



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2323686 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.
A61K 38/22 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2013.09.16
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2013.05.15
(86)	Europeisk søknadsnr	09788056.1
(86)	Europeisk innleveringsdag	2009.08.27
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2011.05.25
(30)	Prioritet	2008.08.27, JP, 2008217721
(84)	Utpekte stater	AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MT NL NO PL PT RO SE SI SK TR
(73)	Innehaver	Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd., 9, Kanda-Tsukasa-machi 2-chome Chiyoda-ku, Tokyo 101-8535, Japan
(72)	Oppfinner	KOTOSAI, Kounori, c/o OTSUKA PHARMACEUTICAL CO. LTD.1-7-1, DoshomachiChuo-ku, Osaka-shiOsaka 541-0045, Japan KIRIMA, Kazuyoshi, c/o OTSUKA PHARMACEUTICAL CO. LTD.1-7-1, DoshomachiChuo-ku, Osaka-shiOsaka 541-0045, Japan KARASUTANI, Keiko, c/o OTSUKA PHARMACEUTICAL CO. LTD.1-7-1, DoshomachiChuo-ku, Osaka-shiOsaka 541-0045, Japan OHMOTO, Yasukazu, c/o OTSUKA PHARMACEUTICAL CO. LTD.1-7-1, DoshomachiChuo-ku, Osaka-shiOsaka 541-0045, Japan YABUUCHI, Yoichi, 900-25, OhmatsuKawauchi-cho, Tokushima-shiTokushima 771-0131, Japan
(74)	Fullmektig	Bryn Aarflot AS, Postboks 449 Sentrum, 0104 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	Adiponectin for behandling av lungesykdom
(56)	Anførte publikasjoner	WO-A2-2007/087468 MIYAZAKI T; SHIMADA K; MOKUNO H; DAIDA H: "Adipocyte derived plasma protein, adiponectin, is associated with smoking status in patients with coronary artery disease." HEART (LONDON), vol. 89, no. 6, June 2003 (2003-06), pages 663-664, XP002563657 ISSN: 1355-6037

Teknisk område

Foreliggende oppfinnelse vedrører et middel for behandling av lungesykdom som inhiberer unormal alveolar luftromsutvidelse assosiert med destruktive forandringer av alveolarvegger forårsaket av kronisk skade derpå, og/eller som hemmer destruktive forandringer av alveolarveggene.

Bakgrunnsteknikk

Forskjellige kjente lungesykdommer (PD) inkluderer akutt bronkitt grunnet akutt inflammasjon forårsaket av virus eller bakterier; bronkieastma, hovedsakelig forårsaket av inflammatorisk respons til den respiratoriske kanalen grunnet eosinofiler; interstitiell pneumoni forårsaket av alveolar epitelisk inflammasjon; lungecancer forårsaket av cancerceller; og kronisk obstruktiv lungesykdom (COPD), som er kjent som en sykdom karakterisert ved kronisk lungeinflammasjon forårsaket av forskjellige faktorer, spesielt røking, som fører til destruksjon av alveolarveggen og bronkiemukoskjertelhypertrofi resulterende i kortpustethet, forøket hoste og sputum, osv. En sykdom tidligere betegnet emfysem kompliserer ofte spesielt én sykdom tidligere betegnet kronisk bronkitt i varierende grad. I dag blir obstruktiv lungesykdom som relaterer til disse to sykdommene referert til som COPD.

Det er angitt at COPD er karakterisert ved den progressive utviklingen av luftveisbegrensning (luftveisobstruksjon) (ikke-patentdokument 1).

Ulikt kronisk bronkitt hvor respiratorisk kanal hypersekresjon og infeksjon ikke involverer luftveisbegrensning, er irreversibel luftstrømbegrensning betraktet å være et resultat av perifere luftveislesjoner. Slike lungesykdommer inkluderer, i tillegg til ovennevnte kronisk obstruktive lungesykdom inkludert emfysem og kronisk bronkitt, cystisk fibrose, bronkieektase, tuberkulose, pneumokoniose, og liknende.

Frem til nå, med hensyn til medikamentterapi for lungesykdom, inkludert COPD ledsaget av irreversibel luftveisbegrensning, blir medikamenter så som β 2-stimuleringsmidler, anticholinerge midler og liknende som har bronkodilatorisk aktivitet anvendt for temporær forebygging eller undertrykking av symptomene. Derimot kan disse medikamentene som har bronkodilatorisk aktivitet ikke redusere, for en lang tidsperiode, forverringen av lungefunksjonen, som er den mest viktige kliniske indikatoren.

Mange storskala kliniske studier har undersøkt effektene av terapi ved anvendelse av, som inhaleringsmidler, steroider som har en potent inhibitorisk effekt på produksjonen av cytokiner, men flere dokumenter har rapportert at steroider ikke kan redusere forverringen av lungefunksjonen over en lang tidsperiode (se ikke-patentdokumentene 2 til 4).

Med hensyn til effektene av PD-terapi ved anvendelse av medikamenter som har inhibitoriske effekter på produksjonen av aktiv oksygen, er ingen pålitelige kliniske studier blitt utført.

Ifølge en klinisk studie kan N-acetylcystein, en antioksidant som blir betraktet å ha en virkningsmekanisme som likner den til midler for hemming av produksjonen av aktivt oksygen, redusere frekvensen av akutt eksaserbasjon av COPD (ikke-patentdokument 5). Derimot har ingen dokumenter rapportert at N-acetylcystein utviser en effekt på redusering av forringelse av lungefunksjonen over en lang tidsperiode.

Videre, for behandling av PD, er anvendelse av medikamenter som hemmer fosfodiesterase IV-aktiviteten blitt diskutert. Derimot er det rapportert at disse medikamentene har negative bivirkninger så som kvalme, oppkast og magesyresekresjon (ikke-patentdokument 6).

Som beskrevet ovenfor, ingen medikamenter som oppnår tilfredsstillende ytelse som et medikament for behandling av kronisk lungesykdom, og som reduserer den irreversible forringelsen av lungefunksjonen, dvs. som inhiberer unormal alveolar luftromforstørrelse assosiert med destruktive forandringer av alveolarveggene grunnet kronisk skade derpå, og/eller som hemmer destruktive forandringer av alveolarveggene, er blitt utviklet.

Siteringsliste

Patentlitteratur

PTL 1: WO1996/39429

PTL 2: WO1999/21577

PTL 3: JapanesePatentNo. 3018186

PTL 4: JapanesePatentNo. 4147220

PTL 5: JapaneseUnexaminedPatentNo. 2004-16074

Ikke-patentlitteratur

NPL 1: Pauwell, R.A. et al., Am.J.Respir.Crit.CareMed., 2001 (163), 1256-1276

- NPL 2: PauwelsRA, LodahlCG, LaitinenLA, SchoutenJP, PostmaDS, PrideNB, et al.N.Engl.J.Med., 1999 (340), 1948-1953
- NPL 3: VestboJ, SorensenT, LangeP, BrixA, TorreP, ViskumK, Lancet, 1999 (353) 1819-1823
- 5 NPL 4: BurgePS, CalverleyPM, JonesPW, SpencerS, AndersonJA, MaslenTK, BMJ, 2000 (320), 1297-1303
- NPL 5: C.Stey, J.Steurer, S.Bachmann, T.C.Medici, M.R.Trainer, Eur.Respir.J., 2000 (16), 253-262
- NPL 6: PeterJ.Barnes, N.Engl.J.Med., 2000 (343) No. 4, 269-280
- 10 NPL 7: Maeda, K.etal., Biocjem.Biophys.Res.Comm., 1996 (221), 286-289

Oppsummering av oppfinnelsen

Teknisk problem

- 15 Hensikten med foreliggende oppfinnelse er å tilveiebringe et meget trygt medikament som er nyttig for behandling av en pasient med lungesykdom, hvor lungefunksjonen er irreversibelt forringet.

Løsning på problemet

- 20 Foreliggende oppfinnelse har dannet en dyremodell som utviser patogene trekk som klinisk er meget like COPD ledsaget av irreversibel forringelse i lungefunksjonen, og har utført omfattende forskning ved anvendelse av denne dyremodellen. Som et resultat har de funnet at adiponectin, som er kjent som et kollagenliknende sekretorisk protein spesifikt utskilt fra adiposeceller, hemmer lungeemfysem og
- 25 lungefunksjonsforstyrrelser forårsaket av elastasebehandling, og har kommet frem til et meget trygt nytt terapeutisk middel som utviser en ekstremt høy effekt for behandling av lungesykdom ledsaget av irreversibel forringelse av lungefunksjonen, med færre negative bieffekter så som kvalme, oppkast og magesyresekresjon. Foreliggende oppfinnelse ble oppnådd basert på slike funn.

- 30 Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer et adiponektininnholdende middel for hemming av alveolar luftromsforstørning, og et adiponektininnholdende middel for hemming av alveolar veggdestruksjon.

- 35 Gjenstand 1. Et middel for hemming av alveolar luftromsforstørning, omfattende adiponektin.

Gjenstand 2. Middel ifølge gjenstand 1, hvor adiponektin er innbefattet i en mengde som er effektiv for hemming av alveolar luftromsforstørring assosiert med en destruktiv forandring av en alveolar vegg.

- 5 Gjenstand 3. Middel ifølge gjenstand 1 eller 2, hvor adiponektin er innbefattet i en mengde på 0,01 til 70 vekt%.

Gjenstand 4. Middel ifølge et hvilket som helst av gjenstandene 1-3, for anvendelse for behandling av emfysem, kronisk bronkitt, cystisk fibrose, bronkiektase,
10 tuberkulose, pneumokoniose eller kronisk obstruktiv lungesykdom.

Gjenstand 5. Et middel for hemming av alveolar veggdestruksjon, omfattende adiponektin.

- 15 Gjenstand 6. Middel ifølge gjenstand 5, hvor adiponektin er innbefattet i en mengde som er effektiv for hemming av en destruktiv forandring av en alveolar vegg.

Gjenstand 7. Middel ifølge et hvilket som helst av gjenstandene 5 eller 6, hvor adiponektin er innbefattet i en mengde på 0,01 til 70 vekt%.

20

Gjenstand 8. Middel ifølge et hvilket som helst av gjenstandene 5-7, for anvendelse i behandling av emfysem, kronisk bronkitt, cystisk fibrose, bronkiektase, tuberkulose, pneumokoniose eller kronisk obstruktiv lungesykdom.

- 25 Middel for hemming av alveolar luftromsforstørring ifølge foreliggende oppfinnelse inneholder adiponektin i en mengde effektiv for inhibering av alveolar luftromsforstørring assosiert med destruktive forandringer av alveolarvegger, og middel for hemming av alveolarveggdestruksjon ifølge foreliggende oppfinnelse inneholder adiponektin i en mengde effektiv for hemming av alveolar veggdestruksjon.

30

Adiponektin, som er et aktivt ingrediens av midlet for hemming av alveolar luftromsforstørring eller midler for hemming av alveolar veggdestruksjon ifølge foreliggende oppfinnelse, er et kollagenliknende protein utskilt fra adiposeceller.

- 35 Adiponektin, som er et aktivt ingrediens av midlet for hemming av alveolar luftromsforstørring eller midler for hemming av alveolar veggdestruksjon (nedenfor forkortet som "lungesykdomsterapeutiske midler") ifølge foreliggende oppfinnelse, er en lett tilgjengelig og velkjent forbindelse. Kommersielt tilgjengelig adiponektin eller

adiponektin fremstilt ved den kjente metoden vist i referanseeksemplet beskrevet senere, kan generelt bli anvendt i oppfinnelsen.

Adiponektingenene fra menneske eller mus er beskrevet i patentdokument 1 som human Acrp30 og mus Acrp30, og human adiponektin er beskrevet som apM1 i ikke-patentdokument 7 og patentdokument 2. Den beregnede aminosyresekvensen til adiponektinpolypeptidet anvendt i lungesykdomterapeutiske midler ifølge foreliggende oppfinnelse som et aktivt ingrediens er beskrevet i patentdokument 2, men, patentdokument 2 refererer kun til den inhibitoriske effekten av polypeptidet på vesten av glatt muskelcelle, og dets tilgjengelighet som et middel for forebygging eller forbedring av aterosklerose, et middel for forebygging eller behandling av restenose eller angioplasti, og et antiinflammatorisk middel.

Videre viser patentdokument 3 nyttigheten av adiponektin, som undertrykker, uten makrofager eller lymfocytter, klonal vekst av relativt modne margmonocytoidforløperceller i differensieringsstadiet, som et antiinflammatorisk middel, og en propageringsundertrykker for monocytoidceller. Videre beskriver patentdokument 4 at den C-terminale side sfæriske domenet av adiponektin (korresponderende med aminosyresekvensene SEKV. ID nr. 114 til 239 av human adiponektin, og aminosyresekvensene SEKV. ID nr. 111 til 242 av museadiponektin) har effekten av redusering av scavenger reseptor A ekspresjon, og kan bli anvendt som et forebyggende og terapeutisk middel for aterosklerose. Likeledes refererer patentdokument 5 til tilgjengeligheten av det C-terminale sidesfæriske domenet av adiponektin som en AMP-aktivert proteinkinaseaktivator.

Følgende adiponektin er kommersielt tilgjengelig fra Bio Vendor (Czechoslovakia; <http://www.biovendor.com/products/proteins>): globular rekombinant adiponektin (Adiponectin Globular Human (*E. coli*)), rekombinant adiponektin produsert fra *E. coli* (Adiponectin Human *E. coli* His), rekombinant adiponektin produsert fra humane embryoniske nyreceller (Adiponectin Human HEK293 Flag), trimerisk rekombinant adiponektin produsert fra humane embryoniske nyreceller (Adiponectin Human Trimeric form (HEK)), lav- og høy-molekylvekt adiponektin produsert fra humane embryoniske nyreceller (Adiponectin LMW og MMW oligomerrik human (HEK)), middel- og høymolekylvekt adiponektin produsert fra humane embryoniske nyreceller (Adiponectin MMW og HMW oligomerrik human (HEK)), osv.

Et spesifikt eksempel på polypeptidet anvendt i terapeutiske midler for lungesykdom ifølge foreliggende oppfinnelse som en aktiv ingrediens, er et polypeptid kjent som "adiponektin", kodet av PCR-produktet og vist i eksemplene beskrevet senere.

Fullengde DNA-sekvensen av human adiponektin er 4,517 bp i lengde, og DNA-sekvensen kodende for en åpen leseramme (ORF) er 732 bp i lengde, som vist i SEKV. ID nr. 2. Aminosyresekvensen kodet av ORF består av 244 aminosyresekvenser, som vist i SEKV. ID nr. 1, og gensekvensen er blitt registrert som GenBank aksesjonsnummer NM_004797. Videre er fullengde DNA-sekvensen til museadiponektin 1,276 bp i lengde, som vist i SEKV. ID nr. 5, og DNA-sekvensen kodende for ORF er 741 bp i lengde, som vist i SEKV. ID nr. 4. Aminosyresekvensen kodet av ORF består av 247 aminosyresekvenser, som vist i SEKV. ID nr. 3, og gensekvensen er blitt registrert som GenBank aksesjonsnummer AF304466. Videre, er genekspresjonen av human og museadiponektin spesifikk for fettvev blitt oppdaget.

Aminosyresekvenshomologien mellom human adiponektin og museadiponektin er 83,61 %, og DNA-sekvenshomologien til ORF er 79,78 %. Et slikt betydelig høyt nivå av homologi innbefatter at begge har den samme aktiviteten.

Foreliggende oppfinnere har funnet at adiponektin inhiberer unormal alveolar luftromsforstørrelse assosiert med destruktive forandringer av alveolarveggene grunnet kronisk skade, eller utvise lungefunksjonsforbedring oppnådd ved hemming av de destruktive forandringene av alveolarveggene, og de har konkludert at adiponektin kan fortrinnsvis bli anvendt som et medikament.

Som beskrevet ovenfor, siden adiponektin kan inhibere unormal alveolar luftromsforstørrelse assosiert med destruktive forandringer av alveolarveggene grunnet kronisk skade, kan det bli anvendt for behandling av lungesykdommer så som emfysem, kronisk bronkitt, cystisk fibrose, bronkiektase, tuberkulose, pneumokoniose og COPD.

Patentdokument 1: WO1996/39429

Patentdokument 2: WO1999/21577

Ikke-patentdokument 7: Maeda, K. et al., B.B.R.C., (1996) bind 221, nr 2, sidene 286-289.

Produksjonen av adiponektin for anvendelse som det aktive ingredienset til terapeutiske midler for lungesykdom ifølge oppfinnelsen, fremstilling av terapeutiske

midler for lungesykdom ved anvendelse av adiponektin som et aktivt ingrediens, osv. er nå beskrevet.

Angivelse av aminosyrer, peptider, nukleotidsekvenser, nukleinsyrer, osv. ved
5 forkortelser i denne beskrivelsen er i samsvar med reglene for nomenklatur anbefalt
av IUPAC-IUB (IUPAC-IUB Communication on Biological Nomenclature, Eur. J.
Biochem., 138, 9 (1984)), "The Guidelines for Drafting of Specifications Etc.
Containing Nucleotide Sequence or Amino Acid Sequence Information" (utgitt av det
japanske patentkontor, (juli, 1998) og konvensjonene innenfor det relevante
10 fagområdet.

Adiponektin kan bli tilveiebrakt i form av et rekombinant protein ved å etablere
genetiske omkonstrueringsteknikker [f.eks. Science, 224, 1431 (1984); Biochem,
Biophys. Res. Comm., 130, 692 (1985); Pror. Natl. Acad. Sci., USA., 80, 5990
15 (1983)]. I dette tilfellet kan adiponektin (apM1) genet, genet som tidligere er blitt
etablert av foreliggende oppfinnere bli anvendt [Biochem. Biophys. Res. Commun.,
221, 286-289 (1996)].

Som et alternativ kan adiponektin bli produsert ved konvensjonelle metoder for
20 kjemisk syntese i henhold til informasjonen i aminosyresekvensen kodet av nevnte
gen.

Produksjonen av adiponektin ved en genetisk omkonstrueringsteknikk kan bli utført
ifølge en metode beskrevet i referanseeksempel 1 nedenfor. Mer spesifikt omfatter
25 produksjonen konstruering av et rekombinant DNA med hvilket genet kodende for
gjeldende protein kan bli uttrykt i en vertscelle, introdusering av DNA inn i vertscellen
for å oppnå en transformant, og dyrking av transformanten.

I beskrivelsen omfatter et polynukleotid (DNA-molekyl) ikke bare dobbelttrådet DNA,
30 men også enkelttrådet DNA, inkludert sensekjeder og antisensekjeder som innbefatter
disse, og er ikke begrenset til en lengde derav. Derfor inkluderer
polynukleotidkodende adiponektin dobbelttrådet DNA inkludert genomisk DNA og
enkeltrådet DNA (sensekjede) inkludert cDNA og enkelttråd DNA (antisensekjede)
som har sekvensen komplementær med sensekjeden og syntetiske DNA-fragmenter
35 derav hvis ikke annet er angitt.

Polynukleotidet (DNA-molekylet) heri er ikke definert ved en funksjonell region, og kan inkludere minst ett av en ekspresjonssupresjonsregion, en kodende region, en ledersekvens, et ekson og en intron.

- 5 Polynukleotidet kan også inkludere RNA og DNA. Polypeptidet omfattende den gjeldende aminosyresekvensen og polynukleotidet omfattende den gjeldende DNA-sekvensen inkluderer fragmenter, homologer, derivater og mutanter derav.

- 10 Mutantene av polynukleotidet (mutant DNA) inkluderer naturlig forekommende alleliske mutanter, ikke-naturlig forekommende mutanter, og mutanter som har delesjon, substitusjon, addisjon og inskudd. Men, disse mutantene koder for polypeptidet som har vesentlig den samme funksjonen som funksjonen av polynukleotidet kodet av polynukleotidet før mutasjon.

- 15 Mutasjonen av polypeptidet (modifikasjon av aminosyresekvensen) oppstår ikke nødvendigvis av den naturlig forekommende, f.eks. mutasjonen eller post-translasjonelle modifikasjonen, og kan være de som blir kunstig dannet ved anvendelse av det naturlig forekommende proteinet (f.eks. human adiponektin). Overnevnte mutanter av polypeptider inkluderer alleliske varianter, homologer og
20 naturlige mutanter som har minst 80 %, fortrinnsvis 95 %, og mer foretrukket 99 % homologi med polypeptidet før mutasjonen.

- Homologien til polypeptidet eller polynukleotidet kan bli analysert ved måling ved anvendelse av FASTA-programmet (Clustal, V., Methods MoI. Biol., 25, 307-318
25 (1994)). Som den mest foretrukne og enkle metoden for homologianalyse er det mulig å eksemplifisere metoden hvor sekvensen blir lagret på et medium (f.eks. fleksibel disk, CD-ROM, harddisk drive, ytre disk drive, DVD, osv.) som har evne til å bli lest av datamaskinen, og deretter blir kjent sekvensdatabase søkt i henhold til velkjente søkeprosedyrer ved anvendelse av den lagrede sekvensen. Spesifikke eksempler på
30 kjent sekvensdatabase inkluderer følgende:
- DNA Database of Japan (DDBJ) (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>);
 - Genebank ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/web/Genebank/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/web/Genebank/Index.html) Index.html); og
 - the European Molecular Biology Laboratory Nucleic Acid Sequence Database (EMBL)
35 (http://www.ebi.ac.uk/ebi_docs/embl_db.html).

En mengde søkealgoritmer for homologianalyser er tilgjengelige for fagfolk innenfor dette området. Ett eksempel derav inkluderer et program referert til som BLAST-program. Det er 5 BLAST-prosedyrer i dette programmet. Tre (BLAST, BLASTX og TBLASTX) blant disse er blitt konstruert for å undersøke nukleotidsekvensen. De
 5 gjenværende to er blitt konstruert for å undersøke proteinsekvensen (Coulson, Trends in Biotechnology, 12: 76-80 (1994); Birren et al., Genome Analysis, 1:543-559 (1997)).

I tillegg er ytterligere programmer, f.eks. et sekvensoppstillingsprogram og et
 10 program for identifisering av sekvensene som er separert i større avstand tilgjengelig innenfor fagområdet for analysering av den identifiserte sekvensen.

Det mutante DNA er stille (ingen forandring i aminosyreresidie kodet av en mutert nukleinsyresekvens) eller konservativ for aminosyren kodet av denne. Eksempler på
 15 konservative aminosyresubstitusjon er vist nedenfor.

Opprinnelig aminosyreresidie	Konservativ substituert aminosyreresidie
Ala	Ser
Art	Lys
Asn	Gln eller His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn eller Gln
Ile	Leu eller Val
Leu	Ile eller Val
Lys	Arg, Asn eller Glu
Met	Leu eller Ile
Phe	Met, Leu eller Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp eller Phe
Val	Ile eller Leu

Generelt påvirker én eller flere kodoner kodende for et Cys-residie en disulfidbinding av det bestemte polypeptidet.

5 Substitusjon av aminosyreresidiet generelt antatt å påvirke karaktertrekkene til proteinet inkluderer følgende:

- a) substitusjon av et hydrofobt residie med et hydrofilt residie, f.eks. substitusjon av Leu, Ile, Phe, Val eller Ala med Ser eller Thr;
- b) substitusjon av aminosyreresidiet forskjellig fra Cys og Pro med Cys eller Pro;
- 10 c) substitusjon av residiet som har en elektrisk positiv sidekjede, f.eks., Lys, Arg eller His med et elektrisk negativt residie, f.eks. Glu eller Asp; og
- d) substitusjon av aminosyreresidiet som har en ekstremt stor sidekjede, f.eks., Phe med aminosyreresidiet som ikke har noen sidekjedder, f.eks. Gly.

15 Adiponektin omfatter aminosyresekvensen til SEKV. ID nr. 1 eller 3, eller aminosyresekvensen som har én eller flere aminosyredelesjoner, innskudd, substitusjoner eller addisjoner i aminosyresekvensen ifølge SEKV. ID nr. 1 eller 3, og har alveolar luftstromsforstyrning inhibitorisk aktivitet og/eller lungefunksjonsforbedrende effekt.

20 Adiponektin kan være polypeptidet uttrykt i et proteinekspresjonssystem ved anvendelse av *Escherichia coli* eller et proteinuttrykningssystem ved anvendelse av bakulovirus (AcNPV) vist i eksemplene beskrevet senere ved genrekombinasjonsteknologi eller polypeptidet oppnådd ved kjemisk syntetisering.

25 Som ett spesifikt eksempel på aminosyresekvensen til adiponektin, er det mulig å eksemplifisere én av SEKV. ID nr. 1 eller 3. Aminosyresekvensen til adiponektin er ikke begrenset til én av SEKV. ID nr. 1 eller 3, og kan være de (som er homologe) som har en viss homologi dertil. De homologe kan inkludere polypeptider omfattende

30 aminosyresekvensen som har én eller flere aminosyredelesjoner, innskudd, substitusjoner eller addisjoner i aminosyresekvensen til SEKV. ID nr. 1 eller 3, og som har alveolar luftstromsforstyrningsinhibitorisk aktivitet og/eller alveolar veggdestruksjon inhibitorisk aktivitet, og lungefunksjonsforbedringseffekt (aktiviteten til inhiberende

35 unormal alveolar luftstromsforstyrning assosiert med destruktive forandringer av alveolarveggene grunnet kronisk skade, og/eller aktiviteten med inhiberende destruktive forandringer av alveolarveggene).

Spesifikt inkluderer lungefunksjonsforbedrende effekter til adiponektin en effekt med forbedring eller en reduksjon i pustekapasiteten til lungene, eller en økning i pusteresistensen i en respiratorisk kanal (spesielt bronkoalveolarkalen) til pattedyr, så som mennesker.

5

Som en vertscelle kan celler avledet fra eukaryoter og prokaryoter bli anvendt. Den eukaryote cellen inkluderer celler fra vertebrater og celler fra eukaryote mikroorganismer. Som cellen til en vertebrat, blir apecellelinje COS (Cell, 23, 175 (1981)), kinesisk hamsterovariecellelinje og korresponderende dihydrofolat

10 reduktasemanglende cellelinje (Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 77, 4216 (1980)) og liknende ofte anvendt, men disse er ikke eksklusive valg.

Som ekspresjonsvektor av en vertebratopprinnelse, kan en vektor som har en promotersekvens beliggende oppstrøms for genet som skal bli uttrykt, RNA (forløper)

15 spleisesete, og polyadenyleringssete og transkripsjonstermineringssekvensen generelt bli anvendt. Om nødvendig kan vektoren videre ha et replikasjonsorigo. Som et eksempel på en slik ekspresjonsvektor kan pSV2dhfr inneholdende en tidlig promoter av SV40 bli nevnt (Mol. Cell. Biol., 1, 854 (1981)).

20 Som eukaryote mikroorganismer blir gjær ofte anvendt. Av disse kan gjær fra slekten *Saccharomyces* med fordel bli anvendt. Som ekspresjonsvektor avledet fra en eukaryotisk mikroorganisme så som en gjær, kan pAM82 som har en promoter for syrefosfatasegenet (Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 80, 1 (1983)) bli anvendt.

25 Som den prokaryote verten blir *Escherichia coli* og *Bacillus subtilis* generelt anvendt. Når de blir anvendt som verter, ved anvendelse av en plasmidvektor med evne for replikering i vertsmikroorganismen, er det mulig å med hell anvende et ekspresjonsplasmid oppnådd ved inkorporering av en promoter og SD (Shain og Dalgarno) sekvens og et initieringskodon (f.eks., ATG) nødvendig for initiering av

30 proteinsyntese oppstrøms for genet, slik at genet kan bli uttrykt i denne vektoren. Som nevnte *Escherichia coli* som vert, blir *E. coli* K12 vanligvis anvendt, og som vektoren, blir pBR322 eller modifikasjonsproduktet derav generelt anvendt. Derimot er disse ikke eksklusive valg, men de forskjellige kjente bakterielle stammene og vektorene kan likeledes bli anvendt. Eksempler på promoterene som kan bli anvendt er

35 tryptofan (trp) promoter, lpp-promoter, lac-promoter og PL/PR-promoter.

Som vektoren for insektcellen, er det mulig å eksemplifisere en bakulovirusvektor (Takara) hvor cDNA til adiponektin er blitt inkorporert. Spesielt kan det uttrykte produktet ifølge foreliggende oppfinnelse bli oppnådd ved introdusering av bakulovirusekspresjonsvektoren hvor cDNA til adiponektin er blitt inkorporert inn i de dyrkede cellene BmN4 eller larven til silkeorm (*Bombyx mori*) ved anvendelse av nukleær polyhedrosevirus (BmNPV) av silkeormen for å uttrykke, og isolere fra et kulturmedium eller et silkeormkroppsfluid ved kromatografi.

Det uttrykte produktet ifølge foreliggende oppfinnelse kan også bli oppnådd ved inkorporering av cDNA av adiponektin inn i nukleær polyhydrosivirus (AcNPV) til *Autographa californica*, uttrykking derav i Sf9-celler til *Spodoptera frugiperda* eller Tn5-cellene til *Trichoplusia ni*, og likeledes rensing fra en kultursupernatant ved kromatografi.

Introduksjon av de resulterende rekombinante DNA inn i vertscellen for transformasjon kan bli utført ifølge den kjente metoden.

Den resulterende transformanten kan bli dyrket i henhold til standardmetoder, hvorved det objektive rekombinante proteinet blir uttrykt og produsert (akkumulert eller utskilt) intracellulært, ekstracellulært eller på cellemembranen. Som et medium anvendt for kulturen, kan forskjellige medier som vanligvis blir anvendt fortrinnsvis bli valgt og anvendt ifølge den anvendte vertscellen. Dyrkingen kan også bli utført under betingelser egnet for vekst av vertscellen.

Om nødvendig kan adiponektin oppnådd på ovennevnte måte bli isolert og rensset ved forskjellige separasjonsprosedyrer ved anvendelse av de fysiske, kjemiske og andre karaktertrekk derav (Biochemical Data Book II, 1175-1259, første utgave, 1. opplag, 23. juni 1980, publisert av Tokyo Kagaku Dojin, K.K.; Biochemistry, 25 (25), 8274 (1986); Eur. J. Biochem., 163, 313 (1987), osv.). Mer spesifikt kan nevnte isolering og rensing bli oppnådd ved konvensjonell rekonstitusjonsbehandling, behandling med et proteinpresipiterings (utsaltings) middel, sentrifugering, osmotisk trykksjokkmetode, sonikering, ultrafiltrering, forskjellige typer av væskechromatografi så som molekulær siktkromatografi (gelfiltrering), adsorpsjonskromatografi, ionebyttekromatografi, affinitetskromatografi, høytytelse væskechromatografi (HPLC), osv., og dialyser som anvendt enten enkeltvis eller i kombinasjon.

Alternativt kan overnevnte adiponektin også bli produsert ved den generelle metoden for kjemisk syntese basert på aminosyresekvensinformasjonen. Metoden inkluderer den konvensjonelle væske-fase og fast-fase metode for peptidsyntese. I mer detalj inkluderer hver av disse metodene den såkalte trinnvise elongeringsteknikken som
5 omfatter kondensering av komponentaminosyrene én etter den andre for kjedeutvidelse ifølge aminosyresekvensinformasjonen, og fragmentkondenseringsteknikken som omfatter syntetisering av fragmentpeptider som hver består av flere aminosyreresidier før kobling av disse sammen én etter den andre ifølge nevnte informasjon.

10

En kondensasjonsmetode anvendt for peptidsyntesen kan også bli utført i henhold til standardmetoder. Eksempler på standardmetoder inkluderer en azidmetode, en blandet syreanhydratmetode, en DCC-metode, en aktiv estermetode, en oksidasjons- og reduksjonsmetode, en DPPA (difenylfosforylazid) metode, en DDC + additiv (1-
15 hydroksybenzotriazol, N-hydroksysuksinamid, N-hydroksy-5-norbornen-2,3-dikarboksyamid) metode, og Woodward-metode.

Løsningsmidlet som kan bli anvendt i disse metodene kan fortrinnsvis bli valgt fra løsningsmidlene som er velkjente for bruk i peptiddannende kondensasjonsreaksjoner.
20 Eksempler på disse inkluderer N,N-dimetylformamid (DMF), dimetylsulfoksid (DMSO), heksafosforamid, dioksan, tetrahydrofuran (THF), etylacetat, osv., og blandinger derav.

Ved overnevnte peptidsyntesereaksjon kan aminosyren som ikke er involvert i
25 reaksjonen eller karboksylgruppen i peptidet bli beskyttet som lavere alkylester, så som metylester, etylester og tert-butylester, og aralkylester så som benzylester, p-metoksybenzylester og p-nitrobenzylester generelt ved forestring.

Hydroksylgruppen i aminosyren så som tyrosinresidiet som har en funksjonell gruppe i
30 sidekjeden kan bli beskyttet med acetyl, benzyl, benzyloksykarbonyl, tert-butyl eller liknende, til tross for at slik beskyttelse ikke nødvendigvis er uunnværlig.

Videre kan guanidinogruppen til en argininrest bli beskyttet med en hensiktsmessig beskyttelsesgruppe så som nitro, tosyl, p-metoksybensensulfonyl, metylen-2-sulfonyl,
35 benzyloksykarbonyl, isobornyloksykarbonyl eller adamantyloksykarbonyl.

Reaksjonene for eliminering av slike beskyttelsesgrupper fra de beskyttede aminosyrene eller peptidene, eller fra det endelige proteinet, kan bli utført i henhold til metoder som vanligvis blir anvendt, så som en katalytisk reduksjonsmetode eller metode ved anvendelse av flytende ammoniakk/natriummetall, hydrogenfluorid, hydrogenbromid, hydrogenklorid, trifluoreddiksyre, eddiksyre, maursyre eller metansulfonsyre og liknende.

Det derved oppnådde adiponektin kan bli rensset ved forskjellige metoder så som metoder som anvender en ionebytteharpiks, fordelingskromatografi og gelkromatografi, og en motstrøms distribusjonsmetode som vanligvis blir anvendt innenfor området peptidkjemi.

Lungesykdom terapeutiske midler ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter adiponektin eller et farmakologisk akseptabelt salt derav som en aktiv ingrediens. Saltet inkluderer de med alkalimetaller, jordalkaliske metaller, og ammonium, så som natrium, kalium, litium, kalsium, magnesium, barium og ammoniumsalter. Disse saltene kan bli produsert ved metoder som er velkjente innenfor fagområdet. Overnevnte salt inkluderer videre syreaddisjonssalter som kan bli dannet ved omsetning av adiponektin med en egnet organisk eller uorganisk syre på en i seg selv kjent måte. Eksempler på syreaddisjonssalter er hydroklorid, hydrobromid, sulfat, bisulfat, acetat, oksalat, valerat, oleat, laurat, borat, benzoat, laktat, fosfat, p-toluensulfonat (tosylat), sitrat, maleat, fumarat, suksinat, tartrat, sulfonat, glykolat, askorbat, benzensulfonat, napsylat og liknende salter.

Terapeutiske midler for lungesykdom ifølge foreliggende oppfinnelse blir generelt tilveiebrakt og anvendt i form av et farmasøytisk preparat inneholdende en farmakologisk effektiv mengde av det aktive ingredienset sammen en hensiktsmessig farmasøytisk bærer.

Bæreren som kan bli anvendt i slike farmasøytiske prepareringer inkluderer forskjellige fortynningsmidler og/eller eksipienter, og som fyllstoff, utvidelsesmidler, bindemidler, fuktemidler, oppløsningsmidler, overflateaktive midler, smøremidler og liknende. Disse bærerne blir eventuelt anvendt ifølge en enhetsdoseringsform av den resulterende formuleringen.

Enhetsdoseringsformene til de farmasøytiske prepareringene kan bli valgt fra forskjellige former ifølge formålet med terapien. Typiske eksempler inkluderer faste

former så som tabletter, piller, pulvere, fine pulvere, granuler og kapsler, og flytende former så som oppløsninger, suspensjoner, emulsjoner, siruper og eliksirer. Disse prepareringene er klassifisert, ved administreringsvei, for orale prepareringer, parenterale prepareringer, transnasale prepareringer, vaginale prepareringer, rektale suppositorier, sublinguale tabletter, salver, og liknende, og hver kan bli formulert og støpt eller på annen måte bearbeidet ifølge etablerte farmasøytiske prosedyrer. Videre kan slike farmasøytiske prepareringer inneholde forskjellige tilsetningsstoffer som kan bli formulert i vanlige farmasøytiske prepareringer, så som stabiliseringsmidler, antibakterielle midler, buffere, isotoniske midler, gelateringsmidler, pH-kontrollmidler og overflateaktive midler.

Stabiliseringsmidlene inkluderer humant serumalbumin og L-aminosyrer, sakkarider og cellulosederivater. Disse kan bli anvendt hver alene eller i kombinasjon med et overflateaktivt middel eller liknende. En slik kombinasjon kan spesielt bidra til å forøke stabiliteten til det aktive ingredienset.

L-aminosyrene er ikke spesielt begrenset, og inkluderer glysin, cystein, glutaminsyre, osv.

Sakkaridene er ikke spesielt begrenset, men inkluderer monosakkarider så som glukose, mannose, glaktose og fruktose; sukkeralkoholer så som mannitol, inositol og xylitol; disakkarider så som sukrose, maltose og laktose; og polysakkarider så som dekstran, hydroksypropylstivelse, kondroitinsulfat og hyalluronsyre; og derivater derav.

De overflateaktive midlene er ikke spesielt begrenset, og ioniske og ikke-ioniske overflateaktive midler kan bli anvendt. Eksempler på overflateaktive midler er polyoksyetylenglykolsorbitanalkylestere, polyoksyetylenalkyletere, sorbitanmonoacylestere og fettsyreglyserider.

Cellulosederivatene er ikke spesielt begrenset, men inkluderer metylcellulose, etylcellulose, hydroksyetylcellulose, hydroksypropylcellulose, hydroksypropylmetylcellulose, karboksymetylcellulosenatrium, osv.

Sakkaridene kan bli anvendt ved minst 0,0001 mg, og fortrinnsvis innenfor området på omtrent 0,01 til omtrent 10 mg pr. 1 µg av det aktive ingredienset. De overflateaktive midlene kan bli anvendt i minst omtrent 0,00001 mg, og fortrinnsvis

innenfor området på omtrent 0,0001 til omtrent 0,01 mg pr. 1 µg av det aktive ingredienset. Det humane serumalbuminet kan bli anvendt ved minst omtrent 0,0001 mg, og fortrinnsvis innenfor området på omtrent 0,001 til omtrent 0,1 mg pr. 1 µg av det aktive ingredienset. Aminosyrene kan bli anvendt innenfor området på omtrent 0,001 til omtrent 10 mg pr. 1 µg av det aktive ingredienset. Cellulosederivatene kan bli anvendt ved minst omtrent 0,00001 mg, og fortrinnsvis innenfor området på omtrent 0,001 til omtrent 0,1 mg pr. 1 µg av det aktive ingredienset.

Mengden av det aktive ingredienset innbefattet i de farmasøytiske prepareringene ifølge foreliggende oppfinnelse kan fortrinnsvis bli valgt fra et bredt område. Det er foretrukket at mengden av det aktive ingredienset er typisk omtrent 0,00001 til omtrent 70 vekt%, og fortrinnsvis omtrent 0,0001 til omtrent 5 vekt%.

Bufferen som eventuelt kan bli inkorporert i de farmasøytiske prepareringene inkluderer borsyre, fosforsyre, eddiksyre, sitronsyre, ε-aminokapronsyre, glutaminsyre og korresponderende salter (f.eks. salter med alkalimetaller eller jordalkaliske metaller så som natrium, kalium, kalsium og magnesiumsalter). Isotoneringsmidlet inkluderer natriumklorid, kaliumklorid, sukre, og glyserin. Gelateringsmidlet inkluderer natriumedetat og sitronsyre.

De farmasøytiske prepareringene ifølge oppfinnelsen kan bli fremstilt som en flytende preparering, og i tillegg kan bli dannet til lyofiliseringsdoseringsform oppnådd ved lyofilisering av den farmasøytiske formuleringen, som blir preparert ved en hensiktsmessig konsentrasjon i bruk ved oppløsning i bufferen inneholdende saltløsning.

Ved forming av den farmasøytiske sammensetningen ifølge oppfinnelsen i tablettform kan det bli anvendt som bærer, forskjellige eksipienter så som laktose, sukrose, natriumklorid, glukose, urea, stivelse, kalsiumkarbonat, kaolin, krystallinsk cellulose, silisinsyre og kaliumfosfat; bindemidler så som vann, etanol, propanol, enkelt sirup, glukoseløsning, stivelsesløsning, gelatinløsning, karboksymetylcellulose, hydroksypropylcellulose, metylcellulose og polyvinylpyrrolidon; oppløsningsmidler så som natriumkarboksymetylcellulose, kalsiumkarboksymetylcellulose, lav-substituert hydroksypropylcellulose, tørr stivelse, natriumalginat, agarpulver, laminaranpulver, natriumhydrogenkarbonat og kalsiumkarbonat; overflateaktive midler så som polyoksyetylen sorbitan fettsyreester, natriumlaurylsulfat og stearylmonoglyserid; disintegreringsinhibitorer så som sukrose, stearin, kakaosmør og hydrogenert olje;

absorpsjonsfremmende midler så som kvaternær ammoniumbase og natriumlaurylsulfat; fuktmidler så som glyserin og stivelse; adsorberingsmidler så som stivelse, laktose, kaolin, bentonitt og kolloidal silisinsyre; og smøremidler så som rensset talk, stearinsyresalt, borsyrepulver og polyetylenglykol.

5

Videre, om nødvendig, kan de oppnådde tablettene bli belagt med konvensjonelle beleggsmaterialer for å tilveiebringe sukkerbelagte tabletter, gelatinbelagte tabletter, enteriske tabletter, filmbelagte tabletter eller dobbelt- eller multilag tabletter.

10

Pillene kan bli dannet ved anvendelse, som bærer, eksipienter så som glykose, laktose, stivelse, kakaosmør, hydrogenert vegetabilsk olje, kaolin og talk; bindemidler så som gummi arabicumpulvere, gummi tragakantpulvere, gelatin og etanol, og oppløsningsmidler så som laminaran og agar.

15

Kapsler kan generelt bli dannet ved blanding av det aktive ingredienset med overnevnte bærer ifølge en vanlig metode for å inneslutte førstnevnte i en hard gelatinkapsel, bløt gelatinkapsel, eller liknende.

20

Den flytende prepareringen for oral administrering inkluderer oppløsningsmidler, emulsjoner, suspensjoner, sirup og eliksirer. Hver kan bli dannet ved anvendelse av et konvensjonelt inert fortynningsmiddel, f.eks. en farmakologisk akseptabel bærer som inkluderer vann. Den flytende prepareringen kan videre bli supplementert med forskjellige hjelpemidler så som et fuktmiddel, et emulgeringsmiddel og/eller et suspenderingsmiddel, og kan bli dannet ved den etablerte prosedyren.

25

Den flytende prepareringen for parenteral administrering, f.eks. en steril vandig eller ikke-vandig løsning, emulsjon eller suspensjon, kan bli dannet ved anvendelse av et fortynningsmiddel så som vann, etylalkohol, propylenglykol, polyetylenglykol, etoksylert isostearylalkohol, polyoksylert isostearylalkohol, polyetoksylert sorbitanfettsyreestere, og vegetabilske oljer så som olivenolje. Den flytende prepareringen kan bli supplementert med en organisk ester som kan bli injisert eller infusert, så som etyloleat. Slike prepareringer kan videre bli supplementert med oppløsningsmidler, buffer, fuktmiddel, emulgeringsmiddel, suspenderingsmiddel, konserveringsmiddel, dispergeringsmiddel og andre additiver.

35

Slike farmasøytiske prepareringer kan bli sterilisert ved filtrering gjennom et bakteriefilter, inkorporering av et bakterisid, bestrålingsbehandling, varmebehandling,

eller liknende. Videre kan slike farmasøytiske prepareringer hver bli tilveiebrakt i form av en steril fast sammensetning, som kan bli oppløst i sterilt vann eller et egnet steriliserbart medium for ekstemporent sterilisering.

- 5 Rektale suppositorier og vaginale prepareringer kan bli dannet ved anvendelse av bærere så som polyetylenglykol, kakaosmør, en høyere alkohol, en høyere alkoholester, gelatin og et semi-syntetisk glyserid.

- 10 Salver så som pastaer, kremer og geler kan bli dannet ved anvendelse av et slikt fortynningsmiddel eller fortynningsmidler som hvit petrolatum, parafin, glyserin, cellulosederivater, propylenglykol, polyetylenglykol, silikoner, bentonitt og vegetabilske oljer så som olivenolje.

- 15 Farmasøytiske prepareringer for transnasal eller sublingual administrering kan bli dannet ved anvendelse av velkjent standard eksipient eller eksipienter på konvensjonell måte.

- 20 Videre, om nødvendig, kan de farmasøytiske prepareringene ifølge oppfinnelsen bli supplementert med fargemidler, konserveringsmidler, parfymer, smaksmidler, søtningsstoffer eller andre farmasøytiske sammensetninger.

- 25 Administreringsmetoden for den farmasøytiske prepareringen er ikke begrenset, men er valgt ifølge doseringsformen, pasientens alder, kjønn og andre betingelser, og status for sykdommen. F.eks. blir tabletter, piller, løsninger, suspensjoner, emulsjoner, granuler og kapsler administrert oralt. Injeksjonene blir administrert intravenøst enten alene eller i blanding med en vanlig infusjon så som glukose og aminosyre, og om nødvendig, administrert alene intramuskulært, intradermalt, subkuttant eller intraperitonealt. Suppositoriene blir administrert intrarektalt. De vaginale prepareringene blir administrert i vagina, de nasale prepareringene blir 30 administrert i nesen, de sublinguale prepareringene blir administrert i oralt hulrom, og salvene blir perkutant administrert topisk.

- 35 For å danne det aktive ingredienset ifølge foreliggende oppfinnelse til pulverform, kan ingredienser bli pulverisert ifølge vanlige metoder. F.eks. kan det aktive ingredienset bli pulverisert ved anvendelse av laktose, stivelse eller liknende, og deretter omrørt for å oppnå en homogen blanding.

Av administreringsmetodene er lungeadministrering (inhalering) mer fordelaktig enn oral administrering, på grunn av at lungealveoli er målorganene for behandling, og den direkte eksponeringen for skadet alveolar vevssete er mulig, som forebygger generaliserte bieffekter.

5

Mengden av oppnådd adiponektin i det terapeutiske midlet ifølge foreliggende oppfinnelse er ikke begrenset, og kan fortrinnsvis bli valgt fra et stort område. Adiponektin blir generelt innbefattet i en mengde på omtrent 0,01 til omtrent 70 vekt%, fortrinnsvis omtrent 0,1 til omtrent 50 vekt%, og mer foretrukket omtrent 0,3 til omtrent 30 vekt% i den farmasøytiske sammensetningen.

10

Mengden av det aktive ingredienset som skal være innbefattet i den farmasøytiske prepareringen, og doseringen er ikke spesielt begrenset, men kan bli valgt fra et område ifølge ønsket terapeutisk effekt, administreringsmetode, behandlingsperiode, og pasientens alder, kjønn og andre betingelser. Doseringen blir vanligvis valgt slik at blodkonsentrasjonen av det aktive ingredienset fortrinnsvis vil være omtrent 0,1 til omtrent 500 µg/ml, og mer foretrukket omtrent 1 til omtrent 50 µg/ml. Denne prepareringen kan bli administrert én gang eller i noen få oppdelte doser pr. dag.

15

Doseringen av det terapeutiske midlet ifølge oppfinnelsen blir fortrinnsvis valgt ifølge anvendelsesmetoden, pasientens alder, kjønn og andre betingelser, og hvor alvorlig sykdommen er. Mengden av adiponektin kan vanligvis være omtrent 0,1 µg til omtrent 20 mg.

20

Fordelaktige effekter ved oppfinnelsen

25

Det adiponektininneholdende midlet for inhibering av alveolar luftromsforstørring eller adiponektininneholdende middel for inhibering av alveolar veggdestruksjon ifølge foreliggende oppfinnelse innehar en meget god effekt på redusering av ødeleggelse av lungefunksjonen, så som luftveisobstruksjon, og er meget effektiv for behandling av lungesykdom ledsaget av irreversibel nedbrytelse av lungefunksjonen.

30

Det adiponektininneholdende midlet for inhibering av alveolar luftromsforstørring eller adiponektininneholdende middel for inhibering av alveolar veggdestruksjon ifølge foreliggende oppfinnelse er et meget trygt medikament med færre negative bivirkninger så som kvalme, oppkast, magesyresekresjon, osv.

35

Kort beskrivelse av tegningene

Fig. 1 er en graf som viser at adiponektin har en doseavhengig inhibitorisk aktivitet på alveolarluftromsforstyrrelse forårsaket ved fremskridende destruktive forandringer av alveolarveggene.

- 5 Fig. 2 viser vevssnitt som indikerer progresjonen av de destruktive forandringene av alveolarveggene, og den inhibitoriske aktiviteten til adiponektin på progressiv alveolar veggdestruksjon.

Beskrivelse av utførelsesformer

10

Prepareringseksempel 1

Den farmasøytiske sammensetningen ifølge foreliggende oppfinnelse i den injiserbare formuleringen ble dannet ved tilsetning og blanding av 100 µl/ml av human adiponektin (som har minosyresekvensen til SEKV. ID nr. 1), 0,01 mg/ml Tween 80 (polyoksyetylen 20 sorbitanmonooleat; Polysorbat 80), 15 mg/ml dekstran 40, 0,1 mg/ml cystein, og 1,0 mg/ml HSA (humant serumalbumin) i 0,01 M sitronsyrenatriumsitratbuffer (pH 6,0), filtrering av blandingen (ved anvendelse av et membranfilter på 0,22 µm), deretter steril dispensering av filtratet med 1 ml i en beholder, og lyofilisering derav. Formuleringen kan bli anvendt ved oppløsning i 1 ml saltvann ved bruk.

20

Prepareringseksempel 2

Den farmasøytiske sammensetningen ifølge foreliggende oppfinnelse i den injiserbare formuleringen ble dannet ved tilsetning av 10 µg/0,1 ml human adiponektin (som har aminosyresekvensen ifølge SEKV. ID nr. 1), 5 mg cysteinsyre, og 1 mg humant serumalbumin (HSA) pr. beholder i sterilisert vann for injeksjon, fylling av den resulterende løsningen i én beholder med 1 ml og lyofilisering derav.

25

Prepareringseksempel 3

Den farmasøytiske sammensetning ifølge foreliggende oppfinnelse i den injiserbare formuleringen ble dannet ved tilsetning av 0,5 mg av adiponektin, 80 mg natriumklorid, 20 mg mannitol, 34,5 mg natriumfosfat, og 45 mg PEG i 10 ml destillert vann for injeksjon, etterfulgt av aseptisk filtrering, dispensering av filtratet med 1 ml i en aseptisk beholder, og lyofilisering derav.

30

Referanseeksempel 1

Fremstilling av et rekombinant humant adiponektin

35

(1)ekspresjon av human adiponektin i *Escherichia coli*

1) human adiponektin PCR

Det humane adiponektingenet og aminosyresekvensen som blir kodet derav er blitt
5 deponert til genbanken under aksesjonsnummer henholdsvis NM_004797 og D45371.
Den kodende regionen (CDS) er vist som sekvensen fra 27. 761. av
nukleotidsekvensen. Den utledede aminosyresekvensen er vist i SEKV. ID nr. 1. I
denne sekvensen utgjør 1. til 14. residier et signalpeptid, og 15. til 244. residier
representerer det modne humane adiponektin.

10 Det humane adiponektingenet ble amplifisert ved PCR ved anvendelse av plasmidet
donert av Dr. Funahashi, the Second Department of Internal medicine, Osaka
University School of Medicine som et templat.

15 Konstruering slik at 693bp sekvensen fra 69. til 761. av nukleotidsekvensen av
humant adiponektin vil bli amplifisert med et NdeI-sete ved 5'-enden og et BamHI-
sete ved 3'-enden, ble PCR-primere produsert ved anvendelse av en automatisk DNA-
syntesemaskin. PCR-primersekvensene er vist i SEKV. ID nr. 6 (forover) og nr. 7
(revers).

2) Subkloning av det humane adiponektin (apM1) genet

20 PCR-produktet oppnådd i overnevnte trinn 1) ble subklonet inn i pT7 Blue T-vektor
(Novagen), og det ble bekreftet at det ikke var noen mutasjon i dets nukleotidsekvens
(pT7-apM1).

3) Konstruksjon av en ekspresjonsvektor

25 Ekspresjonsvektoren pET3c (Novagen) ble spaltet med NdeI og BamHI for å isolere et
fragment på omtrent 4600 bp. Derimot ble pT7-apM1 oppnådd i overnevnte trinn 1),
spaltet med NdeI og BamHI for å isolere et fragment med omtrent 700 bp. Disse
30 fragmentene ble ligert, og ekspresjonsvektoren som derved ble oppnådd ble betegnet
pET3c-apM1.

4) Ekspresjon i *Escherichia coli*

35 Verten *E. coli* stamme BL21 (DE3) pLysS ble transformert med pET3c-apM1 konstruert
i overnevnte trinn 3), og dyrket i 2xT.Y.Amp. (tryptone 16 g, gjærekstrakt 10 g, og
NaCl 5 g). Når organismen hadde gått inn i den logaritmiske vekstfasen, ble IPTG
(isopropyl- β -D-tiogalaktopyranosid) tilsatt for indusering av produksjonen av et

rekombinant humant adiponektin (apM1). *E. coli* cellene før og etter denne IPTG-induksjonen og inklusjonslegemet (den uoppløselige fraksjonen av *E. coli*) etter nevnte IPTG-induksjon ble tatt prøver av, og utsatt for SDS-PAGE og Western blotting for å bekrefte ekspresjonen av humant adiponektin.

5

5) Resultater og diskusjon

Ekspresjonsproduktet i *E. coli*, oppnådd på overnevnte måte, var et 230-residueprotein korresponderende med ¹⁵Gly til ²⁴⁴Asn, eksklusivt signalsekvensen, av aminosyresekvensen til human adiponektin, med addisjon av Met avledet fra

10

initieringskodonet ved N-terminusen.

E. coli oppnådd ved overnevnte prosedyre ble analysert ved SDS-PAGE. Som et resultat av dette kunne et omtrent 30 kD bånd bli bekreftet i *E. coli* cellen og inklusjonslegemet etter IPTG-induksjonen.

15

Deretter ble Western blotting utført ved anvendelse av to typer av antistoffer (polyklonale antistoffer (syntetiske peptider)). Begge antistoffene reagerte med nevnte omtrent 30 kD bånd, mens ingen reaksjon ble detektert i det hele tatt med verten *E. coli*.

20

Overnevnte omtrentlige 30 kD bånd ble spaltet ut for å undersøke sekvensen av dets 10 aminosyreresidier ved N-terminalen. Sekvensen var den samme som den ventede sekvensen, med delesjon av N-terminal Met funnet i en mindre populasjon.

25

Det ble klart fra overnevnte resultater at det rekombinante humane adiponektin var blitt uttrykt som et omtrent 30 kD protein. Det meste av det rekombinante humane adiponektin som var blitt uttrykt var blitt intracellulært akkumulert som et inklusjonslegeme.

30

(2) Rensing av rekombinant human adiponektin (apM1) fra *E. coli*

Rensing av rekombinant human adiponektin fra *E. coli* ble utført ved følgende 5-trinn prosedyre.

1) Dyrking av *E. coli*

35

E. coli BL21 (DE3) pLysS (Novagen) transformert med ekspresjonsvektor pET3c-apM1 ble fordyrket i 2xT.Y.Amp.Cm. (trypton 16 g, gjærekstrakt 10 g, kloramfenicol 25 µg/ml, og NaCl 5 g) (37°C, ristekultur). På dagen deretter ble kulturen fortynnet med

100 volum 2xT.Y.Amp., og videre inkubert. Etter 2 til 3 timer med inkubasjon når OD550 av dyrkningsfluidet var blitt 0,3 til 0,5, ble IPTG tilsatt til en endelig konsentrasjon på 0,4 mM for indusering av produksjonen av rekombinant human adiponektin (apM1). Omtrent 3 til 5 timer etter tilsetning av IPTG ble kulturfluidet sentrifugert (5000 rpm, 20 min., 4°C) og *E. coli* pelleten som dermed ble oppnådd ble frysekonserveret.

2) Preparering av et inklusjonslegeme fra *E. coli*

E. coli pelleten ble suspendert i 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) og behandlet med lysozym ved 37°C i 1 time. Deretter ble Triton X-100 (Katayama Kagaku) tilsatt til en endelig konsentrasjon på 0,2 %. Denne løsningen ble sonikert (Branson Sonifier, ytelseskontroll 5, 30 sek.), og sentrifugert (12000 rpm, 30 min., 4°C), og pelleten ble isolert. Denne pelleten ble suspendert i 25 ml 0,2 % Triton X-100-supplementert 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), og suspensjonen ble sonikert (under de samme betingelsene som ovenfor).

Den resulterende løsningen ble sentrifugert, og pelleten ble vasket ved samme prosedyre som ovenfor. Pelleten som dermed ble oppnådd ble tatt som inklusjonslegeme.

3) Refolding av inklusjonslegemet

Inklusjonslegemet ble oppløst med en liten mengde av 7 M guanidin HCl, 100 mM Tris-HCl (pH 8,0) og 1 % 2ME. Denne løsningen ble dråpevis tilsatt inn i 200-ganger volum 2 M urea, 20 mM Tris-HCl (pH 8,0), fortynnet, og latt stå ved 4°C i 3 netter.

4) Konsentrasjon av refoldet løsning

Løsningen etter overnevnte refolding ble sentrifugert (9000 rpm, 30 min., 4°C) og supernatanten ble konsentrert til omtrent 1/100 ved ultrafiltrering ved anvendelse av en Amicon YM-10 membran. Dette konsentratet ble dialysert mot 20 mM Tris.HCl (pH 8,0), og dialysatet ble filtrert gjennom et 0,45 µm filter.

5) DEAE-5 PW anionbytte HPLC

Prøven oppnådd i overnevnte trinn 4) ble isolert og rensert ved anionbytte høytytelse væskechromatografi (HPLC) med DEAE-5PW (Tosoh Corporation). Som utgangsbuffer ble 20 mM Tris-HCl (pH 7,2) anvendt, og elueringen ble utført med en NaCl-gradient (0 → 1M NaCl/60 ml) under registrering av absorbans ved 280 nm. Eluatet ble samlet i 1 ml fraksjoner, og hver fraksjon ble analysert ved SDS-PAGE.

6) Resultater og diskusjon

På grunn av at rekombinant human adiponektin (apM1) var blitt uttrykt som et inklusjonslegeme i *E. coli*, ble rensingen derav utført ved oppløsning og refolding av inklusjonslegemet. Som et resultat av dette ble rekombinant human adiponektin oppløst og separert på anionbyttekolonnen. Toppfraksjoner (fraksjonsnumre 30-37) ble analysert ved SDS-PAGE. Som et resultat av dette ble et omtrent 30 kD bånd observert. I denne analysen ble et svakt utmurt bånd detektert i bakgrunnen, men fordi det meste av proteinet ble betraktet å være rekombinant human adiponektin (apM1), ble dette omtrent 30 kD båndet (rekombinant human adiponektin) anvendt som antigenet i den påfølgende immuniseringen av kaniner og mus, og det aktive ingredienset av lungesykdom terapeutiske midler ifølge oppfinnelsen.

(3)Preparering av anti-humane adiponektin polyklonale og monoklonale antistoffer

1) Preparering av det polyklonale antistoffet

Rekombinant human adiponektin, 100 µg/legeme, ble blandet med fullstendig adjuvant i et 1:1 forhold, og 5 kaniner ble immunisert med blandingen åtte ganger ved 2-uker intervaller for å oppnå et anti-humant adiponektin polyklonalt antistoff (identifikasjonskoder: OCT9101-OCT9105).

2) Preparering av det monoklonale antistoffet

Rekombinant human adiponektin, 20 µg/legeme, ble blandet med fullstendig adjuvant i et 1:1 forhold, og mus ble immunisert med blandingen tre ganger ved 2-uker intervaller. Deretter ble den endelige immuniseringen utført uten adjuvant 3 dager før cellefusjonen. Cellefusjon mellom musemiltcelle og myelomcelle ble utført ved PEG-metoden, og hybridomen ble selektert i HAT-medium.

Skreening for en human adiponektin antistoffproduserende cellelinje ble utført ved ELISA ved anvendelse av antigen (rekombinant human adiponektin)-belagt immunoplate, og hybridomen ble klonet ved den begrensende fortynningsmetode.

På ovennevnte måte ble 11 anti-humane adiponektinantistoffproduserende hybridomlinjer betegnet KOCO9101-KOCO9111 oppnådd. Et hybridom, blant disse, ble deponert til the National Institute of Bioscience and Human Technology, the Ministry of International Trade and Industry, Japan (NIBH, Higashi 1-1-3, Tsukuba-shi, Ibaraki,

Japan) med dato 8. juni 1998 (opprinnelig deponeringsdato) (identifikasjonskoden som ble gitt av deponereren: KOCO9108) og anmodning om overføring til deponering under Budapest avtalen ble inngitt på datoen 7. oktober 1998. Aksesjonsnummer for den endelige deponeringen er FERM BP-6542,

5

Hybridomene som enkeltkloner ble henholdsvis administrert intraperitonealt til mus behandlet med pristane på forhånd, og ascitesfluid ble høstet (identifikasjonskoder: ANOC9101-9111).

10 **3) Rensing av antistoffer**

Kaninantiserum (polyklonalt antistoff) og muse ascites fluid (monoklonalt antistoff) ble henholdsvis renset ved anvendelse av en protein A-kolonne.

4) Ekspresjon av human adiponektin i dyreceller

15 cDNA av adiponektinet ble spaltet ut med EcoRI, og satt inn i EcoRI-setet av ekspresjonsvektor pCIneo (Promega Corp.). COS-1-cellen (ATCC CRL1650) ble transfektert med overnevnte pCIneo-humant adiponektin ved anvendelse av LlipofectAMINE(GIBCO BRL), og kultursupernatanten og cellene ble høstet etter 72 timer.

20

5) Western blotting av humant adiponektin

Først ble adiposevevekstraktet, COS-1-celler, COS-1-cellekultursupernatant, friskt humant plasma, og rekombinant human adiponektin utsatt for 2 ME(+) SDS-PAGE og overført til en nitrocellulosemembran.

25

Denne membranen ble reagert med anti-humant adiponektin monoklonalt antistoff (ANOC9104) og deretter, med HRP-merket antistoff, og deteksjonen ble utført med ECL (Western blot detekteringsreagens, Amersham).

30 Som et resultat ble omtrent 35 kD båndet detektert for adiposevevsekstrakt, pCIneo-human adiponektin/COS-1-celle, og friskt humant plasma, men ble ikke observert for pCIneo/COS-1-cellen eller pCIneo/COS-1-cellekultursupernatanten.

35 Med kultursupernatanten til pCIneo-human adiponektin/COS-1-cellene, et 35 kD bånd bli bekreftet til tross for at det var for svakt til å lett bli skjelnet.

Referanseeksempel 2

CHO-celler som uttrykker N-terminal His-Tag fusjonsmuseadiponektin (klon nr. 5), ble dyrket i stor skala, og den resulterende supernatanten ble samlet. Ved anvendelse av et Ni-NTA-harpiks, ble His-tagget adiponektin rensset.

5 **Referanseeksempel 3**

Fullengde DNA, som vist i SEKV. Nr. 5, av museadiponektin ble integrert inn i en ekspresjonsvektor og uttrykt i *E. coli*, for tilveiebringning av en stor mengde av uttrykt museadiponektin. Supernatanten til ødelagt *E. coli* ble applisert på en DEAE-sefarose åpen kolonne, og eluering ble utført ved anvendelse av en gradient fra 0 M til 1 M
10 NaCl. De eluerte fraksjonene ble deretter samlet og utsatt for fraksjonering med 30 % mettet ammoniumsulfat. Supernatanten ble applisert på en butyl-Toyopearl åpen kolonne, og elueringen ble utført med en gradient fra 30 % til 0 % mettet ammoniumsulfat. Til slutt ble gelfiltrering utført for å rense museadiponektin.

15 **Eksempel 1**

Ved anvendelse av modellmus (C57BL/6J) som hadde utviklet en lungeforstyrrelse som et resultat av elastasebehandling ble adiponektin undersøkt for terapeutiske effekter på kronisk obstruktiv lungesykdom, karakterisert ved irreversibel luftstrømbegrensning.

20

Når alveolarveggene til modellmusene ble ødelagt ved en én-gang intracheal administrering av elastase, fortsatte alveolarveggdestruksjonen kronisk deretter, med utvidende emfysemlesjoner (kontroll i fig. 2). Slike forandringer er indikert ved hjelp av lineært intercept, som er en generelt anvendt evalueringsindeks (Dunhill. M. S. Thorax (1962) 17, s. 320-328). Graden av alveolarveggdestruksjon blir evaluert ved å
25 måle størrelsen på individuelle alveoli.

Følgelig, i modellmus, forårsaker elastasebehandling alveolar veggdestruksjon, som derved resulterer i ekspansjon av alveolardiameteren, som er ekvivalent med en
30 redusert lungefunksjon.

En-gang intratekal administrering av elastase til mus, resulterte i destruksjon av alveolarveggene, og følgelig nedbrytning av blodårer, som forårsaker forbigående blødning og nekrofil infiltrering i alveoli, men denne inflammasjonen forsvant i løpet av
35 3 dager. Følgelig kan det i eksperimentet bli verifisert at effekten av adiponektin ikke kommer fra den inhibitoriske virkningen til elastase.

Hunn 6 eller 7 uker gamle mus (C57BL/6L, Japan Charles River Co., Ltd.) ble inndelt i 4 grupper (A til D, 6 mus pr. gruppe) basert på kroppsvekten ved anvendelse av stratifisert randomisering (SAS Institute Japan, R8.1), som vist i tabell 1. Hver mus ble utsatt for pentobarbital anestesi.

5

Tabell 1

Gruppe	Elastase-behandling	Administrasjons-substans (konsentrasjon)	Dose av adiponektin (mg/mus) (50 µl)	Antall mus
A	Ikke utført	-	-	6
B	Utført	Normal salt-vannsløsning	-	6
C	Utført	Adiponektin (0,02 mg/ml)	0,001	6
D	Utført	Adiponektin (0,2 mg/ml)	0,01	6

Deretter, ved anvendelse av en spray (et produkt fra Penn Century Inc.), normal saltvannsløsning (Otsuka normalt saltvann, produsert av Otsuka Pharmaceutical Factory Inc.), og human nøytrofil elastase (produsert av Elastin Products Co., Inc.), ble intratekalt administrert via strupehodet til mus i gruppe A og mus i gruppene B til D, henholdsvis, i et volum på 50 µl/mus. Doseringen av elastase var 20 U/mus. Fra tre dager etter den intratekale elastaseadministreringen, ble adiponektin administrert intratrakealt én gang pr. dag i 18 dager til mus i gruppe C, i en dose på 0,001 mg/mus, og til mus i gruppe D ved en dose på 0,01 mg/mus. Adiponektin anvendt i administreringen ble oppnådd ved oppløsning i et løsningsmiddel (50 mM Tris-HCl (pH 8,0) 0,5 M CaCl) CHO-celleavledet mus adiponektin oppnådd i referanseeksempel 2 ovenfor. Adiponektin ble fortynnet med en egnet mengde av normal saltvannsløsning, til en konsentrasjon på 0,2 mg/ml, eller 0,02 mg/ml i bruk. Løsningene ved hver konsentrasjon ble delt inn i daglige doseringsenheter, og frysetørket ved -20°C helt til administreringsdatoen. Ved tidspunkt for bruk, ble den frosne løsningen tint. I elastasekontrollgruppen (gruppe B) ble normal saltvannsløsning administrert istedenfor adiponektin i samme periode. Adiponektin eller normal saltvannsløsning ble administrert intratrakealt via strupehodet til mus under isofluraninhaleringsanestesi i et volum på 50 µl/mus ved anvendelse av en spray ("sprayer"). Etter 18 dager med kontinuerlig intratekal administrering, ble hver mus avlivet ved blødning fra abdominal

25

aorta under isofluran inhaleringsanestesi. Lungen ble fjernet og utsatt for perfusjonsfiksering med en 10 % nøytral bufret formalinløsning. Det fikserte lungevevet ble deretter utsatt for parafinomkransing, tynnseksjonering, Masson Trichrome farging, og HE-farging ved et Bio Pathology Institute Co., Ltd. Patologivev
 5 ble vurdert ved måling av gjennomsnittlig lineær intercept, som er en objektiv indikator på skade av alveolar.

Gjennomsnittlig lineær intercept (L_m) ble beregnet ved anvendelse av formelen: $L_m = N \times L/m$, hvor N er antall transversallinjer, L er lengden på en transversallinje, og m er
 10 det totale antallet av alveolarvegger som krysser transversallinjene.

Statistiske analyser

For å undersøke aktivitetene til medikamentene, ble Dunnetts test utført ved sammenlikning av elastasekontrollgruppen (gruppe B) med gruppene C og D. Hver
 15 test ble utført i henhold til two-tailed testen, og signifikansnivået ble satt til 5 %. Testen ble utført ved anvendelse av SAS programvare (SAS Institute Japan, R8.1). Resultatene er vist i fig. 1.

Målt lineær krysning var $152,5 \pm 14,7 \mu\text{m}$ i gruppe B, mens $115,2 \pm 17,3 \mu\text{m}$ i gruppe
 20 C, og $81,7 \pm 20,4 \mu\text{m}$ i gruppe D. Signifikante inhibitoriske aktiviteter ble demonstrert i henhold til dosering av adiponektin (gjennomsnittlig $\pm$ S.D., $P < 0,05$). I gruppe A var den lineære krysningen $73,0 \pm 6,6 \mu\text{m}$.

Resultatene viste at den kontinuerlige lungeadministrering av adiponektin har den
 25 doseavhengige aktiviteten som omfatter redusering av økningen i gjennomsnittlig lineær krysning ("intercept") forårsaket av elastasebehandling.

Det ble spesifikt bekreftet at den kontinuerlige administreringen av adiponektin undertrykte den alveolarluftromsforstørringen forårsaket av utviklingen av destruktive
 30 forandringer av alveolarveggene.

Fig. 2 viser vevssnitt som indikerer utviklingen av destruktive forandringer i alveolarveggene. Dette viser at utviklingen av alveolarveggdestruksjonen i grupper som mottar kontinuerlig administrering av adiponektin (gruppene C og D) er tydeligvis
 35 mer inhibert enn den i kontrollgruppen (gruppe B), og denne inhibitoriske aktiviteten er høyere i gruppe D.

Det ble spesielt bekreftet at den kontinuerlige administreringen av adiponektin undertrykte utviklingen av de destruktive forandringene i alveolarveggene.

2966182
SEQUENCE LISTING

<110> OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.
<120> AGENT FOR TREATING PULMONARY DISEASE
<130> P09-96
<150> JP 2008-217721
<151> 2008-8-27
<160> 7
<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 244
<212> PRT
<213> homo sapiens
<400> 1

```

Met Leu Leu Leu Gly Ala Val Leu Leu Leu Leu Ala Leu Pro Gly His
1      5      10      15
Asp Gln Glu Thr Thr Gln Gly Pro Gly Val Leu Leu Pro Leu Pro
20      25      30
Lys Gly Ala Cys Thr Gly Trp Met Ala Gly Ile Pro Gly His Pro Gly
35      40      45
His Asn Gly Ala Pro Gly Arg Asp Gly Arg Asp Gly Thr Pro Gly Glu
50      55      60
Lys Gly Glu Lys Gly Asp Pro Gly Leu Ile Gly Pro Lys Gly Asp Ile
65      70      75      80
Gly Glu Thr Gly Val Pro Gly Ala Glu Gly Pro Arg Gly Phe Pro Gly
85      90      95
Ile Gln Gly Arg Lys Gly Glu Pro Gly Glu Gly Ala Tyr Val Tyr Arg
100     105     110
Ser Ala Phe Ser Val Gly Leu Glu Thr Tyr Val Thr Ile Pro Asn Met
115     120     125
Pro Ile Arg Phe Thr Lys Ile Phe Tyr Asn Gln Gln Asn His Tyr Asp
130     135     140
Gly Ser Thr Gly Lys Phe His Cys Asn Ile Pro Gly Leu Tyr Tyr Phe
145     150     155     160
Ala Tyr His Ile Thr Val Tyr Met Lys Asp Val Lys Val Ser Leu Phe
165     170     175
Lys Lys Asp Lys Ala Met Leu Phe Thr Tyr Asp Gln Tyr Gln Glu Asn
180     185     190
Asn Val Asp Gln Ala Ser Gly Ser Val Leu Leu His Leu Glu Val Gly
195     200     205
Asp Gln Val Trp Leu Gln Val Tyr Gly Glu Gly Glu Arg Asn Gly Leu
210     215     220
Tyr Ala Asp Asn Asp Asn Asp Ser Thr Phe Thr Gly Phe Leu Leu Tyr
225     230     235     240
His Asp Thr Asn

```

<210> 2
<211> 735
<212> DNA
<213> homo sapiens
<220>
<221> CDS
<222> (1)...(735)
<400> 2

```

atgctgttgc tgggagctgt tctactgcta ttagctctgc ccgggcatga ccaggaaacc      60
acgactcaag ggcccggagt cctgcttccc ctgcccagg gggcctgcac aggttggatg      120
gcgggcatcc cagggcattc gggccataat ggggccccag gccgtgatgg cagagatggc      180
acccctgggtg agaagggtga gaaaggagat ccagggtcta ttggtcctaa gggagacatc      240
ggtgaaaccg gactaccggg ggctgaaggc ccccgaggct ttccgggaat ccaaggcagg      300
aaaggagaac ctggagaagg tgcctatgta taccgctcag cattcagtgt gggattggag      360
acttacgtta ctatcccca catgcccatt cgctttacca agatcttcta caatcagcaa      420
aacactatg atggctccac tggtaaatc cactgcaaca ttctgggct gtactacttt      480
gacctaccaca tcacagtcta tatgaaggat gtgaaggcca gcctcttcaa gaaggacaag      540
gctatgctct tcacctatga tcagtaccag gaaaataatg tggaccaggc ctccggctct      600
gtgctcctgc atctggaggg gggcgaccaa gtctggctcc aggtgtatgg ggaaggagag      660
cgtaatggac tctatgctga taatgacaat gactccacct tcacaggctt tcttctctac      720
catgacacca actga

```

2966182

```

<210> 3
<211> 247
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 3
Met Leu Leu Leu Gln Ala Leu Leu Phe Leu Leu Ile Leu Pro Ser His
1 5 10 15
Ala Glu Asp Asp Val Thr Thr Thr Glu Glu Leu Ala Pro Ala Leu Val
20 25 30
Pro Pro Pro Lys Gly Thr Cys Ala Gly Trp Met Ala Gly Ile Pro Gly
35 40 45
Ile Pro Gly Ile His Val Gly Thr Pro Gly Arg Asp Gly Arg Asp Gly
50 55 60
Thr Pro Gly Glu Lys Gly Glu Lys Gly Asp Ala Gly Leu Leu Gly Pro
65 70 75 80
Lys Gly Glu Thr Gly Asp Val Gly Met Thr Gly Ala Glu Gly Pro Arg
85 90 95
Gly Phe Pro Gly Thr Pro Gly Arg Lys Gly Glu Pro Gly Glu Ala Ala
100 105 110
Tyr Val Tyr Arg Ser Ala Phe Ser Val Gly Leu Glu Thr Arg Val Thr
115 120 125
Val Pro Asn Val Pro Ile Arg Phe Thr Lys Ile Phe Tyr Asn Gln Gln
130 135 140
Asn His Tyr Asp Gly Ser Thr Gly Lys Phe Tyr Cys Asn Ile Pro Gly
145 150 155 160
Leu Tyr Tyr Phe Ser Tyr His Ile Thr Trp Met Lys Asp Val Lys Val
165 170 175
Ser Leu Phe Lys Lys Asp Lys Ala Val Leu Phe Thr Tyr Asp Gln Tyr
180 185 190
Gln Glu Lys Asn Val Asp Gln Ala Ser Gly Ser Val Leu Leu His Leu
195 200 205
Glu Val Gly Asp Gln Val Trp Leu Gln Val Tyr Gly Asp Gly Asp His
210 215 220
Asn Gly Leu Tyr Ala Asp Asn Val Asn Asp Ser Thr Phe Thr Gly Phe
225 230 235 240
Leu Leu Tyr His Asp Thr Asn
245

```

```

<210> 4
<211> 744
<212> DNA
<213> Mus musculus
<220>
<221> CDS
<222> (1)...(744)
<400> 4
atgctactgt tgcaagctct cctgttcctc ttaatcctgc ccagtcatgc cgaagatgac 60
gttactacaa ctgaagagct agctcctgct ttggctccctc cacccaaggg aacttgtgca 120
ggttggatgg caggcatccc aggacatcct ggccacaatg gcacaccagg ccgtgatggc 180
agagatggca ctctggaga gaaggagag aaaggagatg caggctctct tggctcctaag 240
ggtgagacag gagatgttgg aatgacagga gctgaagggc cacggggctt ccccggaacc 300
cctggcagga aaggagagcc tggagaagcc gcttatgtgt atcgtcagc gttcagtgtg 360
gggctggaga cccgcgtcac tgttcccaat gtacccattc gctttactaa gatcttctac 420
aaccaacaga atcattatga cggcagcact ggcaagtct actgcaacat tccgggactc 480
tactacttct cttaccacat cacgggtgtac atgaaagatg tgaagggtgag cctcttcaag 540
aaggacaagg ccgttctctt cacctacgac cagtatcagg aaaagaatgt ggaccaggcc 600
tctggctctg tgctcctcca tctggaggtg ggagaccaag tctggctcca ggtgatggg 660
gatggggacc acaatggact ctatgcagat aacgtcaacg actctacatt tactggcttt 720
cttctctacc atgataccaa ctga 744

```

```

<210> 5
<211> 1276
<212> DNA
<213> Mus musculus
<220>
<221> CDS
<222> (39)...(782)

```

2966182

```

<400> 5
ctctaaagat tgtcagtga tctgacgaca ccaaaagggc tcaggatgct actgttgcaa 60
gctctcctgt tcctcttaat cctgcccagt catgccgaag atgacgttac tacaactgaa 120
gagctagctc ctgctttggt ccctccaccc aagggaactt gtgcagggtg gatggcaggc 180
atcccaggac atcctggcca caatggcaca ccaggccgtg atggcagaga tggcactcct 240
ggagagaagg gagagaaagg agatgcaggc cttcttggtc ctaagggtga gacaggagat 300
gttggaatga caggagctga agggccacgg ggcttccccc gaacccctgg caggaaaagga 360
gagcctggag aagccgctta tatgtatcgc tcagcgttca gtgtggggct ggagaccgcg 420
gtcactgttc ccaatgtacc cattcgcttt actaagatct tctacaacca acagaatcat 480
tatgacggca gcactggcaa gttctactgc aacattccgg gactctacta cttctcttac 540
cacatcacgg tgtacatgaa agatgtgaag gtgagcctct tcaagaagga caaggccggt 600
ctcttcacct acgaccagta tcaggaaaag aatgtggacc aggcctctgg ctctgtgctc 660
ctccatctgg aggtgggaga ccaagtctgg ctccagggtg atggggatgg ggaccacaat 720
ggactctatg cagataacgt caacgactct acatttactg gctttcttct ctaccatgat 780
accaactgac tgcaactacc catagcccat acaccaggag aatcatggaa cagtcgacac 840
actttcagct tagtttgaga gattgatttt attgcttagt ttgagagtc tgagtattat 900
ccacacgtgt actcacttgt tcattaaacg actttataaa aaataatttg tgttcctagt 960
ccagaaaaaa aggcactccc tggctctccac gactcttaca tggtagcaat aacagaatga 1020
aaatcacatt tggtagggg gcttcacaat attcgcatga ctgtctggaa gtagaccatg 1080
ctatttttct gctcactgta cacaatatatt gtccacataa accctataat gtaaatatga 1140
aatacagtga ttactcttct cacaggctga gtgtatgaat gtctaaagac ccataagtat 1200
taaagtggta gggataaatt ggaaaaaaa aaaaaaaa agaaaaact tagagcacac 1260
tggcggccgt tactag

```

```

<210> 6
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220>
<223> oligonucleotide as primer (forward) sequence for adiponectin
<400> 6
aacatatggg gcatgaccag gaaaccacg 29

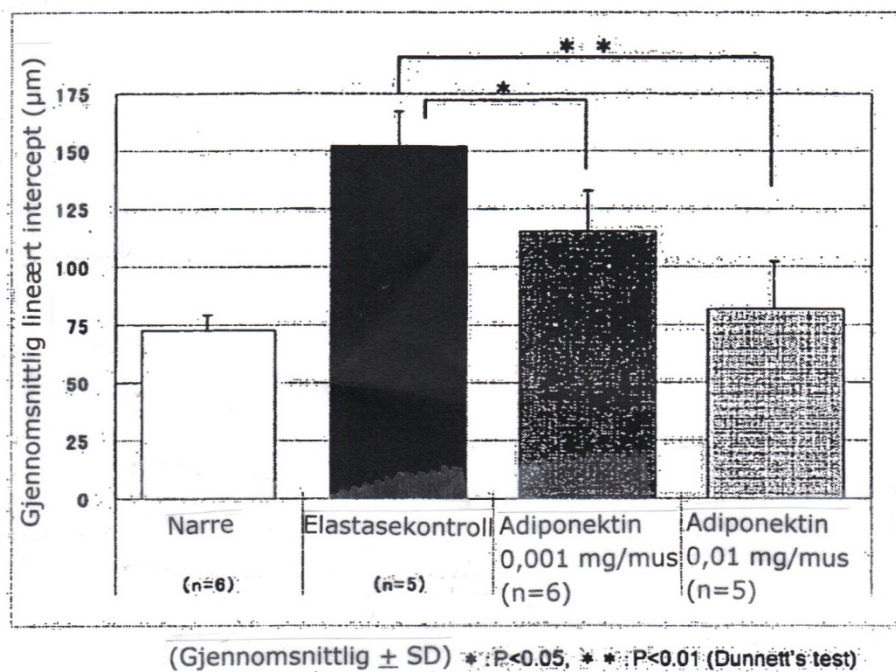
<210> 7
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220>
<223> oligonucleotide as primer (reverse) sequence for adiponectin
<400> 7
aaggatcctc agttgggtgc atggtagag 29

```

PATENTKRAV

- 5 1. Middel for anvendelse for inhibering av alveolarluftromsforstørring, omfattende adiponektin.
2. Middel for anvendelse ifølge krav 1, hvor adiponektin er innbefattet i en mengde på 0,01 til 70 vekt%.
- 10 3. Middel for anvendelse for inhibering av alveolarveggdestruksjon, omfattende adiponektin.
- 15 4. Middel for anvendelse ifølge krav 3, hvor adiponektin er innbefattet i en mengde på 0,01 til 70 vekt%.

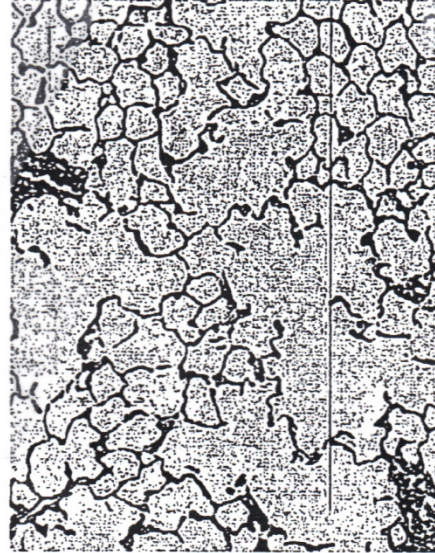
[Fig. 1]



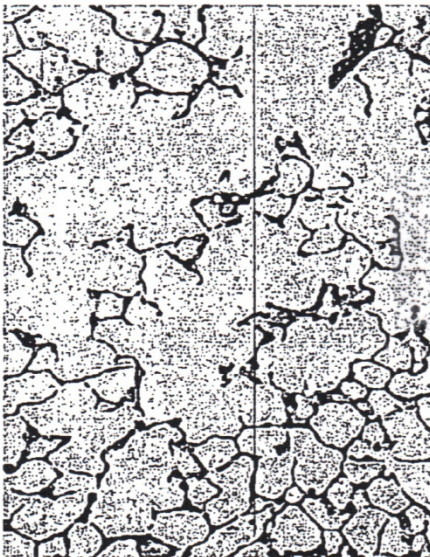
[Fig.2]



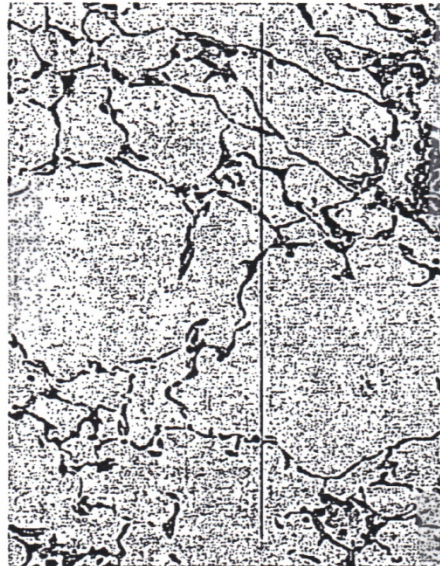
Kontroll (elastase)



Adiponektin 0,01 mg/mus (50 µL)



Narre



Adiponektin 0,001 mg/mus (50 µL)