovalentselt seotud IL-17-st ja IL-17A/F-st.

(0397) Edasi iseloomustati IL-17 ja IL-17F-i siduvate disulfiidsidemete esinemist ja paiknemist, kasutades massispektromeetriat. IL-17A/F-is olevate disulfiidühenduste paiknemine on skemaatiliselt näidatud joonisel 4A. IL-17A/F-is ühendavad IL-17- ja IL-17F-ahelat kaks ahelatevahelist disulfiidsidet. Eeldatavalt tekitaks IL-17A/F-i lõikamine trüpsiiniga kaks eristuvat peptiidfragmenti, mis sisaldavad ahelatevahelisi disulfiidsidemeid (disulfiidsidemega IL-17A/F-fragment nr 1 ja nr 2, vastavalt järjestused SEQ ID NO: 7 ja 8). Need peptiidid on näidatud skemaatiliselt koos vastavate ennustatud molekulmassidega. Neid peptiide täheldati maatriks-laser-desorptsioonionisatsiooni lennuaja massispektromeetria (MALDI-TOF-ga) (joonis 4C) ja vedelikukromatograafia-elektropihustusionisatsiooni massispektromeetriaga (LC-ESI-MS-ga) (joonis 4D). IL-17 või IL-17F-i homodimeerile vastavaid peptiidipiike ei tuvastatud, mis näitab, et puhastatud IL-17A/F koosneb IL-17- ja IL-17F-ahela kovalentsetest heterodimeeridest ning ei sisalda IL-17 või IL-17F-i homodimeere tuvastatavates kogustes.

(0398) Lisaks identifitseeriti sünteetiliste Fab-antikehade faagikogu skriinimisega antikehad, mis seonduvad IL-17A/F-ga. Identifitseeriti kolmkümmend neli (34) sõltumatut klooni, mis kodeerisid Fab-antikeha eristuvaid järjestusi, mis olid võimalised vahendama seondumist IL-17A/F-ga. IL-17A/F-ga seonduva Fab-i raske ahela varieeruva domeeni piirkonna, mis sisaldab kolme (3) CDR-i (H1-H3), aminohapete järjestus on näidatud joonisel 6. Näidatud on 34 Fab-klooni, mis kodeerivad antikeha raske ahela eristuvaid järjestusi, millel on võime seonduda IL-17A/F-ga, ennustatud aminohapete järjestusega piirkonna joondus. Raske ahela kolm CDR-i, mis on vastavalt näidatud kui CDR-H1, CDR-H2 ja CDR-H3, on toodud kollasena. Kõigile kolmekümne neljale (34) kloonile vastavad aminohapete järjestused on identifitseeritud kui SEQ ID NO: 9-42. Lisaks on kõigile kolmekümne neljale (34) kloonile vastavad DNA-järjestused näidatud tabelis 7 allpool (vastavalt SEQ ID NO: 43 kuni SEQ ID NO: 76). Seega identifitseeriti spetsiifilised antikehad, mis seonduvad selektiivselt uudse

heterodimeer-kompleksiga IL-17A/F ning neid võib kasutada selle uudse tsütokiini aktiivsuse moduleerimiseks.

(0399) Kasutades inimese neeurakuliini TK-10, analüüsiti IL-17A/F-i võimet stimuleerida põletikku soodustavat vastust (joonis 5). See rakuliin reageerib nii IL-17 kui IL-17F-le IL-8 tootmisega. IL-17A/F indutseeris samuti võimsalt IL-8 tootmise selles rakuliinis (joonis 5A). On huvipakkuv, et IL-17A/F puhul täheldati unikaalset võimekust, mis erineb nii IL-17 kui IL-17F-i omast. Võrreldes IL-17 ja IL-17F-ga oli aktiivsuse erinevus kõigis katsetes ligikaudu suurusjärg. IL-17A/F-i oluliselt suurem aktiivsus võrreldes IL-17F-ga selles analüüsis viitab, et IL-17A/F võib hõlmata selle tsütokiini aktiivsuse üliolulist koostisosa, mis tuleneb geenisaadusest IL-17F. See unikaalne võimekus võib anda sellele molekulile eristuva ulatusega toimeid *in vivo*. IL-17A/F indutseeris ka IL-6 tootmise selles rakuliinis (joonis 5B). Lisaks on tõenäoline, et uudse heterodimeerse koostise tõttu, mis võib muuta retseptori alamühikute kineetikat ja kasutamist *in vivo*, on IL-17A/F-il lisaomadused, mida ei ole IL-17 ega IL-17F-il, ning nendest võivad tuleneda unikaalsed bioloogilised tagajärjed.

NÄIDE 2

Aktiveeritud T-rakkudes toodetava uudse IL-17-tsütokiini identifitseerimine

(0400) Siin kirjeldatakse esimest korda uudset inimese IL-17-tsütokiini (mis siin on identifitseeritud kui inimese IL-17A/F), kui inimese aktiveeritud T-lümfotsüütides looduslikult toodetavat. Teostati inimese T-lümfotsüütide eraldamine ja aktiveerimine ning IL-17A/F-i tootmine tuvastati ja mõõdeti kvantitatiivselt IL-17A/F-ELISA-ga, nagu on näidatud allpool.

Inimese T-rakkude eraldamine ja aktiveerimine

(0401) Normaalse tervisega doonorist pärinev inimese veri, mis oli värskest kogutud ja hepariiniga (0,5 ml / 50 cm³) töödeldud, lahjendati suhtes 1 : 1 füsioloogilise soolalahusega, kanti seejärel kihina lümfotsüütide eraldamise LSM-keskkonnale (*Lymphocyte Separation Media*) (ICN) ja tsentrifuugiti vastavalt valmistaja soovitusel (ICN). Kogutud mononukleaarsed lümfotsüüdid külvati täielikku RPMI-keskkonda (RPMI, 10% FCS, 2 mM L-glutamiin, penitsiliin/streptomütsiin (GIBCO)) sisaldavatesse koekultuurikolbidesse üheks tunniks 37 °C juurde, et eemaldada monotsüüdid. Järelejäänud rakkude sadestamiseks tseutri-

fuugiti kultuuri supernatante. Seejärel eraldati inimese T-lümfotsüüdid negatiivse selektsiooniga, kasutades CD4⁺ T-rakkude eraldamise komplekti (MACS). Eraldatud T-lümfotsüütide aktiveerimiseks kaeti koekultuurikolvid PBS-is lahustatud CD3-vastase (BD Bioscience) ja CD28-vastase (BD Bioscience) antikehaga, mille kontsentratsioon oli 5 µg/ml, 4 °C juures üle ööks. Pärast katmiskeskonna eemaldamist külvati inimese eraldatud T-lümfotsüüdid täielikku RPMI-keskkonda tihedusega umbes 2 miljonit rakku ühes milliliitris keskkonnas. Pärast külvamist koguti keskkonnast erinevates ajapunktides proove, mida analüüsiti IL-17A/F-i suhtes ELISA-ga. Aktiveerimata kontroll-supernatandid koguti rakkude supernatantidest kolbidest, mida ei kaetud CD3- ja CD28-vastase antikehaga.

CD3-vastase/CD28-vastase antikehaga aktiveeritud inimese T-rakkudes inimese IL-17A/F-i tootmise mõõtmine ELISA-ga

(0402) Inimese IL-17A/F-i tasemeid mõõdeti ELISA-ga. Inimese IL-17-vastane hiire antikeha lahjendati katmispuhvril (0,05 M naatriumkarbonaatpuhver, pH 9,6) ja sellega kaeti 96 süvendiga plaadid (Nunc) 2-8 °C juures 12-15 tunniks. Kõik järgnevad etapid teostati toatemperatuuril. Mittespetsiifiline seondumine tõkestati, tühjendades süvendid ja lisades blokeerimispuhvrit (PBS, 0,5% BSA, 10 miljondikosa Proclin 300). Pärast 1-tunnist inkubeerimist pesti süvendid pesupuhvriga (PBS, 0,05% Tween 20, 10 miljondikosa Proclin 300). Seejärel lisati inimese IL-17A/F-i võrdlusstandardid ja proovid, mis olid lahjendatud analüüsipuhvril (PBS, 0,5% BSA, 0,05% Tween 20, 10 miljondikosa Proclin 300). Pärast 2-tunnist inkubeerimist pesti süvendid pesupuhvriga. Lisati inimese IL-17-i vastane hiire antikeha, mis oli lahjendatud analüüsipuhvril, ning lasti inkubeeruda 1 tund. Pärast plaatide pesemist pesupuhvriga lisati streptavidiin-HRP (mädarõika peroksüdaas) (Amersham), mis oli lahjendatud analüüsipuhvril, ning lasti inkubeeruda 1 tund. Pärast plaatide pesemist pesupuhvriga lisati substraadilahus TMB (tetrametüülbensidiin)peroksüdaas (R&D Systems). Värvuse teke peatati, lisades 2 N väävelhappe. Seejärel loeti plaate mikrotiiterplaadi lugejaga (SLT) 450 nm juures ning lahutades 540 nm juures mõõdetud tausta. Standardkõvera tekitamiseks kasutati nelja parameetri alusel kõvera sobitamise programmi ning kontsentratsioonid proovides tuletati, interpoleerides kõvera lineaarsest osast. Illustreerimaks analüüsi spetsiifilisust, olid ELISA-sse kontrollidena kaasatud IL-17 ja IL-17F.

Tulemused

(0403) IL-17A/F-i tootmise ELISA-mõõtmise tulemused on näidatud joonisel 11. Nende uuringutega näidati uudse tsütokiini IL-17A/F tootmist inimese T-lümfotsüütidest, mis olid aktiveeritud CD3-vastase/CD28-vastase antikehaga, võrreldes inimese aktiveerimata T-rakkudega, milles IL-17A/F-i tootmist ei tuvastatud. Nende tulemustega näidatakse esimest korda uudse tsütokiini, mida toodetakse ja vabastatakse vastusena inimese T-lümfotsüütide aktiveerimisele, looduslikku esinemist. Lisaks näidati selle ELISA-analüüsi spetsiifilisust, täheldades IL-17A/F-i ligikaudu võrdseid koguseid kolmes proovis (nr 31-33), mida analüüsi paralleelselt. Selle IL-17A/F-spetsiifilise ELISA-ga tuvastati IL-17A või IL-17F-i tühistes kogustes (joonis 12).

(0404) Siin näites 1 ja näites 2 kirjeldatud uuringud kujundavad teadmise, et inimese rekombinantne IL-17A/F on uus eraldi tsütokiin, mis eristub inimese IL-17-st ja IL-17F-ist nii valgu struktuurilt kui rakupõhistes aktiivsusanalüüsides. Kasutades standardina inimese puhastatud rekombinantset IL-17A/F-i, töötati välja inimese IL-17A/F-ile spetsiifiline ELISA (näidatud joonisel 11). Kasutades seda spetsiifilist ELISA-t, tuvastati inimese IL-17A/F-i indutseeritud ekspressioon, mis kinnitab, et inimese aktiveeritud T-rakkude kultuuris toodetakse IL-17A/F-i looduslikult. Seega on IL-17A/F eristuvalt uus tsütokiin, mis on tuvastatav inimese eraldatud ja aktiveeritud T-rakkude loodusliku saadusena ning mille rekombinantne vorm, mis on iseloomustatud nii valgu struktuuri järgi kui rakupõhistes analüüsides, on sarnastest tsütokiinidest erinev ja eristuv.

(0405) See uus tsütokiin on võimeline toimima IL-17 aktiivsust *in vivo* moduleerides ning toimides kui IL-17 või teiste sarnaste tsütokiinide seondumiskohtadega konkureeriv inhibiitor. IL-17A/F on võimeline moduleerima ka teiste sarnaste tsütokiinide aktiivsust, reguleerides maha enda ja/või teiste sarnaste tsütokiinide seondumiskohti. IL-17A/F-il võib ilmned a aktiivsus rakusiseste adapterite või signaalmolekulida kaudu, mis toimivad selle või muude sarnaste tsütokiinide aktiivsust mõjutades. IL-17A/F-il on võime mõjutada rakupinnal või rakusiseses ruumis leiduvate retseptorite ja kaasretseptorite paardumist.

(0406) Seega pakutakse ja identifitseeritakse nende uuringutega uudne immunostimulaator (st IL-17A/F), mis võib võimendada immuunsüsteemi vastust konkreetsele antigeenile, mis eelnevalt ei pruugi olla immunoloogiliselt aktiivne. Sellisena on uuena identifitseeritud immunostimulaatoril tähtsaid kliinilisi rakendusi. Identifitseeritud on muid tuntud immunstimu-

laatoreid nagu IL-12 (vaadake üllitist Gubler *et al.*, PNAS 88:4143 (1991)). Hiljutises vähivaktsiini katsetuses lootsid Chicago ülikooli ja geneetika instituudi (Cambridge, MA) teadlased, et IL-12 on immuunstimuleeriv aktiivsus melanoomi raviks (Peterson *et al.*, Journal of Clinical Oncology, 21(12):2342-48 (2003)). Nad ekstraheerisid ringlevad leukotsüüdid, millel oli üks või enam melanoomiraku markerit, eraldasid antigeenid ning viisid need tagasi patsientidesse. Harilikult patsientidel ei oleks immuunvastust nendest endist pärinevate inimese antigeenide suhtes. Seejärel töödeldi patsiente erinevates annustes immuunstimulaatoriga IL-12, mis on võimeline indutseerima dendriitrakkudega kaasstimuleeritud T-rakkude prolifererumist. Tänu IL-12 immuunstimuleerivale toimele olid ravi tulemused paremad võrreldes varasema tööga, mille puhul perifeerse vere mononukleaarsetest rakkudest valmistati patsientide enda dendriitrakud, mida töödeldi antigeeniga, kultiveeriti *in vitro* ja viidi tagasi patsienti, et stimuleerida vähivastast vastust (Turner *et al.*, J. Exp. Med. 190(11):1669-78 (1999)). Samaselt oleks sellel uudsel tsütokiinil IL-17A/F või selle agonistidel praktiline rakendus immuunstimulaatorina. Samas oleks IL-17A/F-i inhibeerivatel molekulidel (antagonistidel) eeldatavalt praktiline rakendus siis, kui soovitakse immuunvastust inhibeerida, näiteks autoimmuunhaiguste korral.

(0407) Seega oleks selle uue tsütokiini vastastel antikehadel, mis jäljendavad (agonist-antikehad) või inhibeerivad (antagonist-antikehad) IL-17A/F-i immunoloogilisi aktiivsusi, raviomadused. Samuti oleks võimalikud ravirakendused väikestel molekulidel, mis toimivad selle uudse tsütokiini aktiivsust inhibeerides.

NÄIDE 3

IL-17A/F-i kasutamine hübriidiseerimissondina

(0408) Järgneva meetodiga kirjeldatakse IL-17A/F-i kodeeriva nukleotiidjärjestuse kasutamist hübriidiseerimissondina.

(0409) Siin avaldatud täispikka või küpset IL-17A/F-i kodeerivat järjestust hõlmavat DNA-d kasutatakse sondina, et skriinida inimese koe cDNA-kogusid või inimese koe genoomseid kogusid homologsete DNA-de suhtes (nagu sellised, mis kodeerivad IL-17A/F-i looduslikult esinevaid variante).

(0410) Ükskõik kumma kogu DNA-sid sisaldavate filtrite hübriidiseerimine ja pesemine teostatakse väga karmides tingimustes. IL-17A/F-ist pärineva radiomärgistatud proovi hübri-

diseerimine filtritega teostatakse 50% formamiidi, 5-kordse SSC, 0,1% SDS-i, 0,1% naatriumpürofosfaadi, 50 mM naatriumfosfaadi, pH 6,8, 2-kordse Denhardti lahuse ja 10% dekstraansulfaadi lahuses 42 °C juures 20 tundi. Filtrite pesemine teostatakse 0,1-kordse SSC ja 0,1% SDS-i vesilahuses 42 °C juures.

(0411) Seejärel saab identifitseerida DNA, millel on järjestuse soovitud samasus täispikka natiivse järjestusega IL-17A/F-i kodeeriva DNA-ga, kasutades tehnika tasemes tuntud standardseid meetodeid.

NÄIDE 4

IL-17A/F ekspressioon *E. coli*'s

(0412) See näide illustreerib IL-17A/F-polüpeptiidide glükosüülimata vormis valmistamist, ekspresseride neid rekombinantselt *E. coli*'s.

(0413) Esmalt amplifitseeritakse IL-17A/F-polüpeptiidi kodeeriv DNA-järjestus, kasutades valitud PCR-praimereid. Praimerid võiksid sisaldada restriктаaside lõikamiskohti, mis vastavad restriктаaside lõikamiskohtadele valitud ekspressioonivektoris. Kasutada võib mitmesuguseid ekspressioonivektoreid. Sobiva vektori näiteks on pBR322 (pärib *E. coli*'st, vaadake üllitist Bolivar *et al.*, Gene, 2:95 (1977)), mis sisaldab ampitsilliini ja tetratsükliini suhtes resistentsust andvaid geene. Vektor lõigatakse restriктаasiga ja defosforüülitakse. Seejärel ligeeritakse vektorisse PCR-ga amplifitseeritud järjestused. Eelistatavalt sisaldab vektor antibiootikumi suhtes resistentsust andvat geeni kodeerivat järjestust, promootorit *trp*, liiderjärjestust polü-His (hõlmates STII esimest kuut koodonit, polü-His-järjestust ja eneteroki-naasi lõikamiskohta), IL-17A/F-polüpeptiidi kodeerivat piirkonda, faagi λ -transkriptsiooni-terminaatorit ja geeni *argU*.

(0414) Seejärel kasutatakse ligeerimissegu *E. coli* valitud tüve transformeerimiseks, kasutades meetodeid, mida on kirjeldatud teoses Sambrook *et al.*, *supra*. Transformandid identifitseeritakse nende võime järgi kasvada LB-plaatidel ning seejärel valitakse antibiootikumi suhtes resistentsed kolooniad. Plasmiidse DNA võib eraldada ja selle õigsust võib kinnitada restriksioonanalüüsi ja DNA sekveneerimisega.

(0415) Valitud kloone võib kasvatada üle öö vedelas kultiveerimiskeskkonnas, nagu LB-puljong, mida on täiendatud antibiootikumidega. Edasi võib üle öö kasvatatud kultuuri kasu-

tada suurema mahuga kultuuri inokuleerimiseks. Seejärel kasvatatakse rakud soovitud optilise tiheduseni, mille saavutamisel liidetakse ekspresseerimiseks kasutatav promotoor.

(0416) Pärast rakkude kultiveerimist veel mõni tund rakud kogutakse tsentrifuugimisega. Tsentrifuugimisega saadud sademe võib lahustada, kasutades erinevaid tehnika tasemes tuntud agenseid, ning lahustuva IL-17A/F-valgu võib seejärel puhastada, kasutades metallikelaatijaga kolonni tingimustes, mis võimaldavad valgu tihedat sidumist.

(0417) Kasutades järgnevat toiminguid võib IL-17A/F-polüpeptiide *E. coli*'s ekspresseerida polü-His-märgistatud vormina. Esmalt amplifitseeritakse IL-17A/F-polüpeptiidi kodeeriv DNA-järjestus, kasutades valitud PCR-praimereid. Praimerid sisaldavad restriктаaside lõikamiskohti, mis vastavad restriктаaside lõikamiskohtadele valitud ekspressioonivektoris, ning muid kasulikke järjestusi, mis võimaldavad translatsiooni tõhusat ja kindlat algatamist, kiiret puhastamist metallikelaatijaga kolonnis ja proteolüütilist eemaldamist enterokinaasiga. Seejärel ligeeritakse PCR-ga amplifitseeritud ja polü-His-märgistatud järjestused ekspressioonivektorisse, mida kasutatakse *E. coli* tüvele 52 (*W3110 fuhA(tonA) Ion galE rpoHts(htpRts) clpP(lacIq)*) põhineva peremeestüve transformeerimiseks. Esmalt kasvatatakse transformante 50 µg/ml karbenitsilliini sisaldavas LB-keskkonnas, loksutades 30 °C juures, kuni 600 nm juures saavutatakse optiline tihedus 3-5. Seejärel lahjendatakse kultuure 50-100 korda CRAP-keskkonnaga (valmistatakse, segades 3,57 g (NH₄)₂SO₄, 0,71 g naatriumtsitraat·2H₂O, 1,07 g KCl, 5,36 g Difco pärmiekstrakti, 5,36 g Sheffieldi Hy-Case™ SF 500 ml vees, ning lisades ka 110 mM MPOS-i, pH 7,3, 0,55% (mass mahu kohta) glükoosi ja 7 mM MgSO₄) ning kasvatatakse, loksutades 30 °C juures ligikaudu 20-30 tundi. Ekspresseerumise kinnitamiseks SDS-PAGE analüüsiga võetakse proovid ning kultuuri põhimaht tsentrifuugitakse rakkude sadestamiseks. Rakusademed külmutatakse puhastamise ja ümbervoltimiseni.

(0418) Poole- kuni üheliitri mahuga fermenteerimisest pärinev *E. coli* mass (6-10 g sadet) resuspendeeritakse 10 mahus (mahtu massi kohta) 7 M guanidiini lahuses 20 mM Tris-puhvril, pH 8. Lisatakse tahke naatriumsulfit ja naatriumtetrationsaat lõppkontsentratsioonides vastavalt 0,1 M ja 0,02 M ning lahust segatakse üle öö 4 °C juures. Selle etapi tulemuseks on denatureerunud valk, milles kõik tsüsteiinijäägid on blokeeritud sulfotioolimisega. Lahust tsentrifuugitakse Beckmani ultratsentrifuugiga kiirusel 40000 pööret minutis 30 minutit. Supernatant lahjendatakse 3-5 mahu metallikelaatijaga kolonni puhvriga (6 M guanidiin, 20 mM Tris, pH 7,4) ja filtritakse selitamiseks läbi 0,22 µm poorisuurusega filtrite. Selitatud ekstrakt viiakse 5 ml mahuga metallikelaatijaga kolonni Qiagen Ni-NTA, mis on tasakaa-

lustatud metallikelaatijaga kolonni puhvriga. Kolonni pestakse lisaks puhvriga, mis sisaldab 50 mM imidasooli (Calbiochem, Utrol-puhtusega), pH 7,4. Valk elueeritakse 250 mM imidasooli sisaldava puhvriga. Soovitud valku sisaldavad fraktsioonid ühendatakse ja säilitatakse 4 °C juures. Valgu kontsentratsiooni hinnatakse neeldumise järgi 280 nm juures, kasutades aminohapete järjestusele põhinevat arvutuslikku ekstinktsioonikoefitsienti.

(0419) Valgud volditakse ümber, lahjendades proovi aeglaselt ümbervoltimis-puhvril, mis valmistatakse värskelt ja mille koostis on järgmine: 20 mM Tris, pH 8,6, 0,3 M NaCl, 2,5 M urea, 5 mM tsüsteiin, 20 mM glütsiin ja 1 mM EDTA. Ümbervoltimise mahud valitakse selliselt, et valgu lõppkontsentratsioon oleks 50-100 µg/ml. Ümbervoltimise lahust segatakse õrnalt 4 °C juures 12-36 tundi. Ümbervoltimis-reaktsioon peatatakse, lisades TFA lõppkontsentratsioonini 0,4% (pH on ligikaudu 3). Enne valgu lõplikku puhastamist filtritakse lahus läbi 0,22 µm poorisuurusega filtri ja lisatakse atsetonitriili lõppkontsentratsioonini 2-10%. Ümbervolditud valk allutatakse kromatograafiale pöördfaasi-kolonnis Poros R1/H, kasutades liikuvat puhvrina 0,1% TFA-d ning elueerimist atsetonitriili 10 kuni 80% gradiendiga. Fraktsioonide, millel ilmneb neelduvus 280 nm juures, alikvoote analüüsitakse SDS-polüakrüülamiidgeelides ning homogeenset ümbervolditud valku sisaldavad fraktsioonid ühendatakse. Üldiselt elueeruvad enamuse valkude õigesti voltunud liigid atsetonitriili väiksematel kontsentratsioonidel, kuna need on kompaktseimad liigid, mille hüdrofoobne sisemus on varjestatud vastasmõju eest pöördfaasi vaiguga. Agregeerunud liigid elueeritakse tavaliselt atsetonitriili suurematel kontsentratsioonidel. Lisaks valesi voltunud vormide lahutamisele soovitud vormist eemaldatakse pöördfaasietapiga ka proovidest endotoksiin.

(0420) Soovitud volditud IL-17A/F-polüpeptiidi sisaldavad fraktsioonid ühendatakse ja atsetonitriil eemaldatakse, kasutades lahusesse suunatud õrna lämmastikujuga. Valgud valmistatakse lahuses, mille koostis on 20 mM Hepes, pH 6,8, ja 0,14 M naatriumkloriidi ja 4% mannitooli, dialüüsidis või geelfiltrides, kasutades valmistamispuhvriga tasakaalustatud vaikusid G25 Superfine (Pharmacia), ning need filtritakse steriilselt.

NÄIDE 5

IL-17A/F-i ekspressioon imetajarakkudes

(0421) Selles näites illustreeritakse IL-17A/F-polüpeptiidide, mis on potentsiaalselt glükosüülitud vormis, valmistamist rekombinantse ekspresseerimisega imetajarakkudes.

(0422) Ekspressioonivektorina kasutatakse vektorit pRK5 (vaaadake üllitist EP 307247, mis on avaldatud 15. märtsil 1989). IL-17A/F-i DNA ligeeritakse valikuliselt vektorisse pRK5, kasutades sobivaid restriktase, et võimaldada IL-17A/F-i DNA sisestamist, kasutades ligeerimismeetodeid, nagu on kirjeldatud teoses Sambrook *et al.*, *supra*. Saadud vektorit nimetatakse pRK5-IL-17A/F.

(0423) Ühes teostuses võivad valitud peremeesrakud olla 293-rakud. Inimese 293-rakke (ATCC CCL 1573) kasvatatakse laatumiseni koekultuuriplaatidel keskkonnas nagu DMEM, mida on täiendatud veise loote seerumi ning valikuliselt toitaine ja/või antibiootikumidega. Umbes 10 µg pRK5-IL-17A/F-DNA-d segatakse umbes 1 µg DNA-ga, mis kodeerib VA-RNA geeni (Thimmappaya *et al.*, Cell, 31:543 (1982)) ning lahustatakse 500 µl lahuses, mille koostis on 1 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, 0,227 M CaCl₂. Sellele segule lisatakse tilkhaaval 500 µl lahust, mille koostis on 50 mM HEPES (pH 7, 35), 280 mM NaCl, 1,5 mM NaPO₄, ning sademel lastakse moodustuda 25 °C juures 10 minutit. Sade suspendeeritakse, lisatakse 293-rakkudele ning lastakse seista 37 °C juures umbes 4 tundi. Kultiveerimiskeskond eemaldatakse aspireerimisega ning 30 sekundiks lisatakse 2 ml 20% glütserooli PBS-is. Seejärel pestakse 293-rakke seerumivaba söötmega, lisatakse värske keskkond ja rakke inkubeeritakse umbes 5 päeva.

(0424) Ligikaudu 24 tundi pärast transfektsioone kultiveerimiskeskond eemaldatakse ja asendatakse (ainult) kultiveerimiskeskonna või 200 µCi/ml ³⁵S-tsüsteiini ja 200 µCi/ml ³⁵S-metioniini sisaldava kultiveerimiskeskonnaga. Pärast 12-tunnist inkubeerimist kogutakse konditsioneeritud sööde, kontsentreeritakse tsentrifuugitava filtriga ning viiakse 15% SDS-geelile. Töödeldud geeli võib kuivatada ja eksponeerida valitud ajavahemiku jooksul filmile, et ilmneks IL-17A/F-polüpeptiidi esinemine. Transfekteeritud rakke sisaldavaid kultuure võib edasi inkubeerida (seerumivabas keskkonnas) ning keskkonda testitakse valitud bioanalüüsides.

(0425) Alternatiivse meetodi kohaselt võib IL-17A/F-i 293-rakkudesse sisestada transientselt, kasutades dekstraansulfaadimeetodit, mida on kirjeldatud üllitises Sompanyrac *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., 12:7575 (1981). 293-rakud kasvatatakse loksutikolvis maksimaalse tiheduseni ja lisatakse 700 µg pRK5-IL-17A/F-i DNA-d. Esmalt kontsentreeritakse loksutikolvist pärinevad rakud tsentrifuugimisega ja pestakse PBS-ga. DNA-dekstraani sadet inkubeeritakse rakusademel 4 tundi. Rakke töödeldakse 20% glütserooliga 90 sekundit, pestakse koekultuurikeskkonnaga ja viiakse tagasi loksutikolbi, mis sisaldab koekultuurikeskkonda,

5 µg/ml veise insuliini ja 0,1 µg/ml veise transferrini. Nelja päeva pärast konditsioneeritud keskkond tsentrifuugitakse ja filtritakse, et eemaldada rakud ja purdaine. Seejärel võib ekspresseerunud IL-17A/F-polüpeptiidi sisaldava proovi kontsentreerida ja puhastada mistahes valitud meetodiga, nagu dialüüs ja/või kolonnkromatograafia.

(0426) Veel ühes teostuses võib IL-17A/F-polüpeptiide ekspresseerida CHO-rakkudes. pRK5-IL-17A/F transfekteeritakse CHO-rakkudesse, kasutades tuntud reagente, nagu CaPO₄ või DEAE-dekstraan. Nagu eespool on kirjeldatud, võib rakukultuure inkubeerida ning asendada keskkonna (ainult) kultiveerimiskeskonna või radiomärgist nagu ³⁵S-metioiin sisaldava kultiveerimiskeskonnaga. Pärast IL-17A/F-polüpeptiidi esinemise määramist võib kultiveerimiskeskonna asendada seerumivaba keskkonnaga. Eelistatavalt inkubeeritakse kultuure umbes 10 päeva ning seejärel konditsioneeritud keskkond kogutakse. Seejärel võib ekspresseerunud IL-17A/F-polüpeptiidi sisaldava keskkonna kontsentreerida ja puhastada mistahes valitud meetodiga.

(0427) Samuti võib peremees-CHO-rakkudes ekspresseerida epitoopmärgistatud IL-17A/F-i. IL-17A/F-i võib kloonida vektorist pRK5. Sisestuse kloonimiseks võib teha PCR-ga, et bakuloviirus-ekspressioonivektorisse sisestamiseks liita lugemisraamiga valitud epitoopmärgis nagu polü-His-märgis. Seejärel võib polü-His-märgisega IL-17A/F-sisestuse kloonida SV40-promootoriga juhitavasse vektorisse, mis stabiilsete kloonide selekteerimiseks sisaldab selektsioonimarkerit nagu DHFR. Lõpuks võib selle SV40-promootoriga juhitava vektoriga transfekteerida CHO-rakke (nagu on kirjeldatud eespool). Ekspresseerumise kinnitamiseks võib teostada märgistamise, nagu on kirjeldatud eespool. Seejärel võib ekspresseerunud ja polü-His-märgistatud IL-17A/F-i sisaldava kultiveerimiskeskonna kontsentreerida ja puhastada mistahes valitud meetodiga nagu Ni²⁺-kelaat-afiinsuskromatograafia.

(0428) IL-17A/F-polüpeptiide võib CHO- ja/või COS-rakkudes ekspresseerida ka transiente ekspresseerimisena või ekspresseerida CHO-rakkudes stabiilse ekspresseerimise mõne muu toiminguga.

(0429) Stabiilne ekspresseerimine CHO-rakkudes teostatakse, kasutades järgnevat toimingut. Valkud ekspresseeritakse IgG-konstruktsioonidena (immunoadhesiinidena), milles vastavate valkude lahustuvaid vorme (näiteks rakuväliseid domeene) kodeerivad järjestused on liidetud IgG₁ konstantse piirkonna järjestusega, mis sisaldab liigend-, CH₁- ja CH₂-domeene, ning/või polü-His-märgistatud vormina.

(0430) PCR-ga amplifitseerimise järel kloonitakse vastavad DNA-d CHO-s ekspresseerimiseks sobivasse vektorisse, kasutades standardseid meetodeid, nagu on kirjeldatud teose Ausubel *et al.*, Current Protocols of Molecular Biology, osas 3.16, John Wiley and Sons (1997). Konstrueeritakse CHO-s ekspresseerimiseks sobivad vektorid, millel on huvipakkuva DNA-ga sobivad 5'- ja 3' restriksioonikohtad, et võimaldada cDNA-de mugavat sisestamist. CHO-s ekspresseerimiseks kasutatavat vektorit on kirjeldatud üllitises Lucas *et al.*, Nucl. Acids Res., 24(9):1774-1779 (1996), ning selles kasutatakse SV40 varajast promootorit/enhanserit huvipakkuva cDNA ekspressiooni juhtimiseks ning dihüdrolaadi reduktaasi (DHFR-i) geeni. DHFR-i ekspresseerimine võimaldab pärast transfekteerimist selekteerida plasmidi stabiilseks säilimiseks.

(0431) Ligikaudu 10 miljonisse CHO-rakku sisestatakse 20 µg soovitud plasmiidset DNA-d, kasutades kaubanduslikult saadavat transfektsioonireagenti Superfect[®] (Qiagen), Dosper[®] või Fugene[®] (Boehringer Mannheim). Rakke kasvatatakse, nagu on kirjeldatud üllitises Lucas *et al.*, *supra*. Ligikaudu 3×10^7 rakku külmutatakse ampullis, et edasi kasvatada ja toota, nagu kirjeldatakse allpool.

(0432) Plasmiidne DNA ampullides sulatatakse, pannes need vesivanni ja segades raputajal. Sisaldised tõstetakse pipetiga 10 ml keskkonda sisaldavasse tsentrifuugituubi ning tsentrifugeeritakse kiirusel 1000 pööret minutis 5 minutit. Supernatant eemaldatakse aspireerides ning rakud suspendeeritakse uuesti 10 ml selektiivses keskkonnas (läbi 0,2 µm pooride filtritud PS20 koos veise loote seerumiga, mis on diafiltritud läbi 0,2 µm pooride). Seejärel rakud alikvooditakse 100 ml loksutikolbi, mis sisaldab 90 ml selektiivset keskkonda. 1-2 päeva pärast kantakse rakud 250 ml loksutikolbi, mis on täidetud 150 ml selektiivse keskkonnaga, ja inkubeeritakse 37 °C juures. Veel 2-3 päeva pärast külvatatakse rakud 250 ml, 500 ml ja 2000 ml loksutikolbidesse tihedusega 3×10^5 rakku/ml. Rakkude keskkond vahetatakse värske keskkonna vastu tsentrifugeerimise ja resuspendeerimisega tootmiskeskkonnas. Kuigi CHO jaoks võib kasutada mistahes sobivat keskkonda, võiks tegelikult kasutada 16. juunil 1992 välja antud US patendis nr 5122469 kirjeldatud tootmiskeskkonda. Kolme liitrise mahuga tootmis-loksutikolbi külvatatakse rakud tihedusega $1, 2 \times 10^6$ rakku/ml. Päeval 0 määratakse rakkude arv ja pH. Esimesel päeval võetakse kolvist proov ning on soovitatav aereerimine filtritud õhuga. Teisel päeval võetakse kolvist proov, temperatuur viiakse 33 °C juurde ning lisatakse 30 ml glükoosilahust kontsentratsiooniga 500 g/l ja 0,6 ml 10% vahuvastast agensit (näiteks 35% polüdimetüülsiloksaani emulsiooni, meditsiinilise puhtusega

emulsiooni firmalt Dow Corning). Tootmise käigus kohandatakse vajadusel pH-väärtust, hoides seda väärtusel umbes 7,2. 10 päeva pärast või kui elumus langeb alla 70%, raku-kultuur kogutakse tsentrifuugimise ja filtrimisega läbi 0,22 µm poorisuurusega filtri. Filtraati säilitatakse 4 °C juures või see viiakse kohe puhastamiskolonnidesse.

(0433) Polü-His-märgistatud konstruktsioonide puhul puhastatakse valgud, kasutades kolonni Ni-NTA (Qiagen). Enne puhastamist lisatakse konditsioneeritud keskkonnale 5 mM imidasooli. Kasutades voolukiirust 4-5 ml minutis 4 °C juures, viiakse konditsioneeritud keskkond 6 ml mahuga kolonni Ni-NTA, mis on tasakaalustatud 0,3 M NaCl ja 5 mM imidasooli sisaldava 20 mM Hepes-puhvriga, pH 7,4. Pärast kolonni viimist pestakse seda jälle tasakaalustamispuhvriga ning valk elueeritakse 0,25 M imidasooli sisaldava tasakaalustamispuhvriga. Järgnevalt vabastatakse see väga puhas valk soolast, viies selle 25 ml mahuga kolonni G25 Superfine (Pharmacia) säilituspuhvrisse, mille koostis on 10 mM Hepes, 0,14 M NaCl ja 4% mannitool, pH 6,8, ning säilitatakse -80 °C juures.

(0434) Immunoadhesiinikonstruktsioonid (Fc-d sisaldavad) puhastatakse konditsioneeritud keskkonnast järgmiselt. Konditsioneeritud keskkond viiakse 5 ml A-valgukolonni, mis on tasakaalustatud 20 mM naatriumfosfaatpuhvriga, pH 6,8. Pärast kolonni viimist ja enne elueerimist 100 mM sidrunhappega, pH 3,5, pestakse kolonni põhjalikult tasakaalustamispuhvriga. Elueeritud valk neutraliseeritakse kohe, kogudes 1 ml fraktsioonid tuubidesse, mis sisaldavad 275 µl 1 M Tris-puhvrit, pH 9. Järgnevalt vabastatakse see väga puhas valk soolast, viies selle säilituspuhvrisse, nagu on kirjeldatud polü-His-märgistatud valkude puhul eespool. Homogeensust hinnatakse SDS-polüakrüülamiidgeelides ning aminohapete N-terminaalse sekveneerimisega, kasutades Edmani lagundamist.

NÄIDE 6

IL-17A/F-i ekspressioon pärmis

(0435) Järgneva meetodiga kirjeldatakse IL-17A/F-polüpeptiidide rekombinantset ekspresseerimist pärmis.

(0436) Esmalt konstrueeritakse ekspressioonivektorid IL-17A/F-i rakusiseseks tootmiseks või sekreteerimiseks, kasutades promootorit ADH2/GAPDH. IL-17A/F-polüpeptiidi kodeeriv ja promootorit sisaldav DNA sisestatakse sobivasse restriksioonikohta valitud plasmiidis, et juhtida IL-17A/F-polüpeptiidi rakusisest ekspressiooni. Sekreteerimiseks võib IL-17A/F-i

kodeeriva DNA kloonida valitud plasmidi koos DNA-ga, mis sisaldab promootorit ADH2/GAPDH ja kodeerib IL-17A/F-i natiivset signaalpeptiidi või muud imetajast pärinevat signaalpeptiidi või näiteks pärmi α -faktori või invertaasi sekreteerimise signaal-/liiderjärjestust ning (vajadusel) linkerjärjestust IL-17A/F-i ekspresseerimiseks.

(0437) Seejärel võib pärmirakke nagu pärmitüvi AB 110 transformeerida eespool kirjeldatud ekspressiooniplasmiididega ning kultiveerida valitud fermenteerimiskeskkonnas. Transformeeritud pärmi supernatante võib analüüsida 10% trikloroäädihappega sadestamise ja lahutamise SDS-PAGE geelis, millele järgneb geelide värvimine Coomassie Blue värviga.

(0438) Järgnevalt võib IL-17A/F-polüpeptiidid eraldada ja puhastada, eemaldades pärmirakud fermenteerimiskeskkonnast tsentrifuugimisega ning kontsentreerides seejärel keskkonna sobivaid padrunfiltreid kasutades. IL-17A/F-polüpeptiidi sisaldavat kontsentraati võib edasi puhastada, kasutades valitud kolonnkromatograafia vaikusid.

NÄIDE 7

IL-17A/F-i ekspressioon bakuloviirusega nakatatud putukarakkudes

(0439) Järgneva meetodiga kirjeldatakse IL-17A/F-polüpeptiidide rekombinantset ekspressiooni bakuloviirusega nakatatud putukarakkudes.

(0440) IL-17A/F-i kodeeriv järjestus liidetakse bakuloviiruse ekspressioonivektoris sisalduva epitoopmärgisega ülesvoolu. Sellised epitoopmärgised hõlmavad polü-His-märgiseid ja immunoglobuliinmärgiseid (nagu IgG Fc-piirkond). Kasutada võib erinevaid plasmide, sealhulgas plasmide, mis pärinevad kaubanduslikult saadavatest plasmiididest nagu pVL1393 (Novagen). Lühidalt öeldes amplifitseeritakse IL-17A/F-i kodeeriv järjestus või IL-17A/F-i kodeeriva järjestuse sobiv osa nagu membraani läbiva valgu rakuvälise domeeni kodeeriv järjestus või, kui see valk on rakuväline, küpset rakku kodeeriv järjestus PCR-ga, kasutades 5'- ja 3'-piirkonnale komplementaarseid praimereid. 5'-praimeris võib olla külgnev (valitud) restriктаasi lõikamiskoht. Seejärel saadus lõigatakse nende valitud restriктаasidega ja kloonitakse ekspressioonivektorisse.

(0441) Rekombinantne bakuloviirus tekitatakse, transfekteerides eespool kirjeldatud plasmidi koos BaculoG-DNA-ga (Pharming) *Spodoptera frugiperda* ("Sf9-") rakkudes (ATCC CRL 1711), kasutades lipofektiini (kaubanduslikult saadav firmast GIBCO-BRL). Pärast 4-5-päevast inkubeerimist 28 °C juures kogutakse vabastatud viirused ja kasutatakse

edasiseks amplifitseerimiseks. Viirusega nakatamine ja valgu ekspresseerimine teostatakse, nagu on kirjeldatud teoses O'Reilley *et al.*, *Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual*, Oxford: Oxford University Press (1994).

(0442) Seejärel võib ekspresseerunud polü-His-märgistatud IL-17A/F-i puhastada näiteks Ni²⁺-kelaat-afiinsuskromatograafiaga, mida kirjeldatakse järgnevalt. Rekombinantse viirusega nakatatud Sf9-rakkudest valmistatakse ekstraktid, nagu on kirjeldatud üllitises Rupert *et al.*, *Nature*, 362:175-179 (1993). Lühidalt, Sf9-rakud pestakse, suspendeeritakse uuesti sonikeerimispuhvril (25 ml Hepes, pH 7,9; 12,5 mM MgCl₂; 0,1 mM EDTA; 10% glütserool; 0,1% NP-40; 0,4 M KCl) ning neid sonikeeritakse jääl 2 korda 20 sekundi jooksul. Sonikeeritud materjal selitatakse tsentrifuugimisega, supernatandist tehakse 50-kordne lahjendus kolonnipuhvril (50 mM fosfaat, 300 mM NaCl, 10% glütserool, pH 7,8) ning filtritakse läbi 0,45 µm poorisuurusega filtri. Valmistatakse 5 ml täidise mahuga kolonn Ni²⁺-NTA-agaros (kaubanduslikult saadav firmast Qiagen), seda pestakse 25 ml veega ja tasakaalustatakse 25 ml kolonnipuhvriga. Filtritid rakuekstrakt viiakse kolonni kiirusega 0,5 ml minutis. Kolonni pestakse kolonnipuhvriga nulljooneni 280 nm juures mõõtmisel ning sellest punktis alustatakse fraktsioonide kogumist. Järgnevalt pestakse kolonni teisese pesupuhvriga (50 mM fosfaat; 300 mM NaCl, 10% glütserool, pH 6,0), milles elueeruvad mittespetsiifiliselt seondunud valgud. Pärast uuesti nulljoone saavutamist 280 nm juures mõõtmisel elueeritakse kolonni 0-500 mM imidasooli gradiendiga teiseses pesupuhvril. Kogutakse 1 ml fraktsioonid ja analüüsitakse SDS-PAGE geeli ja hõbedaga värvimise või *Western blot* analüüsiga, kasutades aluselise fosfataasiga konjugeeritud Ni²⁺-NTA-d (Qiagen). His₁₀-märgistatud IL-17A/F-i sisaldavad elueeritud fraktsioonid ühendatakse ja dialüüsitakse kolonnipuhvri vastu.

(0443) Alternatiivselt võib IgG-märgistatud (või Fc-märgistatud) IL-17A/F-i puhastada, kasutades tuntud kromatograafilisi meetodeid, sealhulgas näiteks kolonnkromatograafiat A-valgu või G-valguga.

NÄIDE 8

IL-17A/F-ga seonduvate antikehade valmistamine

(0444) See näide illustreerib monokloonsete antikehade, mis võivad spetsiifiliselt seonduda IL-17A/F-ga, valmistamist.

(0445) Monokloonsete antikehade tootmise meetodid on tehnika tasemes tuntud ning kirjeldatud näiteks teoses Goding, *supra*. Kasutatavad immunogeenid hõlmavad puhastatud IL-17A/F-polüpeptiide, IL-17A/F-polüpeptiide sisaldavaid liitvalke ja rakupinnal rekombinantseid IL-17A/F-polüpeptiide ekspresseerivaid rakke. Eriala asjatundja võib sobiva immunogeeni valida liigse katsetamiseta.

(0446) Hiiri nagu Balb/c immuniseeritakse täielikus Freundi adjuvandis emulgeeritud IL-17A/F-i immunogeeniga, süstides nahaalusi või kõhuõõnesiseselt 1-100 µg suuruse koguse. Alternatiivselt emulgeeritakse immunogeen adjuvandis MPL-TDM (Ribi Immunochemical Research, Hamilton, MT) ning süstitakse looma jäsemete kääpapatjadesse. Seejärel, 10 kuni 12 päeva hiljem, võimendatakse immuniseeritud hiirtel toimet immunogeeni lisakogusega, mis on emulgeeritud valitud adjuvadis. Seejärel võib mõne nädala jooksul hiirtel võimendada toimet ka immuniseerivate lisasüstidega. IL-17A/F-vastaste antikehade tuvastamiseks võib silmakoopatagusest veenist võtta perioodiliselt seerumiproove, mida testitakse ELISA-analüüsiga.

(0447) Pärast antikeha sobiva tiitri tuvastamist võib antikehade suhtes „positiivseid“ loomadele süstida veeniseselt IL-17A/F-i. Kolm kuni neli päeva hiljem hiired surmatakse ning kogutakse põrnarakud. Seejärel liidetakse põrnarakud (kasutades 35% polüetüleenglükooli) hiire müeloomi valitud rakuliiniga nagu P3X63AgU.1, mis on kättesaadav ATCC-st, nr CRL 1597. Liitumisel tekivad hübriidomirakud, mis võib külvata 96 süvendiga koekultuuriplaattidele, mis sisaldavad HAT-keskkonda (hüpoksantiini, aminopteriini ja tümidiini), et inhibeerida mitteliitunud rakkude, müeloomi hübriidide ja põrnarakkude hübriidide prolifererumist.

(0448) Hübriidomirakke skriinitakse IL-17A/F-vastase reaktiivsuse suhtes ELISA-ga. Soovitud IL-17A/F-vastaseid monokloonseid antikehasid sekreteerivate „positiivsete“ hübriidomirakkude määramine on eriala asjatundjale jõukohane.

(0449) Positiivseid hübriidomirakke võib süstida süngeensetesse Balb/c hiirtesse kõhuõõnesiseselt, et toota IL-17A/F-vastaseid monokloonseid antikehasid sisaldavaid astsiidivedelike. Alternatiivselt võib hübriidomirakke kasvatada koekultuurikolbides või pöörlevates kolbides. Astsiidivedelikes toodetud monokloonsed antikehad võib puhastada, kasutades ammoniumsulfaadiga sadestamist koos järgneva geelkromatograafiaga. Alternatiivselt võib kasutada afiinsuskromatograafiat, mis põhineb antikeha seondumisel A-valgu või G-valguga.

NÄIDE 9

IL-17A/F-polüpeptiidide puhastamine spetsiifilisi antikehasid kasutades

(0450) Natiivseid või rekombinantseid IL-17A/F-polüpeptiide võib puhastada valkude puhastamise mitmesuguste standardsete meetoditega, mis on tehnika tasemes tuntud. Näiteks IL-17A/F-propolüpeptiid, küps IL-17A/F-polüpeptiid või IL-17A/F-eelpolüpeptiid puhastatakse immunoafiinsuskromatograafiaga, kasutades huvipakkuva IL-17A/F-polüpeptiidi suhtes spetsiifilisi antikehasid. Üldiselt konstrueeritakse immunoafiinsuskolonn, sidudes IL-17A/F-polüpeptiidivastase antikeha kovalentselt aktiveeritud kromatograafiavaiguga.

(0451) Polükloonsed immunoglobuliinid valmistatakse immuunseerumist kas sadestades ammoniumsulfaadiga või puhastades immobiliseeritud A-valgul (Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, N. J.). Sarnaselt valmistatakse monokloonsed antikehad hiire astsiivedelikust, sadestades ammoniumsulfaadiga või kromatografeeride immobiliseeritud A-valgule. Osaliselt puhastatud immunoglobuliin seotakse kovalentselt kromatograafiavaiguga nagu CnBr-ga aktiveeritud SEPHAROSE™ (Pharmacia LKB Biotechnology). Antikeha seotakse vaiguga, vaik blokeeritakse ja pestakse vastavalt valmistaja juhistele.

(0452) Sellist immunoafiinsuskoloni kasutatakse IL-17A/F-polüpeptiidi puhastamiseks, valmistades IL-17A/F-polüpeptiidi sisaldavatest rakkudest lahustuva fraktsiooni. Selline valmistamine tuleneb kogu raku või rakuosa fraktsiooni, mis saadakse eristava tsentrifuugimisega, lahustamisest detergendi lisamise või muu tehnika tasemes tuntud meetodiga. Alternatiivselt võidakse signaaljärjestust sisaldavat IL-17A/F-polüpeptiidi kasutatavas koguses sekreteerida keskkonda, milles rakke kasvatatakse.

(0453) Lahustuvat IL-17A/F-polüpeptiidi sisaldav preparaat lastakse läbi immunoafiinsuskoloni ning kolonni pestakse tingimustes, mis võimaldavad IL-17A/F-polüpeptiidi eelistatud absorbeerumist (näiteks kasutades suure ioonjõuga puhvreid detergendi juuresolekul). Seejärel elueeritakse kolonni tingimustes, mis lõhuvad antikeha ja IL-17A/F-polüpeptiidi vahelise sideme (näiteks kasutades madala pH-väärtusega puhvrit, mille pH on ligikaudu 2-3, või kaotroopse aine, nagu urea või tiotsüanaadiioon, kõrget kontsentratsiooni) ning IL-17A/F-polüpeptiid kogutakse.

NÄIDE 10

Ravimite skriinimine

(0454) Käesolev leiutis on eriti kasulik ühendite skriinimiseks, kasutades IL-17A/F-polüpeptiide või nende seonduvaid osasid mistahes erinevates ravimite skriinimise meetodites. Sellisel testimisel kasutatav IL-17A/F-polüpeptiid või -fragment võib olla vabana lahuses, kinnitatud tahkele toendile, olla raku pinnal või paikneda rakusiseselt. Ravimite skriinimise ühe meetodi kohaselt kasutatakse eukarüootseid või prokarüootseid peremeesrakke, mis on stabiilselt transformeeritud IL-17A/F-polüpeptiidi või -fragmenti ekspresseeriva rekombinantse nukleiinhappega. Konkureeriva seondumise analüüsides skriinitakse ravimeid selliste transformeeritud rakkudega. Rakke, mis on elusad või fikseeritud vormis, võib kasutada standardsetes seondumisanalüüsides. Näiteks võib mõõta IL-17A/F-polüpeptiidi või -fragmendi ja testitava agensi vaheliste komplekside moodustumist. Alternatiivselt võib mõõta IL-17A/F-polüpeptiidi ja selle sihtmärkraku või sihtmärkretseptorite vahelise kompleksi moodustumise vähenemist, mida põhjustab testitav ühend.

(0455) Seega pakutakse käesolevas leiutises ravimite või mistahes muude agensite, mis võivad toimida IL-17A/F-polüpeptiidiga seotud haiguse või häire puhul, skriinimise meetodeid. Need meetodid hõlmavad sellise agensi ühendusse viimist IL-17A/F-polüpeptiidi või selle fragmendiga ning (i) agensi ja IL-17A/F-polüpeptiidi või -fragmendi vahelise kompleksi esinemise või (ii) IL-17A/F-polüpeptiidi või -fragmendi ja raku vahelise kompleksi esinemise analüüsimist meetoditega, mis on tehnika tasemes hästi tuntud. Tüüpiliselt on IL-17A/F-polüpeptiid või -fragment sellistes konkureeriva seondumise analüüsides märgistatud. Pärast sobivat inkubeerimist eraldatakse vaba IL-17A/F-polüpeptiid või -fragment seonduv vormist ning vaba või komplekseerumata märgise kogus on IL-17A/F-polüpeptiidiga seondumise või IL-17A/F-polüpeptiidi/raku kompleksi häirimise mõõt konkreetse agensi puhul.

(0456) Veel ühe ravimite skriinimise meetodi kohaselt pakutakse suure läbilaskevõimega skriinimist ühendite suhtes, millel on sobiv seondumisafiinsus mingi polüpeptiididiga, seda meetodit on üksikasjalikult kirjeldatud üllitises WO84/03564, mis on avaldatud 13. septembril 1984. Lühidalt, tahkel substraadil, nagu plastnõelad või mõni muu substraat, sünteesitakse suur arv väikesi peptiidseid testitavaid ühendeid. IL-17A/F-polüpeptiidile kantuna lastakse testitavatel peptiidühenditel reageerida IL-17A/F-polüpeptiidiga ja pestakse. Seonduvad IL-

IL-17A/F-polüpeptiid tuvastatakse tehnika tasemes tuntud meetodiga. Puhastatud IL-17A/F-polüpeptiidi võib ka otse katta plaatidele, et kasutada seda ravimite skriinimise eespool mainitud meetodites. Lisaks võib peptiidi püüdmiseks ja selle tahkele toendile immobiliseerimiseks kasutada mitteneutraliseerivaid antikehasid.

(0457) Leiutise kohaselt peetakse võimalikuks ka ravimite konkureeriva skriinimise analüüside kasutamist, mille kohaselt IL-17A/F-polüpeptiidiga seondumise võimega neutraliseerivad antikehad konkureerivad testitava ühendiga seondumises IL-17A/F-polüpeptiidi või selle fragmentidega. Sellisel viisil võib neid antikehasid kasutada, et tuvastada mistahes peptiidi, millel on IL-17A/F-polüpeptiidiga üks või enam ühist antigeenset determinanti.

NÄIDE 11

Ravimite ratsionaalne kujundamine

(0458) Ravimite ratsionaalse kujundamise eesmärgiks on tekitada huvipakkuva bioloogiliselt aktiivse polüpeptiidi (st IL-17A/F-polüpeptiidi) struktuurseid analooge või väikesi molekule, näiteks agoniste, antagonistide või inhibiitoreid, millega sellel võib olla vastasmõju. Milliseid tahes nendest näidetest võib kasutada, et kujundada ravimeid, milleks on IL-17A/F-polüpeptiidi enam aktiivsed või stabiilsed vormid või sellised, mis võimendavad või häirivad IL-17A/F-polüpeptiidi funktsiooni *in vivo* (*cf.*, Hodgson, Bio/Technology, 9:19-21 (1991)).

(0459) Ühe lähenemise kohaselt määratakse röntgenkristallograafia, arvutiga modelleerimise või, kõige tüüpilisemalt, nende kahe lähenemise kombinatsiooniga IL-17A/F-polüpeptiidi või kompleksi IL-17A/F-polüpeptiid-inhibiitor kolmemõõtmeline struktuur. Struktuuri ja molekuli aktiivse(te) koha (kohtade) väljaselgitamiseks peab kindlaks tegema nii IL-17A/F-polüpeptiidi kuju kui laengud. Vähem tõenäoliselt võib IL-17A/F-polüpeptiidi struktuuri kohta teavet saada modelleerimisega, mis põhineb homoloogsetel valkudel. Mõlemal juhul kasutatakse asjakohast struktuurset teavet, et kujundada analoogseid IL-17A/F-polüpeptiidisarnaseid molekule või selleks, et identifitseerida tõhusaid inhibiitoreid. Ravimite ratsionaalse kujundamise kasulikud näited võivad hõlmata molekule, millel on suurenenud aktiivsus või stabiilsus, nagu on näidatud üllitises Braxton, Wells, Biochemistry, 31:7796-7801 (1992), või mis toimivad natiivsete peptiidide inhibiitorite, agonistide või antagonistidena, nagu on näidatud üllitises Athauda *et al.*, J., Biochem., 113:742-746 (1993).

(0460) Samuti võib sihtmärgispetsiifilise antikeha, mis on valitud eespool kirjeldatud funktsionaalse analüüsiga, eraldada ning seejärel teha kindlaks selle kristallstruktuur. Põhimõtteliselt saadakse sellise lähenemisega ravimi tuumühend (*pharmacore*), millele võib tugineda ravimi järgnev kujundamine. Võimalik on valgu kristallograafia üldse vahele jätta, tekitades funktsionaalse, farmakoloogiliselt aktiivse antikeha vastased idiotüübivastased antikehad (*anti-id-id*). Oleks eeldatav, et idiotüübivastaste antikehade seondumiskoht on peegelpildi peegelpildina algse retseptori analoog. Seejärel võib idiotüübivastast antikeha kasutada, et identifitseerida ja eraldada peptiide keemiliselt või bioloogiliselt toodetud peptiidide pankadest. Seejärel toimiks eraldatud peptiidid ravimi tuumühendina.

(0461) Käesolevast leiutisest tulenevalt võivõib muuta kättesaadavaks IL-17A/F-polüpeptiidi kogused, mis on piisavad, et teostada selliseid analüütilisi uuringuid nagu röntgenkristallograafia. Lisaks annaks siin pakutav teadmine IL-17A/F-polüpeptiidi aminohapete järjestuse kohta juhise rakendamiseks arvutiga modelleerimise meetodites, mida kasutatakse röntgenkristallograafia asemel või sellele lisaks.

PATENDINÕUDLUS

1. Eraldatud nukleiinhappemolekul, millel on

(i) vähemalt 80% nukleiinhappejärjestuse samasus:

(a) nukleotiidjärjestusega, mis kodeerib IL-17A/F-polüpeptiidi, mis koosneb joonisel 3C näidatud järjestusest SEQ ID NO: 3 ja joonisel 3C näidatud järjestusest SEQ ID NO: 4;

(b) nukleotiidjärjestusega, mis kodeerib IL-17A/F-polüpeptiidi, mis koosneb joonisel 3C näidatud järjestusest SEQ ID NO: 3 ja joonisel 3C näidatud järjestusest SEQ ID NO: 4, millel puuduvad nendega seotud signaalpeptiidid;

(c) nukleotiidjärjestusega, mis koosneb joonisel 7 näidatud järjestusest SEQ ID NO: 5 ja joonisel 9 näidatud järjestusest SEQ ID NO: 6; või

(d) nukleotiidjärjestusega, mis koosneb joonisel 7 näidatud järjestuse SEQ ID NO: 5 ja joonisel 9 näidatud järjestuse SEQ ID NO: 6 täispikast kodeerivast järjestusest; või

(ii) mis sisaldab:

(a) nukleotiidjärjestust, mis kodeerib IL-17A/F-polüpeptiidi, mis sisaldab joonisel 3C näidatud järjestust SEQ ID NO: 3 ja joonisel 3C näidatud järjestust SEQ ID NO: 4;

(b) nukleotiidjärjestust, mis kodeerib IL-17A/F-polüpeptiidi, mis sisaldab joonisel 3C näidatud järjestust SEQ ID NO: 3 ja joonisel 3C näidatud järjestust SEQ ID NO: 4, millel puuduvad nendega seotud signaalpeptiidid;

(c) nukleotiidjärjestust, mis sisaldab joonisel 7 näidatud järjestust SEQ ID NO: 5 ja joonisel 9 näidatud järjestust SEQ ID NO: 6; või

(d) nukleotiidjärjestust, mis sisaldab joonisel 7 näidatud järjestuse SEQ ID NO: 5 ja joonisel 9 näidatud järjestuse SEQ ID NO: 6 täispikka kodeerivat järjestust.

2. Eraldatud nukleiinhape vastavalt nõudluspunktile 2, kusjuures nimetatud IL-17A/F-polüpeptiid on kovalentselt seotud heterodimeerne kompleks, mis koosneb järjestustest SEQ ID NO: 3 ja SEQ ID NO: 4.

3. Eraldatud nukleiinhape vastavalt nõudluspunktile 2, kusjuures nimetatud kovalentselt seotud heterodimeerne kompleks sisaldab kahte ahelatevahelist disulfiidsidet järjestuste SEQ ID NO: 3 ja SEQ ID NO: 4 vahel.

4. Eraldatud nukleiinhappemolekul vastavalt nõudluspunktile 1, millel on vähemalt 85% nukleiinhappejärjestuse samasus:

- (a) nukleotiidjärjestusega, mis kodeerib järjestustest SEQ ID NO: 3 ja SEQ ID NO: 4 koosnevat IL-17A/F-polüpeptiidi;
- (b) nukleotiidjärjestusega, mis kodeerib järjestustest SEQ ID NO: 3 ja SEQ ID NO: 4 koosnevat IL-17A/F-polüpeptiidi, millel puuduvad nendega seotud signaalpeptiidid;
- (c) nukleotiidjärjestusega, mis koosneb järjestustest SEQ ID NO: 5 ja SEQ ID NO: 6; või
- (d) nukleotiidjärjestusega, mis koosneb täispikkadest kodeerivatest järjestustest SEQ ID NO: 5 ja SEQ ID NO: 6.

5. Eraldatud nukleiinhappemolekul vastavalt nõudluspunktile 1, millel on vähemalt 90% nukleiinhappejärjestuse samasus:

- (a) nukleotiidjärjestusega, mis kodeerib järjestustest SEQ ID NO: 3 ja SEQ ID NO: 4 koosnevat IL-17A/F-polüpeptiidi;
- (b) nukleotiidjärjestusega, mis kodeerib järjestustest SEQ ID NO: 3 ja SEQ ID NO: 4 koosnevat IL-17A/F-polüpeptiidi, millel puuduvad nendega seotud signaalpeptiidid;
- (c) nukleotiidjärjestusega, mis koosneb järjestustest SEQ ID NO: 5 ja SEQ ID NO: 6; või
- (d) nukleotiidjärjestusega, mis koosneb täispikkadest kodeerivatest järjestustest SEQ ID NO: 5 ja SEQ ID NO: 6.

6. Eraldatud nukleiinhappemolekul vastavalt nõudluspunktile 1, millel on vähemalt 95% nukleiinhappejärjestuse samasus:

- (a) nukleotiidjärjestusega, mis kodeerib järjestustest SEQ ID NO: 3 ja SEQ ID NO: 4 koosnevat IL-17A/F-polüpeptiidi;

- (b) nukleotiidjärjestusega, mis kodeerib järjestustest SEQ ID NO: 3 ja SEQ ID NO: 4 koosnevat IL-17A/F-polüpeptiidi, millel puuduvad nendega seotud signaalpeptiidid;
- (c) nukleotiidjärjestusega, mis koosneb järjestustest SEQ ID NO: 5 ja SEQ ID NO: 6; või
- (d) nukleotiidjärjestusega, mis koosneb täispikkadest kodeerivatest järjestustest SEQ ID NO: 5 ja SEQ ID NO: 6.

7. Eraldatud nukleiinhappemolekul vastavalt nõudluspunktile 1, millel on vähemalt 99% nukleiinhappejärjestuse samasus:

- (a) nukleotiidjärjestusega, mis kodeerib järjestustest SEQ ID NO: 3 ja SEQ ID NO: 4 koosnevat IL-17A/F-polüpeptiidi;
- (b) nukleotiidjärjestusega, mis kodeerib järjestustest SEQ ID NO: 3 ja SEQ ID NO: 4 koosnevat IL-17A/F-polüpeptiidi, millel puuduvad nendega seotud signaalpeptiidid;
- (c) nukleotiidjärjestusega, mis koosneb järjestustest SEQ ID NO: 5 ja SEQ ID NO: 6; või
- (d) nukleotiidjärjestusega, mis koosneb täispikkadest kodeerivatest järjestustest SEQ ID NO: 5 ja SEQ ID NO: 6.

8. Eraldatud nukleiinhappemolekul vastavalt nõudluspunktile 1, mis sisaldab nukleotiidjärjestust, mis kodeerib järjestusi SEQ ID NO: 3 ja SEQ ID NO: 4 sisaldavat IL-17A/F-polüpeptiidi.

9. Eraldatud nukleiinhappemolekul vastavalt nõudluspunktile 1, mis sisaldab nukleotiidjärjestust, mis kodeerib järjestusi SEQ ID NO: 3 ja SEQ ID NO: 4 sisaldavat IL-17A/F-polüpeptiidi, millel puuduvad nendega seotud signaalpeptiidid.

10. Eraldatud nukleiinhappemolekul vastavalt nõudluspunktile 1, mis sisaldab järjestusi SEQ ID NO: 5 ja SEQ ID NO: 6.

11. Eraldatud nukleiinhappemolekul vastavalt nõudluspunktile 1, mis sisaldab täispikki kodeerivaid järjestusi SEQ ID NO: 5 ja SEQ ID NO: 6.

12. Vektor, mis sisaldab nõudluspunktile 1 vastavat nukleiinhappemolekuli.

13. Vektor vastavalt nõudluspunktile 12, mis on toimivalt ühendatud kontrolljärjestustega, mille tunneb ära selle vektoriga transformeeritud peremeesrakk.

14. Peremeesrakk, mis sisaldab nõudluspunktile 12 vastavat vektorit.

15. Peremeesrakk vastavalt nõudluspunktile 14, kusjuures nimetatud rakk on CHO-rakk, *E. coli* rakk, pärmirakk või bakuloviirusega nakatatud putukarakk.

16. IL-17A/F-polüpeptiidi tootmise meetod, mis hõlmab:

(i) nõudluspunktile 14 vastava peremeesraku kultiveerimist nimetatud IL-17A/F-polüpeptiidi ekspresseerimiseks sobivates tingimustes ning nimetatud IL-17A/F-polüpeptiidi kogumist rakukultuurist; või

(ii)

(a) peremeesrakkude transfekteerimist võrdses koguses cDNA ekspressioonivektoritega, mis kodeerivad joonisel 3C näidatud inimese IL-17-polüpeptiidi järjestusega SEQ ID NO: 3 ja joonisel 3C näidatud järjestusega SEQ ID NO: 4; ning

(b) peremeesraku kultiveerimist nimetatud IL-17A/F-polüpeptiidi kompleksi ekspresseerimiseks sobivates tingimustes ja nimetatud IL-17A/F-polüpeptiidi kompleksi kogumist rakukultuurist.

17. Eraldatud polüpeptiid või kompleks, millel on vähemalt 80% aminohapete järjestuse samasus IL-17A/F heterodimeerse kompleksiga, mis koosneb joonisel 3C näidatud järjestusest SEQ ID NO: 3 ja joonisel 3C näidatud järjestusest SEQ ID NO: 4, millel on või puuduvad nendega seotud signaalpeptiidid.

18. Eraldatud polüpeptiid või kompleks vastavalt nõudluspunktile 17, kusjuures nimetatud heterodimeerne kompleks sisaldab kahte ahelatevahelist disulfiidsidet järjestuste SEQ ID NO: 3 ja SEQ ID NO: 4 vahel.

19. Eraldatud polüpeptiid või kompleks vastavalt nõudluspunktile 17, kusjuures aminohapete järjestuse samasuse tase on vähemalt 85%.
20. Eraldatud polüpeptiid või kompleks vastavalt nõudluspunktile 17, kusjuures aminohapete järjestuse samasuse tase on vähemalt 90%.
21. Eraldatud polüpeptiid või kompleks vastavalt nõudluspunktile 17, kusjuures aminohapete järjestuse samasuse tase on vähemalt 95%.
22. Eraldatud polüpeptiid või kompleks vastavalt nõudluspunktile 17, kusjuures aminohapete järjestuse samasuse tase on vähemalt 99%.
23. Eraldatud kompleks vastavalt nõudluspunktile 17, mis on IL-17A/F heterodimeerne kompleks, mis sisaldab järjestusi SEQ ID NO: 3 ja SEQ ID NO: 4, millel puuduvad nendega seotud signaalpeptiidid.
24. IL-17A/F eraldatud heterodimeerne kompleks vastavalt nõudluspunktile 23, mis sisaldab kahte ahelatevahelist disulfiidsidet järjestuste SEQ ID NO: 3 ja SEQ ID NO: 4 vahel.
25. Kimäärne kompleks, mis sisaldab nõudluspunktile 23 vastavat IL-17A/F heterodimeerset kompleksi, mis on liidetud heteroloogse aminohapete järjestusega.
26. Kimäärne kompleks vastavalt nõudluspunktile 25, kusjuures nimetatud heteroloogne aminohapete järjestus on epitoopmärgis või immunoglobuliini Fc-piirkond.
27. Eraldatud antikeha, mis seondub spetsiifiliselt nõudluspunktile 23 või nõudluspunktile 24 vastava IL-17A/F heterodimeerse kompleksiga ning inhibeerib IL-17A/F heterodimeerse kompleksi IL-8 ja IL-6 tootmist indutseerivat aktiivsust.
28. Eraldatud antikeha vastavalt nõudluspunktile 27, kusjuures nimetatud antikeha on monokloonne antikeha, humaniseeritud antikeha või üheaahelaline antikeha.

29. Eraldatud antikeha vastavalt nõudluspunktile 27, kusjuures nimetatud antikeha on monokloonne antikeha, millel on eelistatavalt inimesest erinevat päritolu komplementaarsust määrava piirkonna (CDR-i) jäägid ja inimese raamistikupiirkonna (FR-i) jäägid.

30. Eraldatud antikeha vastavalt nõudluspunktile 27, mis on märgistatud ja immobiliseeritud tahkele toendile.

31. Eraldatud antikeha vastavalt nõudluspunktile 27, kusjuures nimetatud antikeha on antikeha fragment, monokloonne antikeha, üheaheelaline antikeha või idiotüübivastane antikeha.

32. Ainekompositsioon, mis sisaldab:

(a) IL-17A/F-polüpeptiidi või -kompleksi, nagu on määratletud mistahes ühes nõudluspunktidest 17 kuni 24; või

(b) IL-17A/F-vastast antagonist-antikeha, nagu on määratletud mistahes ühes nõudluspunktidest 27 kuni 31;

kombineerituna kandjaga.

33. Ainekompositsioon vastavalt nõudluspunktile 32, kusjuures nimetatud kandja on farmatseutiliselt vastuvõetav kandja.

34. Ainekompositsioon vastavalt nõudluspunktile 32, mis on kasutatav immuunseoselise haiguse ravimiseks imetajal.

35. Ainekompositsioon vastavalt nõudluspunktile 32, mis (a) on võimeline

(i) suurendama T-lümfotsüütide proliferatsiooni imetajal või

(ii) suurendama põletikuga seotud rakkude infiltratsiooni imetaja koesse.

36. Ainekompositsioon vastavalt nõudluspunktile 32, mis (b) on võimeline

- (i) inhibeerima T-lümfotsüütide proliferatsiooni imetajal või
- (ii) vähendama põletikuga seotud rakkude infiltratsiooni imetaja koesse.

37. Ainekompositsioon vastavalt nõudluspunktile 32, mis sisaldab (a) või (b) ravivalt toimivat kogust.

38. Tootmisartikkel, mis hõlmab:

mahuti,
etiketti nimetatud mahutil ning
nõudluspunktile 32 vastavat ainekompositsiooni, mis sisaldub nimetatud mahutis, kusjuures etikett nimetatud mahutil näitab, et nimetatud ainekompositsiooni võib kasutada immuunseoselise haiguse ravimiseks.

39. Mistahes ühes nõudluspunktides 17 kuni 24 määratletud IL-17A/F-polüpeptiidi või -kompleksi kasutamine ravimi valmistamiseks

- (i) immuunseoselise häire ravimiseks;
- (ii) T-lümfotsüütide proliferatsiooni stimuleerimiseks; või
- (iii) põletikuga seotud rakkude koesse infiltreerumise vähendamiseks seda vajaval imetajal.

40. Nõudluspunktis 27 määratletud IL-17A/F-vastase antagonist-antikeha kasutamine ravimi valmistamiseks

- (i) immuunseoselise häire ravimiseks;
- (ii) T-lümfotsüütide proliferatsiooni inhibeerimiseks; või
- (iii) põletikuga seotud rakkude koesse infiltreerumise vähendamiseks seda vajaval imetajal.

41. Kasutamine vastavalt nõudluspunktile 39 või nõudluspunktile 40, kusjuures see immuunseoseline häire on süsteemne erütematoosluupus, reumatoidartriit, osteoartriit, juveniilne

krooniline artriit, spondüloartropaatia, süsteemne sklerooos, idiopaatiline põletikuline müopaatia, Sjörgeni sündroom, süsteemne vaskuliit, sarkoidoos, autoimmuunne hemolüütiline aneemia, autoimmuunne trombotsütopeenia, türeoidiit, diabeet, immuunvahendatud neeruhaigus, kesk- ja perifeerse närvisüsteemi demüeliniseeriv haigus, idiopaatiline demüeliniseeriv polüneuropaatia, Guillaini-Barré'i sündroom, krooniline põletikuline demüeliniseeriv polüneuropaatia, maksa-sapihaigus, nakkuslik või autoimmuunne krooniline aktiivne hepatiit, esmane sapitsirroos, granulomatoosne hepatiit, skleroseeruv kolangiit, põletikuline soolehaigus, gluteenitundlik enteropaatia, Whipple tõbi, autoimmuunne või immuunvahendatud nahahaigus, naha villtõbi, mitmekujuline erüteem, kontaktdermatiit, psoriaas, allergiline haigus, astma, allergiline nohu, atoopiline dermatiit, toidu suhtes ülitundlikkus, nõgestõbi, immunoloogiline kopsuhaigus, eosinofiilne kopsupõletik, idiopaatiline kopsufibroos ja ülitundlikkusega seotud kopsupõletik, siirdamisega seotud haigus, transplantaadi hülgamine või transplantaadi peremehevastane haigus.

42. Kasutamine vastavalt nõudluspunktile 41, kusjuures põletikuline soolehaigus on haavandiline koliit.

43. Kasutamine vastavalt nõudluspunktile 39 või nõudluspunktile 40, kusjuures nimetatud põletikuga seotud rakud on mononukleaarsed rakud, eosinofiilid või polümorfotuumised neutrofiilid (PMN-id).

44. Meetod mistahes ühes nõudluspunktides 17 kuni 24 määratletud IL-17A/F-polüpeptiidi või –kompleksi esinemise tuvastamiseks proovis, mille kohta arvatakse, et see sisaldab nimetatud polüpeptiidi, nimetatud meetod hõlmab nimetatud proovi eksponeerimist IL-17A-vastasele antikehale ja IL-17F-vastasele antikehale ning nimetatud antikehade seondumise määramist nimetatud proovi koostisosaga.

45. Immuunseoselise haiguse diagnoosimise meetod imetajal, nimetatud meetod hõlmab:

- (a) IL-17A-vastase antikeha ja IL-17F-vastase antikeha ühendusse viimist testitava prooviga, mis on saadud nimetatud imetajalt;

- (b) antikehade ja mistahes ühes nõudluspunktides 17 kuni 24 määratletud IL-17A/F-polüpeptiidi või –kompleksi vahelise kompleksi moodustumise määramist testitavas proovis;
- (c) testitavas proovis moodustunud kompleksi koguse võrdlemist moodustunud kompleksi kogusega tuntud normaalse koe sama rakutüübiga rakkude kontrollproovis;

kusjuures moodustunud kompleksi suurem kogus testitavas proovis näitab immuunseoselise haiguse esinemist imetajal, kellelt saadi testitavad koerakud.

46. Meetod, et identifitseerida ühend, mis inhibeerib mistahes ühes nõudluspunktides 17 kuni 24 määratletud IL-17A/F-polüpeptiidi või -kompleksi aktiivsust, nimetatud meetod hõlmab rakkude, mis harilikult reageerivad nimetatud polüpeptiidile, ühendusse viimist (a) nimetatud polüpeptiidi ja (b) kandidaatühendiga ning nimetatud rakul (a) suhtes reaktsiooni puudumise määramist.

47. Meetod, et identifitseerida ühend, mis inhibeerib mistahes ühes nõudluspunktides 17 kuni 24 määratletud IL-17A/F-polüpeptiidi või -kompleksi ekspressiooni rakkudes, mis harilikult ekspresseerivad seda polüpeptiidi, sealjuures see meetod hõlmab rakkude ühendusse viimist testitava ühendiga ning määramist, kas IL-17A/F-polüpeptiidi või –kompleksi ekspressiooni inhibeeritakse.

48. Meetod vastavalt nõudluspunktile 47, kusjuures nimetatud kandidaatühend on antisenss-nukleinhape.

49. Meetod ühendi, mis jäljendab mistahes ühes nõudluspunktides 17 kuni 24 määratletud IL-17A/F-polüpeptiidi või -kompleksi aktiivsust, identifitseerimiseks, nimetatud meetod hõlmab rakkude, mis harilikult reageerivad nimetatud polüpeptiidile, ühendusse viimist kandidaatühendiga ning nimetatud raku nimetatud kandidaatühendile reageerimise määramist.

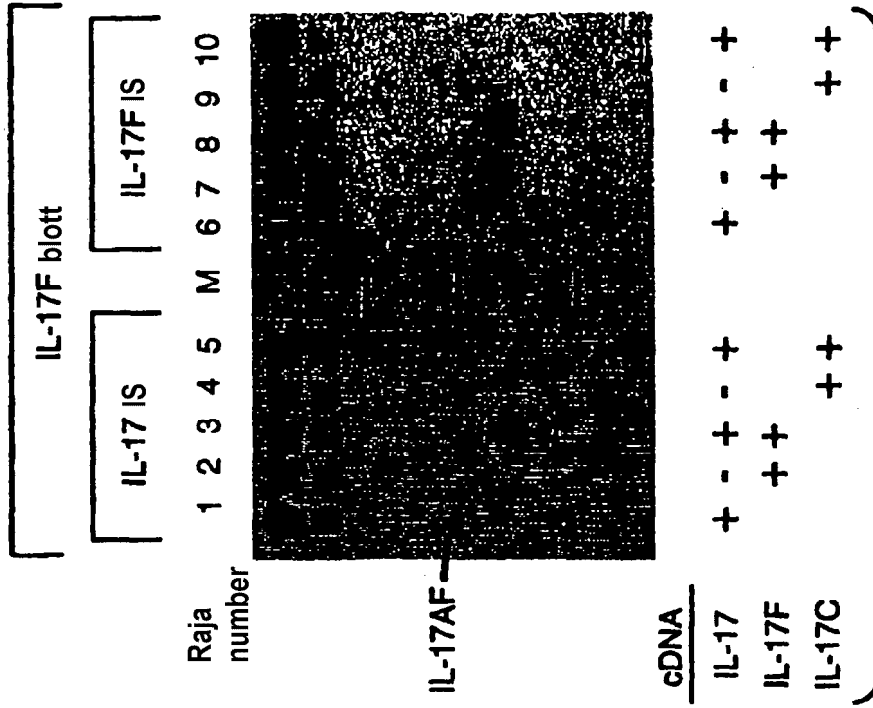


FIG. 1B

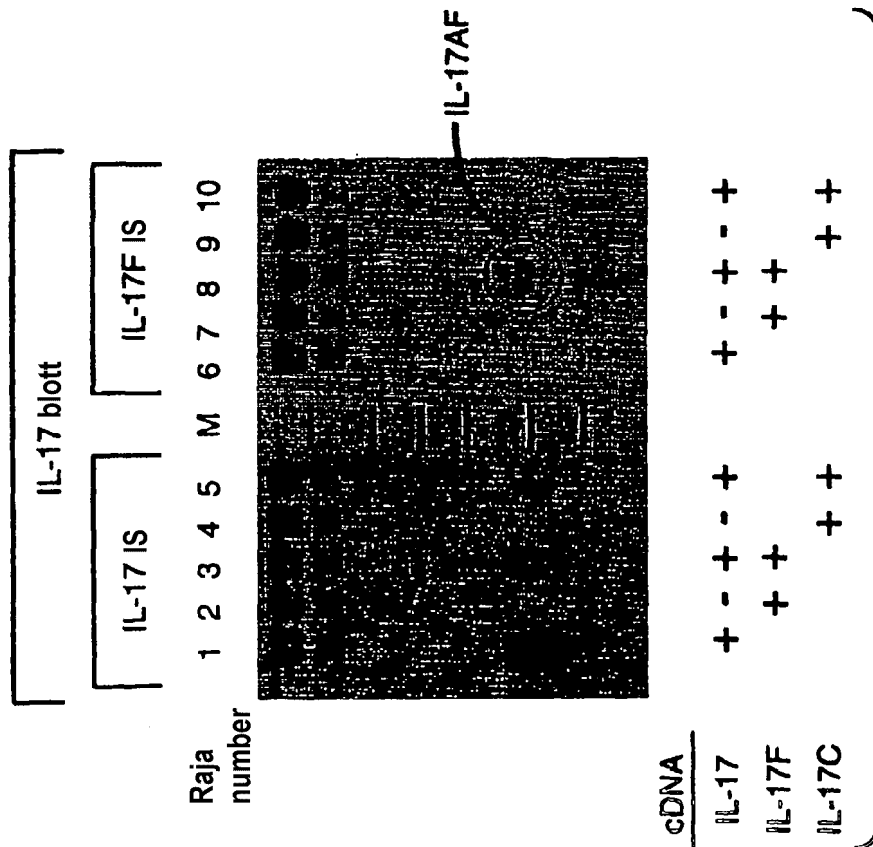


FIG. 1A

S-Sepharose kolonnist pärinevate valgufraktsioonide hõbedaga värvitud SDS-PAGE geelid

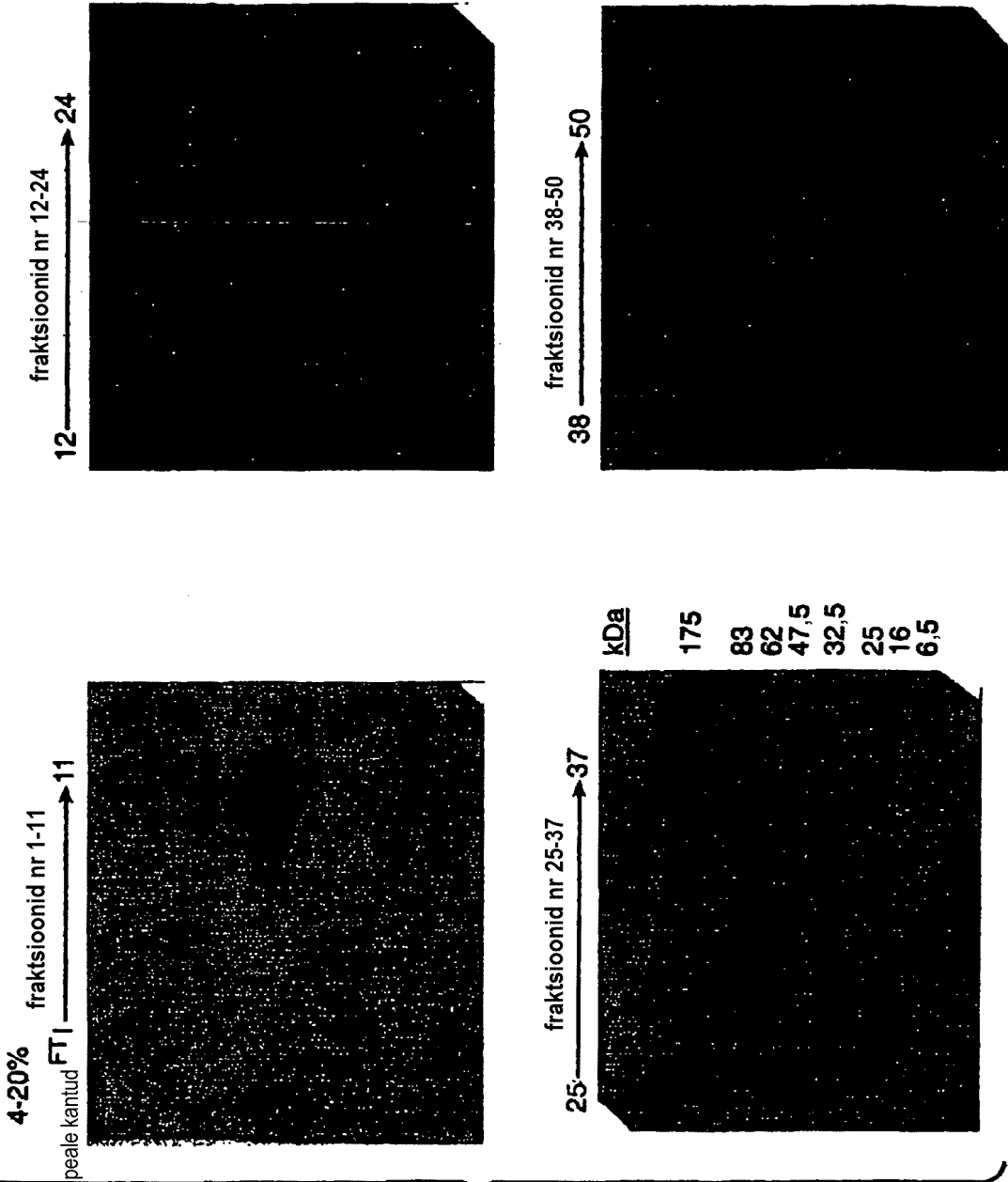


FIG. 2A

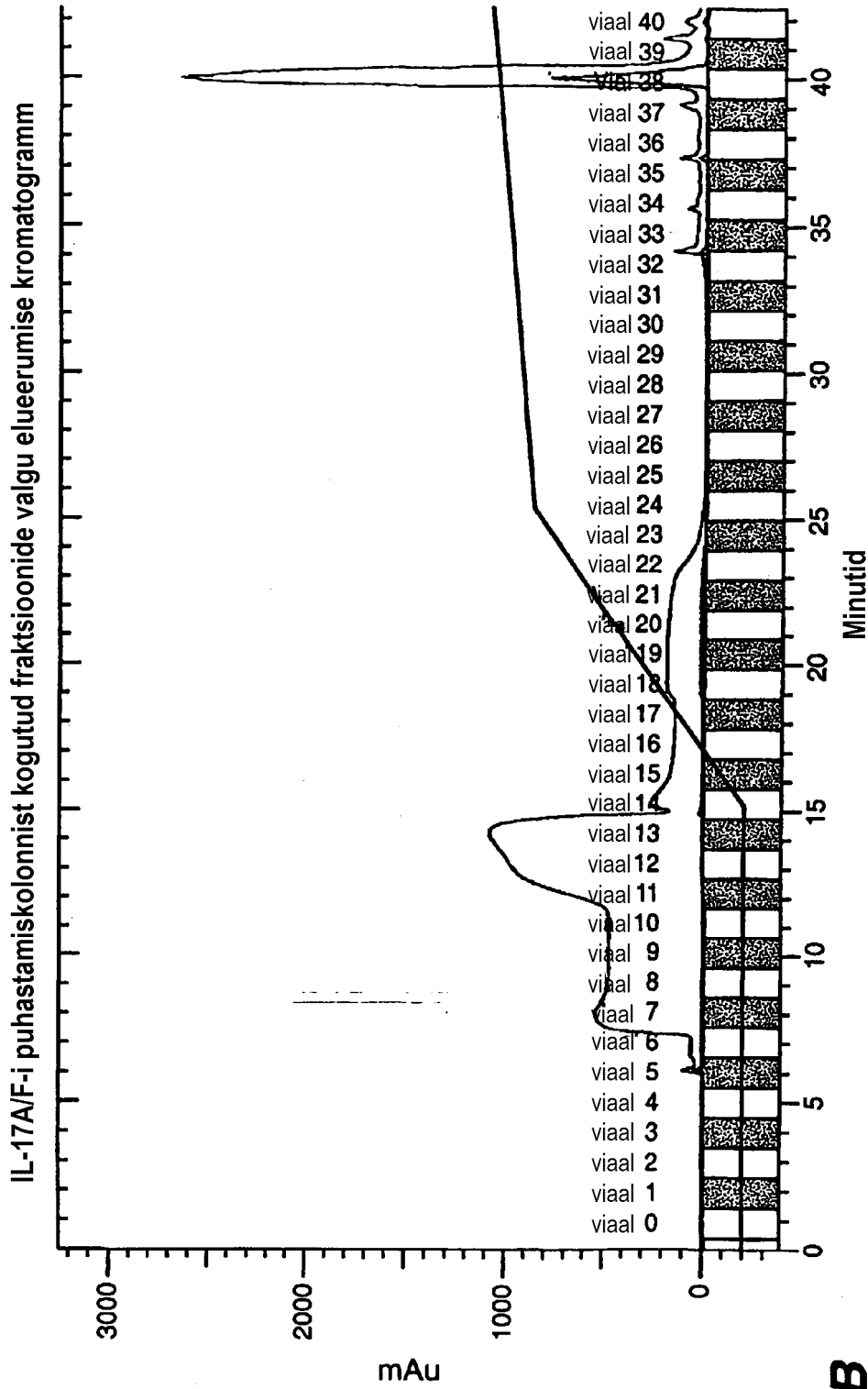


FIG..2B-1

FIG..2B

FIG..2B-1 FIG..2B-2

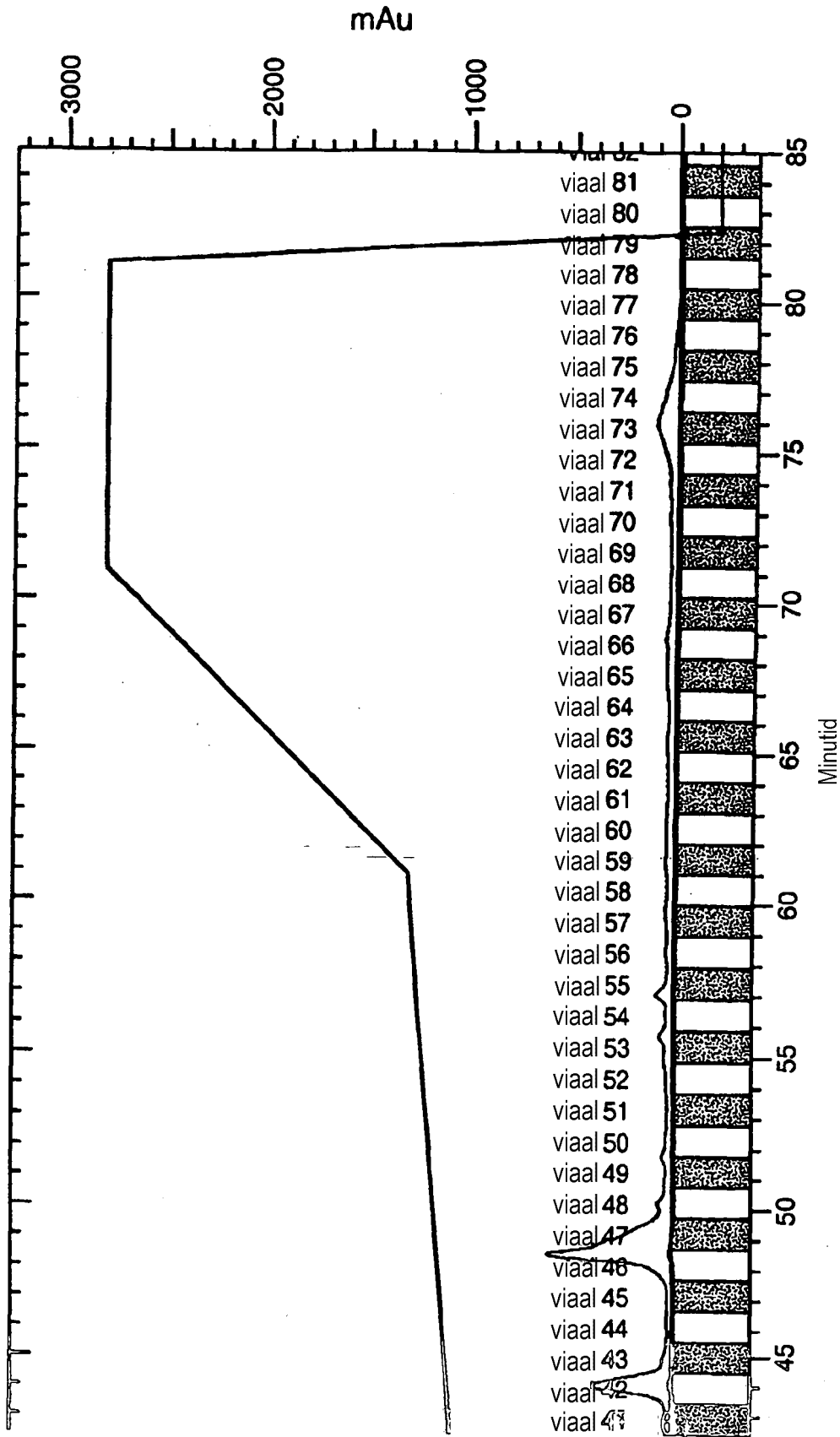


FIG.-2B-2

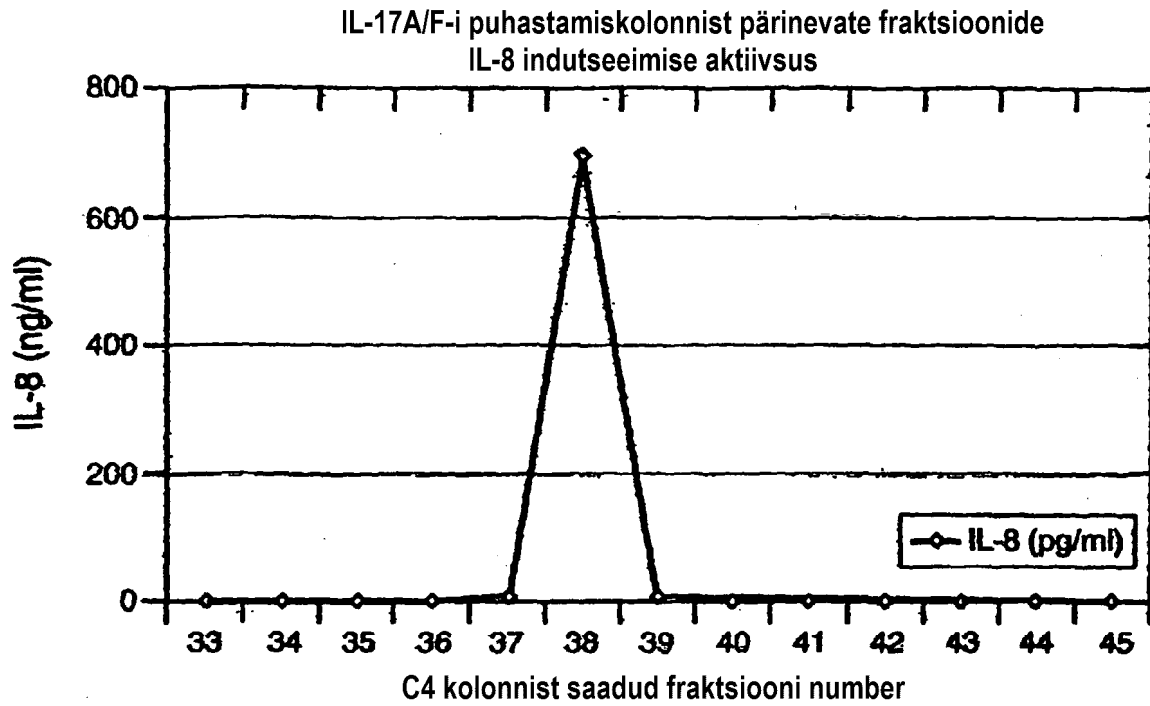


FIG. 2C

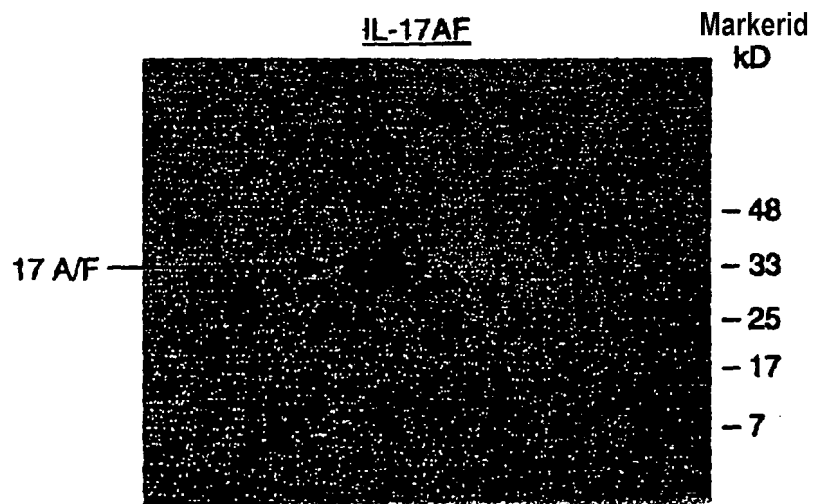


FIG. 3A

Sekvencerimise tulemus												
SEQ ID NO:	1 / 3	2 / 4	3 / 5	4 / 6	5 / 7	6 / 8	7 / 9	8 / 10	9 / 11	10 / 12	11 / 13	12 / 14
tsükkel/käik	G	I	T	I	P	R	N	P	G	C	P	N
järjestus 1	11,353	16,037	6,719	16,620	10,757	3,563	4,106	8,529	4,488	0,076	7,599	3,502
järjestus 2	R	K	I	P	K	V	G	H	T	F	(F)	Q
SEQ ID NO:2	16,186	3,857	25,186	6,655	2,679	7,060	2,385	3,082	2,395	3,263	7,163	4,522

FIG._3B

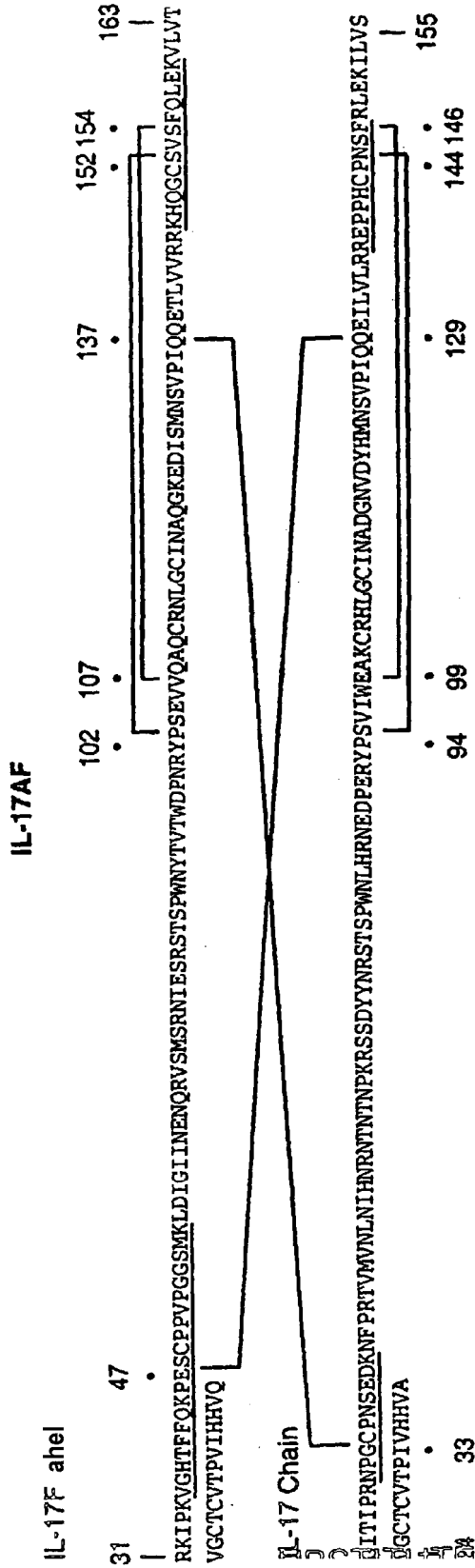
IL-17

MTPGKTSLVSLLLLSLEAIVKAGITIPRNPGCPNSEDKNFPRFTVMVNLNIHNRNTNTN
PKRSSDYNRSTSPWNLHRNEDPERYPSVIWEAKCRHLGCINADGNVDYHMNSVPIQQEI
LVLRRPPhCNPSPFRLEKILVSVGCTCVTPIVHVA (SEQ ID NO:3)

IL-17F

MTVKT LHGPAMVKYLLLSILGLAFLSEAAAARKIPKVGHTTFFQKPESCPFPVPGGSMKL
DIGIINENQVRVMSRNIESRSTSPWNYTVTWDPNRYPSEVVQAQRNLGCINAQGGEDISM
NSVPIQOETLVVRRKHQGCVSFQLEKVLVTVGCTCVTPVIHVQ (SEQ ID NO:4)

FIG._3C



IL-17A/F sisaldab kahte ahelatevahelist disulfiidsidet:

IL-17F-ahela tsüsteiniijäägi 47 ja IL-17-ahela tsüsteiniijäägi 129 vahel

IL-17F-ahela tsüsteiniijäägi 137 ja IL-17-ahela tsüsteiniijäägi 33 vahel

FIG.- 4A

8/17

IL-17A/F disulfididemega fragment nr 1

VGHTFFQKPEESCPPVPGGSMK (IL-17F-ahela trüpsiiniga lõikamisel tekkiva peptiidi aminohapped 36-56)
 |
 EPPHCPSFR (IL-17-ahela trüpsiiniga lõikamisel tekkiva peptiidi aminohapped 125-134)

monoisotoopne $[M+H]^+ = 3410.58$ Da

IL-17A/F disulfididemega fragment nr 2

HQGSVSFQLEK (IL-17F-ahela trüpsiiniga lõikamisel tekkiva peptiidi aminohapped 134-145)
 |
 NPGCPNSEDK (IL-17-ahela trüpsiiniga lõikamisel tekkiva peptiidi aminohapped 30-39)

monoisotoopne $[M+H]^+ = 2420.05$ Da



FIG. 4B

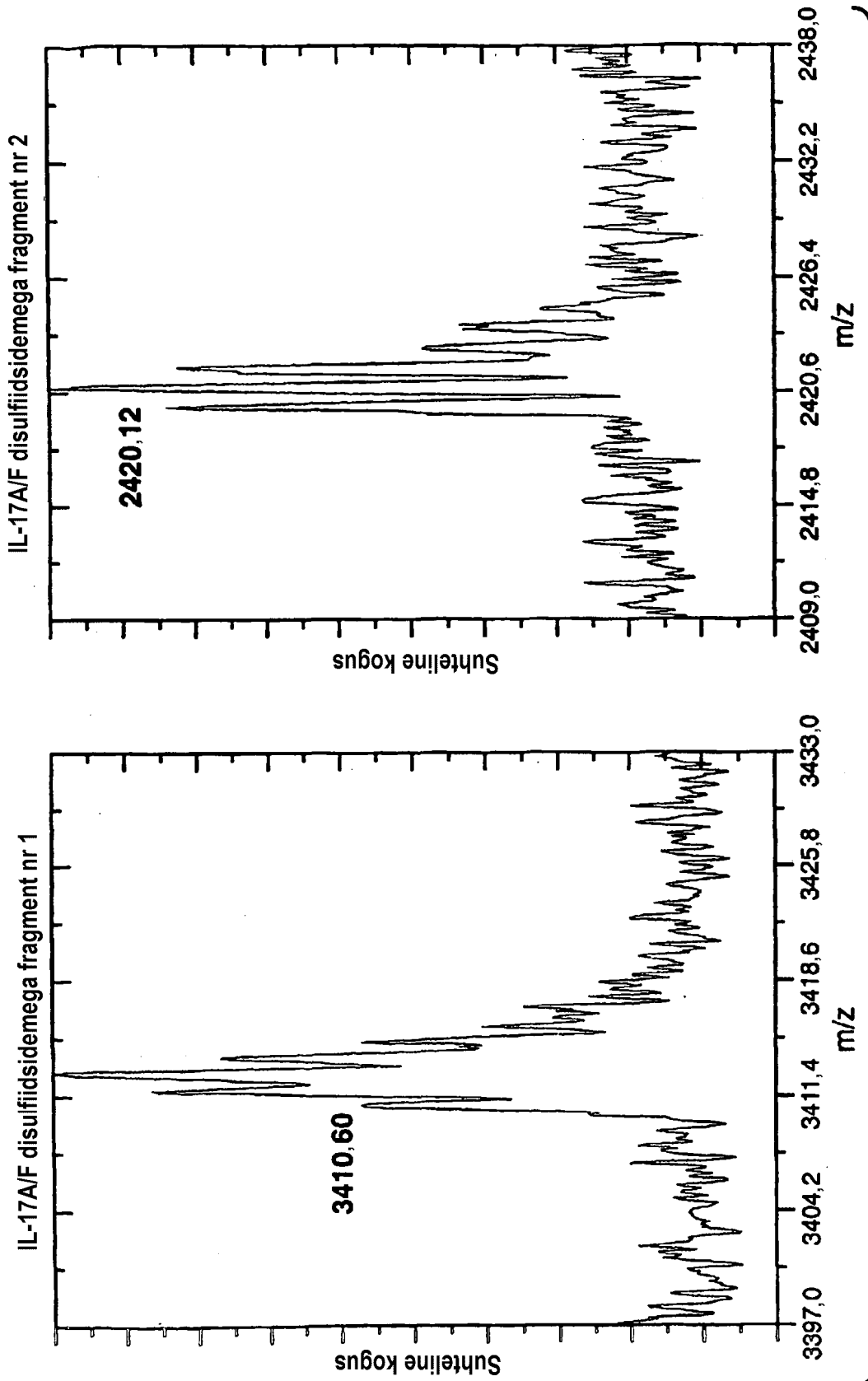


FIG._4C

10/17

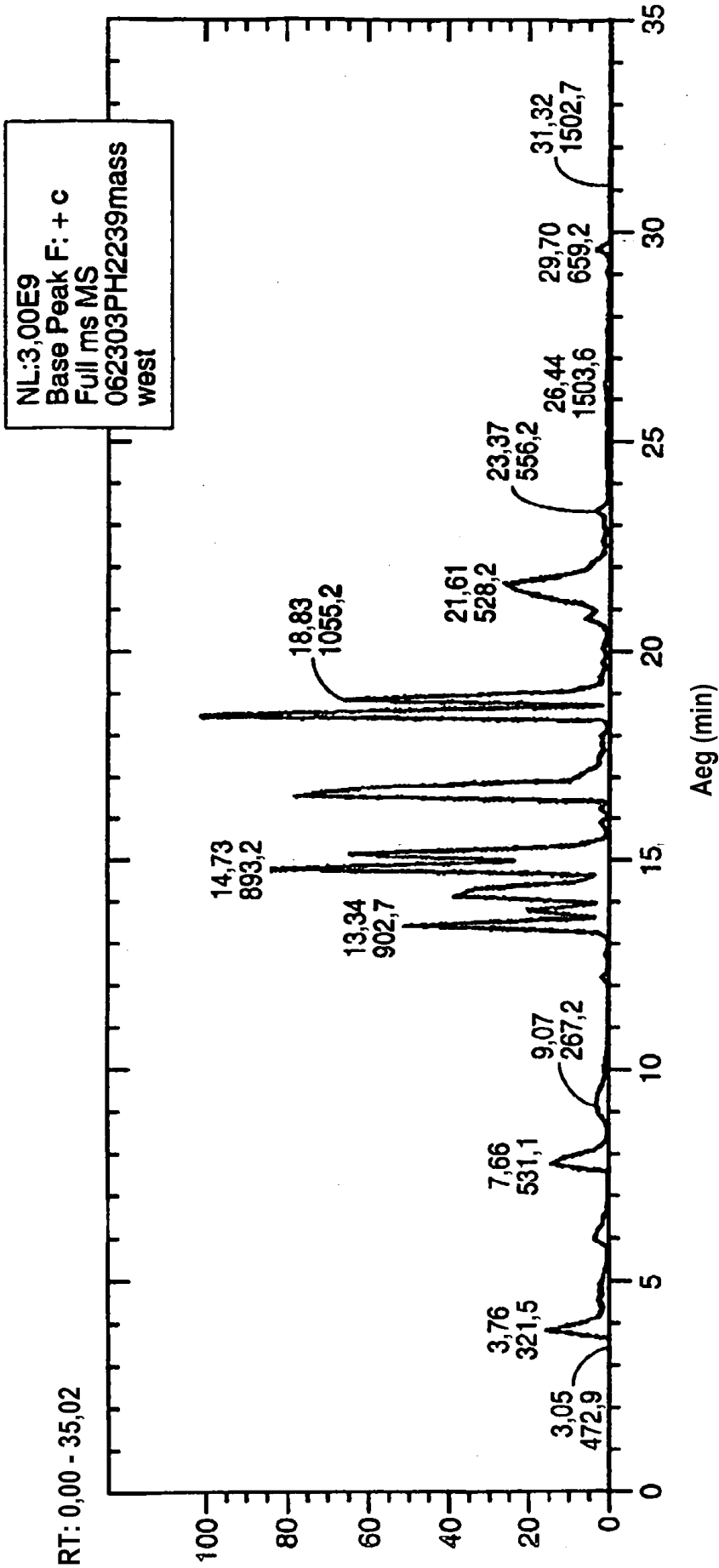


FIG..4D-1

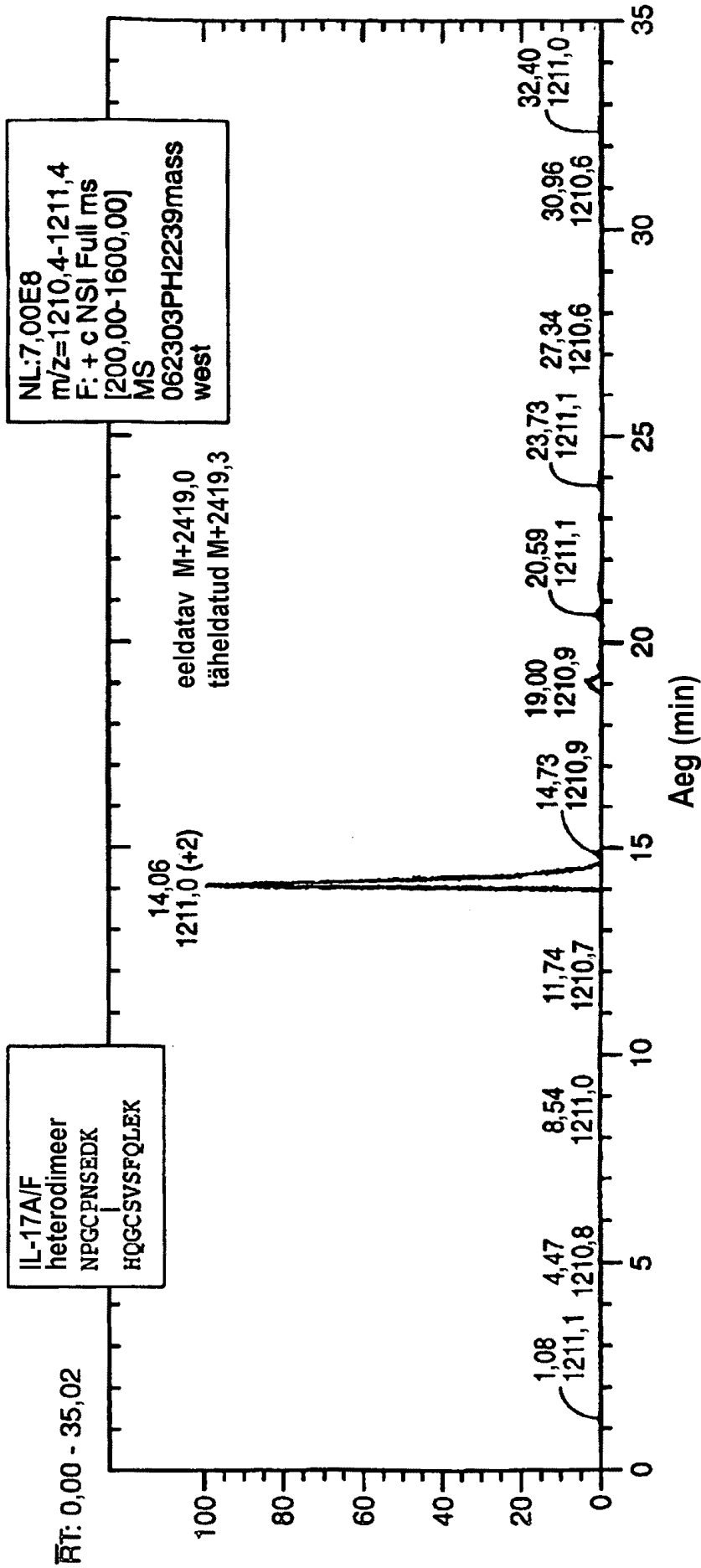


FIG.-4D-2

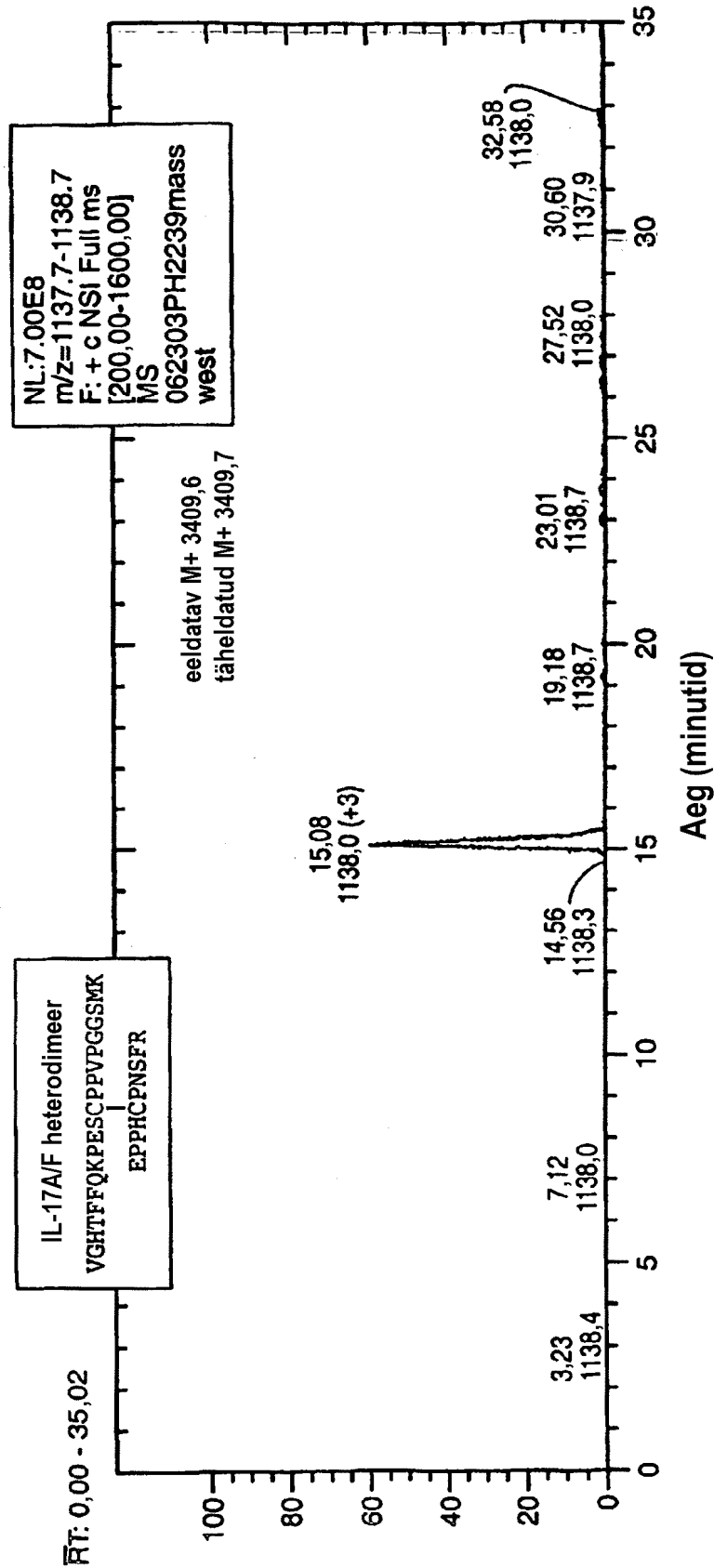


FIG. 4D-3

IL-17A/F-i IL-8 indutseeriva aktiivsuse annusest sõltuv vastus:
eristuv võimekus võrreldes IL-17 ja IL-17F-ga

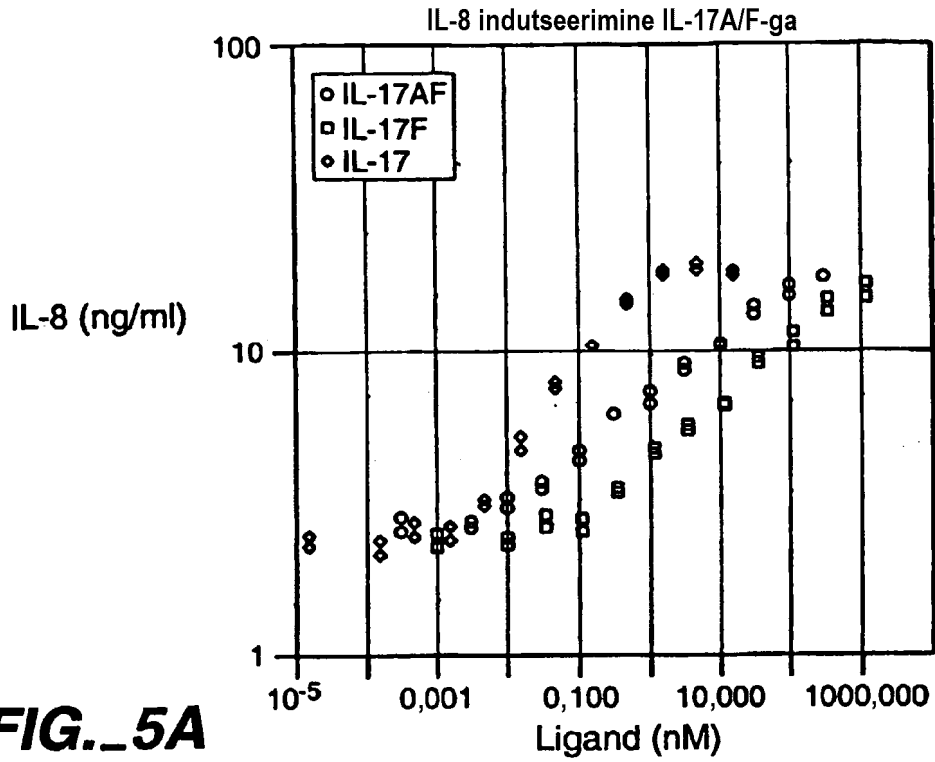


FIG._5A

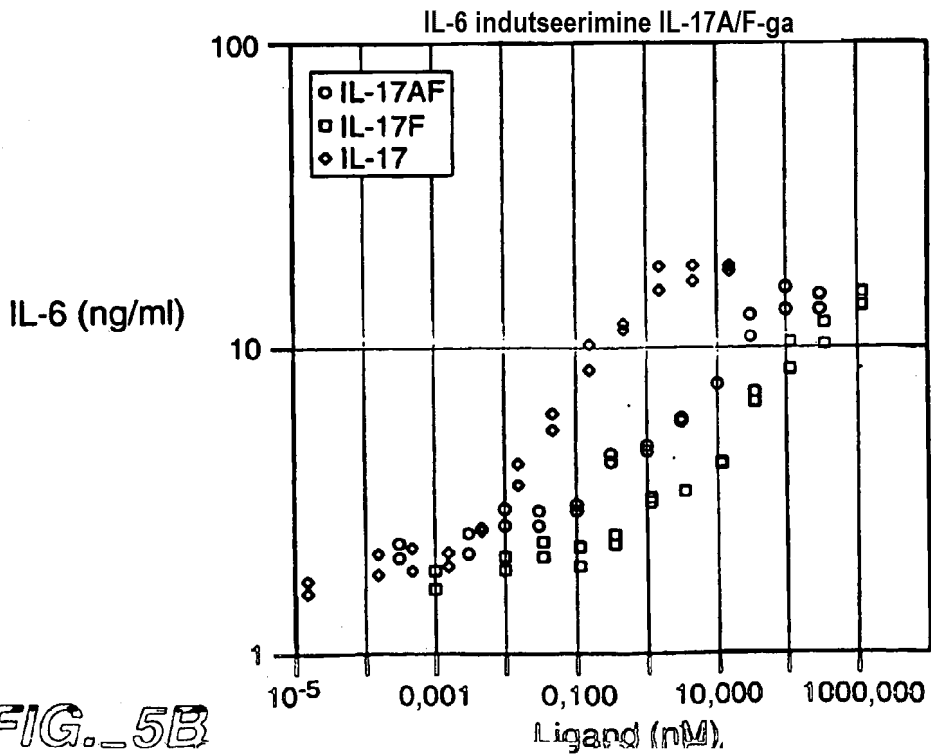


FIG._5B

Raske ahela varieeruva piirkonna aminohapete järjestuse ala, mis sisaldab CDR H1-H3 IL-17A/F-iga seonduvast Fab-ist

Kloon nr	CDR-H1	CDR-H2	CDR-H3
1	LSCAASGFTISDSAIEHWVRQAPGKGLEWVAGITPYSGYTDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCAKEAREGYDVGYAMDYWGQ		
2	LSCAASGFTISDSYIEHWVRQAPGKGLEWVAEISPPGGDYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCARLLWWDGAMDYWGQ		
3	LSCAASGFTITNTYIEHWVRQAPGKGLEWVAVITPYGGAJYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCARESMWSKFDYWGQ		
4	LSCAASGFTINSYIEHWVRQAPGKGLEWVGYITPDNGDNYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCARAGHGNFYGTWAAAMDYWGQ		
5	LSCAASGFTISGDIHWVRQAPGKGLEWVAIYINPYGGSJYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCARAYEMWYVMDYWGQ		
6	LSCAASGFTITNSYIEHWVRQAPGKGLEWVGVITPSSGSIYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCARFVPPDIGDCSNAYCIYAMDYWGQ		
7	LSCAASGFTITSYIEHWVRQAPGKGLEWVAWISPYSGYTDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCARFVPPDIGDCSNAYCIYAMDYWGQ		
8	LSCAASGFTISGWIHWVRQAPGKGLEWVAGIYPYDGYTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCARAEAGLYQSGIYDAGMDYWGQ		
9	LSCAASGFTITSYIEHWVRQAPGKGLEWVAWIYPADGATYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCARGSYFGGYDMDYWGQ		
10	LSCAASGFTINDSDIHWVRQAPGKGLEWVGLIYPYDGYTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCARSNLDNLFYWGQ		
11	LSCAASGFTINGYIEHWVRQAPGKGLEWVADINPNGGSTNYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCARAYRCGGGLADWAGAMDYWGQ		
12	LSCAASGFTISGWIHWVRQAPGKGLEWVAIITPSSGNTDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCARFVAVSTAGYFWVMDYWGQ		
13	LSCAASGFTITDSYIEHWVRQAPGKGLEWVGSITPYNGNTDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCARFVAVSTAGYFWVMDYWGQ		
14	LSCAASGFTISSDIHWVRQAPGKGLEWVGVITPSSGNTDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCARFVAVSTAGYFWVMDYWGQ		
15	LSCAASGFTITDNYIEHWVRQAPGKGLEWVWISPYSGYTDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCARFVAVSTAGYFWVMDYWGQ		
16	LSCAASGFTISSYIEHWVRQAPGKGLEWVAWISPYSGYTDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCARFVAVSTAGYFWVMDYWGQ		
17	LSCAASGFTITDNGIHWVRQAPGKGLEWVWITPSSGTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCARFVAVSTAGYFWVMDYWGQ		
18	LSCAASGFTITNYIEHWVRQAPGKGLEWVAWISPYSGYTDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCARFVAVSTAGYFWVMDYWGQ		
19	LSCAASGFTITWYIEHWVRQAPGKGLEWVWITPSSGTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCARFVAVSTAGYFWVMDYWGQ		
20	LSCAASGFTISSYIEHWVRQAPGKGLEWVWISPYSGYTDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCARFVAVSTAGYFWVMDYWGQ		
21	LSCAASGFTITNSYIEHWVRQAPGKGLEWVWISPYSGYTDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCARFVAVSTAGYFWVMDYWGQ		
22	LSCAASGFTITGWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYSGYTDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCARFVAVSTAGYFWVMDYWGQ		
23	LSCAASGFTITDNYIEHWVRQAPGKGLEWVWISPYSGYTDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCARFVAVSTAGYFWVMDYWGQ		
24	LSCAASGFTISDSSYIEHWVRQAPGKGLEWVAIYIPYSGYTDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCARFVAVSTAGYFWVMDYWGQ		
25	LSCAASGFTITGWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYSGYTDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCARFVAVSTAGYFWVMDYWGQ		
26	LSCAASGFTITDNYIEHWVRQAPGKGLEWVAWISPYSGYTDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCARFVAVSTAGYFWVMDYWGQ		
27	LSCAASGFTITDSSYIEHWVRQAPGKGLEWVAWISPYSGYTDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCARFVAVSTAGYFWVMDYWGQ		
28	LSCAASGFTITDSSYIEHWVRQAPGKGLEWVAWISPYSGYTDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCARFVAVSTAGYFWVMDYWGQ		
29	LSCAASGFTITSTYIEHWVRQAPGKGLEWVAWISPYSGYTDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCARFVAVSTAGYFWVMDYWGQ		
30	LSCAASGFTITGWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYSGYTDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCARFVAVSTAGYFWVMDYWGQ		
31	LSCAASGFTITNSYIEHWVRQAPGKGLEWVWISPYSGYTDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCARFVAVSTAGYFWVMDYWGQ		
32	LSCAASGFTISDSSYIEHWVRQAPGKGLEWVWISPYSGYTDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCARFVAVSTAGYFWVMDYWGQ		
33	LSCAASGFTITDSSYIEHWVRQAPGKGLEWVWISPYSGYTDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCARFVAVSTAGYFWVMDYWGQ		
34	LSCAASGFTITNSYIEHWVRQAPGKGLEWVAWISPYSGYTDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCARFVAVSTAGYFWVMDYWGQ		

FIG.- 6

GCAGGCACAAACTCATCCATCCCAGTTGATTGGAAGAAACAACGATGACTCCTGGGAAG
ACCTCATTGGTGTCACTGCTACTGCTGCTGAGCCTGGAGGCCATAGTGAAGGCAGGAATC
ACAATCCCACGAAATCCAGGATGCCCAAATTCTGAGGACAAGAACTTCCCCGGACTGTG
ATGGTCAACCTGAACATCCATAACCGGAATACCAATACCAATCCCAAAGGTCCTCAGAT
TACTACAACCGATCCACCTCACCTTGGAAATCTCCACCGCAATGAGGACCCTGAGAGATAT
CCCTCTGTGATCTGGGAGGCAAAGTGCCGCCACTTGGGCTGCATCAACGCTGATGGGAAC
GTGGACTACCACATGAACTCTGTCCCACATCCAGCAAGAGATCCTGGTCTGCGCAGGGAG
CCTCCACACTGCCCAAACCTCCTTCCGGCTGGAGAAGATACTGGTGTCCGTGGGCTGCACC
TGTGTCAACCCGATTGTCCACCATGTGGCCTAAGAGCTCTGGGGAGCCCACACTCCCCAA
AGCAGTTAGACTATGGAGAGCCGACCCAGCCCCTCAGGAACCCTCATCCTTCAAAGACAG
CCTCATTTTCGGACTAAACTCATTAGAGTTCCTTAAGGCAGTTTGTCCAATTAAGCTTCAG
AGGTAACACTTGGCCAAGATATGAGATCTGAATTACCTTTCCCTCTTTCCAAGAAGGAAG
GTTTGACTGAGTACCAATTTGCTTCTTGTTTACTTTTTTAAGGGCTTTAAGTTATTTATG
TATTTAATATGCCCTGAGATAACTTTGGGGTATAAGATTCCATTTAATGAATTACCTAC
TTTATTTTGTGTTGTCTTTTTAAAGAAGATAAGATTCTGGGCTTGGGAATTTTATTATTTA
AAAGGTAAAACCTGTATTTATTTGAGCTATTTAAGGATCTATTTATGTTTAAGTATTTAG
AAAAAGGTGAAAAGCACTATTATCAGTCTGCCTAGGTAAATGTAAGATAGAATTAAT
GGCAGTGCAAAATTTCTGAGTCTTTACAACATACGGATATAGTATTTCTCCTCTTTGTT
TTTAAAAGTTATAACATGGCTGAAAAGAAAGATTAAACCTACTTTCATATGTATTAATTT
AAATTTTGCAATTTGTTGAGGTTTTACAAGAGATACAGCAAGTCTAACTCTCTGTTCCAT
TAAACCCTTATAATAAAATCCTTCTGTAATAATAAAGTTTCAAAGAAAATGTTTATTTG
TTCTCATTAAATGTATTTTAGCAAACCTCAGCTCTTCCCTATTGGGAAGAGTTATGCAAAT
TCTCCTATAAGCAAACAAAGCATGTCTTTGAGTAACAATGACCTGGAAATACCCAAAAT
TCCAAGTTCTCGATTTACATGCCTTCAAGACTGAACACCGACTAAGGTTTTCATACTAT
TAGCCAATGCTGTAGACAGAAGCATTTTGATAGGAATAGAGCAAATAAGATAATGGCCCT
GAGGAATGGCATGTCATTATTAAGATCATATGGGGAAAATGAAACCCTCCCCAAAATAC
AAGAAGTTCTGGGAGGAGACATTGTCTTCAGACTACAATGTCCAGTTTCTCCCCTAGACT
CAGGCTTCCCTTTGGAGATTAAGGCCCTCAGAGATCAACAGACCAACATTTTTCTCTTCC
TCAAGCAACACTCCTAGGGCCTGGCTTCTGTCTGATCAAGGCACCACACAACCAGAAAG
GAGCTGATGGGGCAGAACGAACTTTAAGTATGAGAAAAGTTCAGCCCAAGTAAAATAAAA
ACTCAATCACATTCAATTCAGAGTAGTTTCAAGTTTCACATCGTAACCATTTTCGCCC

FIG. 7

16/17

MTPGKTSLVSLLLLLSLEAIVKAGITIPRNPGPCPNSEDKNFPRTVMVNLNIHNRNTNTNP
 KRSSDYNRSTSPWNLHRNEDPERYPSVIWEAKCRHLGCINADGNVDYHMNSVPIQQEIL
 VLRREPPHCPNSFRLEKILVSVGCTCVTPIVHVA

FIG._8

CAACTGCACCTCGGTTCTATCGATAGCCACCAGCGCAACATGACAGTGAAGACCCTGCAT
 GGCCAGCCATGGTCAAGTACTTGCTGCTGTCGATATTGGGGCTGCCTTTCTGAGTGAG
 GCGGCAGCTCGGAAAATCCCAAAGTAGGACATACTTTTTTCCAAAAGCCTGAGAGTTGC
 CCGCCTGTGCCAGGAGGTAGTATGAAGCTTGACATTGGCATCATCAATGAAAACCAGCGC
 GTTCCATGTCACGTAACATCGAGAGCCGCTCCACCTCCCCCTGGAATTACACTGTCACT
 TGGGACCCCAACCGGTACCCCTCGGAAGTTGTACAGGCCCAGTGTAGGAACTTGGGCTGC
 ATCAATGCTCAAGGAAAGGAAGACATCTCCATGAATTCCGTTCCCATCCAGCAAGAGACC
 CTGGTTCGTCCGGAGGAAGCACCAAGGCTGCTCTGTTTCTTTCCAGTTGGAGAAGGTGCTG
 GTGACTGTTGGCTGCACCTGCGTCACCCCTGTCATCCACCATGTGCAGTAAGAGGTGCAT
 ATCCACTCAGCTGAAGAAG

FIG._9

MTVKTLHG PAMVKYLLLSILGLAFLSEAAARKIPKVGHTFFQKPESCPPVPGGSMKLDIG
 IINENQRVMSRNI ESRSTSPWNYTVTWDPNRY PSEVVQAQCRNLGCINAQKEDISMNS
 VPIQQETLVRRKHQGC SVSFQLEKVLVTVGCTCVTPVIHHVQ

Signaaljärjestus:	aminohapped 1-30
N-glükosüülimiskoht:	aminohapped 83-86
N-müristüülimiskoht:	aminohapped 106-111; 136-141

FIG._10

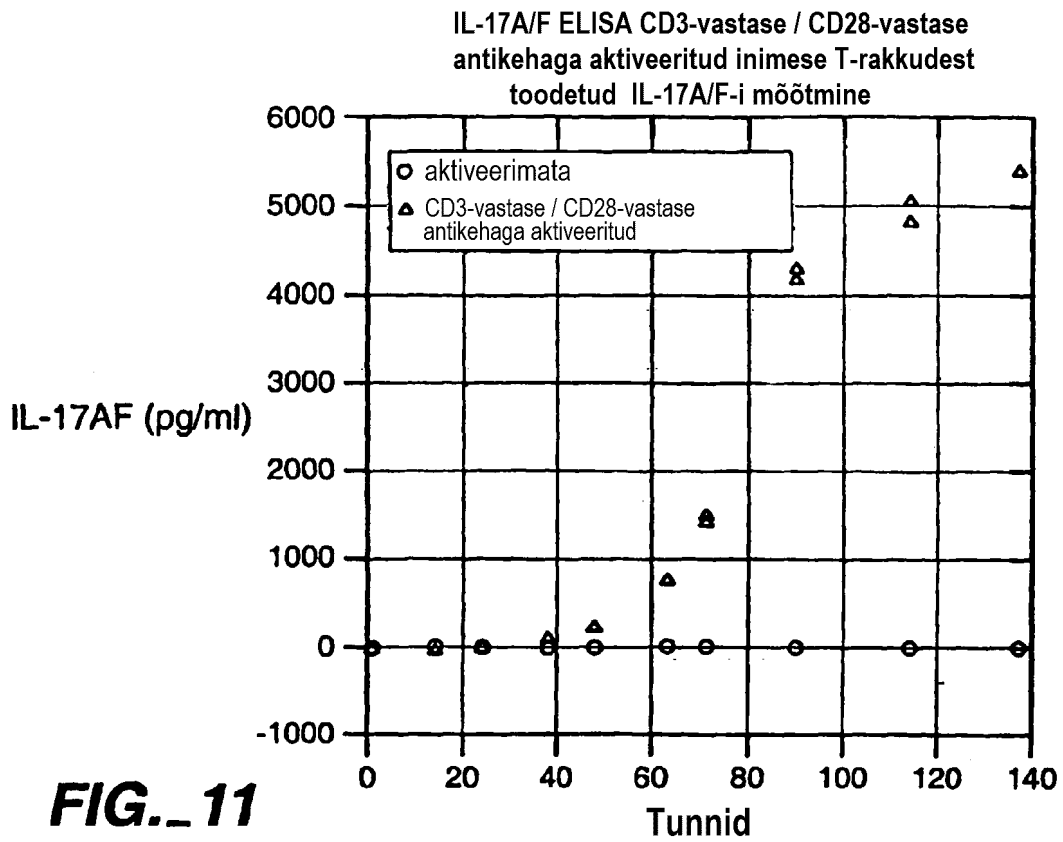


FIG. 11

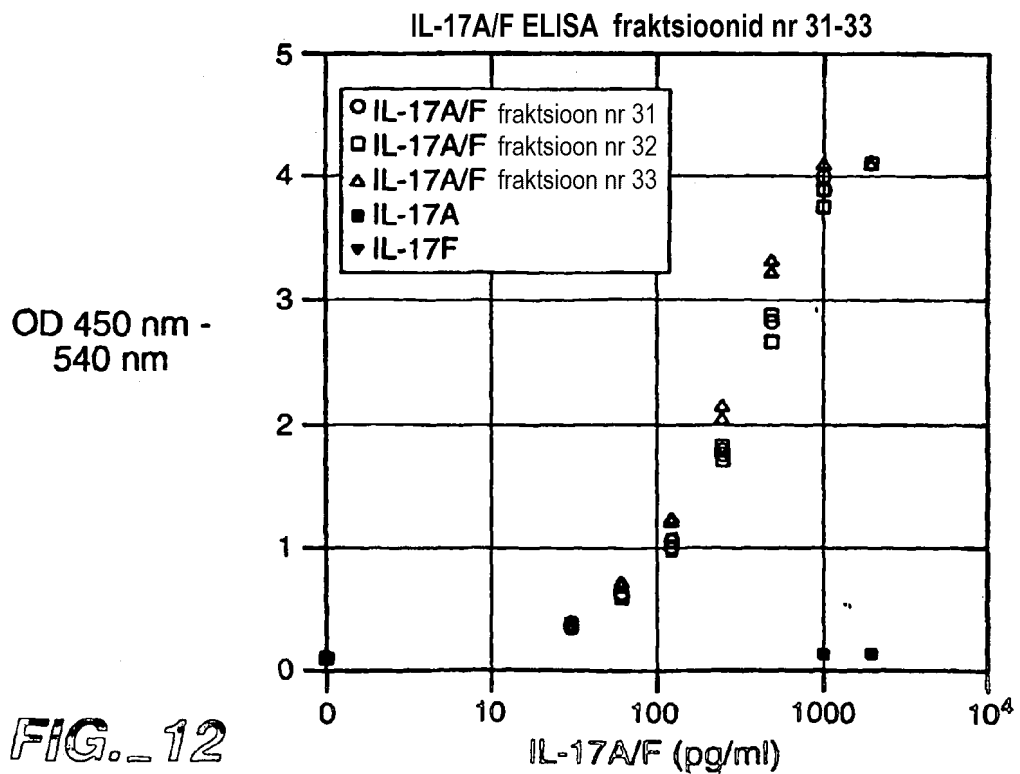


FIG. 12