



H U 0 0 0 2 2 1 3 4 8 B 1

(19) Országkód

**HU**



**MAGYAR  
KÖZTÁRSASÁG**

**MAGYAR  
SZABADALMI  
HIVATAL**

## **SZABADALMI LEÍRÁS**

(11) Lajstromszám:

**221 348 B1**

(21) A bejelentés ügyszáma: P 99 03378  
(22) A bejelentés napja: 1997. 04. 15.  
(30) Elsőbbségi adatok:  
08/634,493 1996. 04. 18. US  
(86) Nemzetközi bejelentési szám: PCT/EP 97/01903  
(87) Nemzetközi közzétételi szám: WO 97/40149

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>

**C 12 N 15/12**

C 07 K 14/47

A 61 K 38/17

A 01 K 67/027

(40) A közzététel napja: 2000. 02. 28.  
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi  
Közlönyben: 2002. 09. 30.

(72) Feltalálók:

Boots, Anna Maria Helena, Megen (NL)  
Bos, Ebo Sybren, Oss (NL)  
Verheijden, Gijsbertus Franciscus Maria, Oss  
(NL)

(73) Szabadalmas:

AKZO NOBEL N.V., Arnhem (NL)

(74) Képviseelő:

Svingor Ádám, DANUBIA Szabadalmi és Véd-  
jegy Iroda Kft., Budapest

(54)

### **Az autoimmun betegségek immunterápiájában felhasználható autoantigének és ezekkel szerkezetileg rokon fehérjék**

#### **KIVONAT**

A találmány tárgyát képezik T-sejt-toleranciát indukáló fehérjék, közelebbről a HC gp-39-cel, konkrétan a YKLVCCYYTSSWSQYREGDGSFCFPDALDRFLCTHII YSFANISND (1. a. számú) aminosavszekvenciával legalább 70%-ban homológ aminosavszekvenciát tartalmazó egy vagy több fehérje terápiás anyagként való alkalmazásra. A találmány tárgyát képezi a fehérjék alkalmazása az ízületi porc autoimmun betegségekben fellépő, krónikus roncsolódásának kezelésében, a találmány szerinti autoantigéneket és/vagy fehérjéket tartalmazó

gyógyászati készítmények, autoreaktív T-sejtek tesztmintákban történő detektálására alkalmas diagnosztikai eljárások és az eljárásban használható reagenskészletek.

A találmány szerinti megoldás alkalmas specifikus T-sejt-tolerancia indukálására T-sejt-közvetített porckárosodásban szenvedő betegeknél, továbbá az arthritis állati tesztmodelljeinek létrehozására, valamint autoreaktív T-sejtek detektálására.

**HU 221 348 B1**

A találmány tárgyát képezik új autoantigének és ezekkel rokon fehérjék, valamint ezek alkalmazása az ízületi porc autoimmun betegségekben fellépő, krónikus roncólódásának kezelésében, a találmány szerinti autoantigéneket és/vagy fehérjéket tartalmazó gyógyászati készítmények, autoreaktív T-sejtek tesztmintákban történő detektálására alkalmas diagnosztikai eljárások és az eljárásban használható reagenskészletek.

A találmány szerinti megoldás előnyösen alkalmazható specifikus T-sejt-tolerancia indukálására T-sejt-közvetített porckárosodásban szenvedő betegeknel, továbbá az arthritis állati tesztmodelljeinek létrehozására, valamint autoreaktív T-sejtek detektálására.

Az immunrendszer működésének elvi alapja az idegen antigének (nem saját antigének) és az autoantigének (saját antigének, melyek az egyén saját testéből származnak) megkülönböztetésének képessége, mely az autoantigénnel szembeni belső tolerancia révén valósul meg.

Az immunrendszer megvédi az egyént az idegen antigénektől, és idegen antigén hatására specifikus sejtek, például T- és B-limfociták aktiválásával, valamint oldatfázisú faktorok, például interleukinek, antitestek és komplementkomponensek termelésével reagál. Az immunválaszt kiváltó antigént az antigénprezentáló sejtek (APC-k) lebontják, és az antigént a fő hisztokompatibilitási komplex (MHC) II. glikoproteinnel asszociálva expresszálja a sejt felszínén. Az MHC-glikoprotein – antigénfragmens – komplex a T-sejt részére kerül bemutatásra, amely T-sejt receptora által felismeri az MHC II-höz kapcsolt antigént. A T-sejt aktiválódik, vagyis proliferál és/vagy interleukineket termel, ezzel a megtámadott antigén ellen irányuló aktivált limfociták szaporodását váltja ki [Grey és munkatársai, *Sci. Am.*, 261: 38–46 (1989)].

A saját antigének is folyamatosan degradálódnak és az MHC-glikoproteinek antigénfragmenseként prezentálják ezeket a T-sejteknek [Jardetsky és munkatársai, *Nature* 353: 326–329 (1991)]. A saját felismerésének képessége így az immunrendszer alapvető tulajdonsága. Normális körülmények között az immunrendszer toleráns a saját antigénnel szemben, és a saját antigén nem vált ki immunválaszt.

Mikor a saját antigénnel szembeni tolerancia elvesz, egy vagy több saját antigén immunválaszt vált ki, az autoreaktív T-sejtek aktivációját és autoantitestek termelődését okozva. Ez a jelenség az autoimmunitás. Mivel az immunválasz általában romboló hatású, vagyis elpusztítja a behatoló idegen antigént, az autoimmun folyamatok a test saját szöveteinek lebomlásához vezethetnek.

A T-sejteknek az autoimmun betegségekben való közreműködését számos vizsgálattal bizonyították. Egérben a kísérletileg kiváltott autoimmun encephalomyelitisben (EAE) a T-sejteknek egy szűk köre játszik szerepet, melyek az MHC II molekulával komplexben levő mielin bázikus protein (MBP) egyetlen epitópjára specifikusak. A különböző autoimmun betegségekre fogékony Lewis-patkányoknál kimutatták, hogy a betegséget a T-sejtek közvetítik.

Feltételezzük, hogy az emberi autoimmun betegségek szintén összefüggenek autoagresszív T-sejtek keletkezésével.

Romboló hatású autoimmun folyamat játszik szerepet különféle betegségekben, például a rheumatoid arthritisben (RA), melynél az ízületi porc sérül krónikus gyulladási folyamat révén, nagy mennyiségű aktivált limfocita és II. osztályú MHC-t expresszáló sejt jelenléte következtében. A porc pusztja jelenléte szükségesnek tűnik a helyi gyulladási reakció fenntartásához: kimutatták, hogy a porc degradációja az RA esetében porcspecifikus autoreaktív T-sejtek aktivitásával függ össze [Sigall és munkatársai, *Clin. Exp. Rheumat.* 6:59 (1988); Glant és munkatársai, *Biochem. Soc. Trans.* 18:796 (1990); Burmester és munkatársai, *Rheumatoid arthritis*, szerk: Smolen, Kalden és Maini, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, (1992). Ráadásul kimutatták, hogy a porc sebészeti eljárással való eltávolítása csökkentette a gyulladás mértékét [G.S. Panayi és munkatársai, *Clin. Exp. Rheumatol.* 11. (8. pótkötet): S1–S8 (1993)]. Ezért feltételezzük, hogy a porcfehérjék autoantigének (autoantitestek célpontjai), melyek stimulálni képesek a T-sejteket. Ezen autoreaktív T-sejtek aktivációja autoimmun betegség kialakulásához vezet. Mindazonáltal a rheumatoid arthritis kialakulásában szerepet játszó autoantigenikus komponens azonosítása nehezen megválaszolható kérdés.

A porc roncólódásához vezető gyulladási reakció sokféle hatóanyaggal, például szteroid drogokkal kezelhető. Mindamellett ezek gyakran nem specifikus immunszuppresszív szerek, melyeknek toxikus mellékhatásaik vannak. A nemspecifikus immunszuppresszió hátrányai miatt nem szívesen alkalmazott terápia.

Az antigénspecifikus, nem toxikus immunszuppresszió a nemspecifikus immunszuppresszió vonzó alternatívája. Az antigénspecifikus terápia alkalmazásakor a beteget a célzott antigénnel vagy annak aminosavszekvenciájával homológ szekvenciájú antigénnel, vagy szintetikus, a fenti autoantigénből vagy antigénből származó T-sejt-reaktív peptidokkal kezelik. Ezek a szintetikus peptidok az antigén T-sejt-epitópjának felelnek meg; maguk, illetve az antigén iránti szisztémás immuntolerancia, vagyis specifikus T-sejt-tolerancia indukálására használhatóak. Habár ellentmondásosnak tűnik, hogy az immunrendszert ugyanazzal az antigénnel deszenzitizáljuk, amely az aktiválásért felelős, a célzott antigén kontrollált adagolása az immunrendszer deszenzitizálásának nagyon hatásos módja lehet. Az immunrendszer deszenzitizálása, illetve immunológiai tolerancia kiváltása azon a régen megfigyelt jelenségen alapul, hogy azok az állatok, melyeket előzőleg egy antigénnel vagy epitóppal etettek vagy azt inhaláltatták velük, kevésbé voltak képesek szisztémás immunválasz kifejtésére az említett antigénnel, illetve epitóppal szemben, amikor ezek a vérkeringésükbe kerültek.

Ahhoz, hogy a toleranciaterápiát a T-sejt-közvetített porckárosodás kezelésében eredményesen alkalmazzuk, szükséges, hogy azonosítsuk azt az

autoantigént vagy antigéneket, melyek aminosavszekvenciája homológ a célzott antigén aminosavszekvenciájával, hogy deszenzitizálhassuk a betegeket azokkal az autoantigénnel szemben, melyek aktiválják a gyulladási folyamatért felelős T-sejteket.

A találmány szerinti megoldás kidolgozása során célunk volt olyan autoantigén és olyan fehérjék létrehozása, amelyek aminosavszekvenciája megfelelő mértékű homológiát mutat az autoantigénnel, és amely autoantigén és/vagy fehérje alkalmas specifikus T-sejt-tolerancia indukálására T-sejt-közvetített porckárosodásban szenvedő betegeknél. A találmány szerinti megoldás kidolgozása során célunk volt továbbá az arthritis olyan állati tesztmodelljeinek létrehozása, amelyek alkalmazhatók az arthritis tüneteinek enyhítését szolgáló új drogok szkrínelése során. Ezenfelül célunk volt az ízületi porc károsodásában szerepet játszó autoreaktív T-sejtek detektálására alkalmas eljárás és az eljárásban alkalmazható reagenskészlet kidolgozása.

Váratlan volt az a felismerés, hogy a humán 39-es porcglykoprotein (Human cartilage glycoprotein 39, ezután HC gp-39) a RA-betegekben célzott autoantigén, amely specifikus T-sejteket aktivál, s ezáltal gyulladási folyamatot okoz vagy közvetít. A HC gp-39 arthritogenikus természetét a „Balb-c” transzgenikus egérrel végzett kísérletek is megerősítették. A Balb-c egereknél az említett peptid egyszeri, szubkután injektálására arthritis jelei mutatkoztak. A HC gp-39 által indukált betegség lefolyását a mellső és/vagy a hátsó lábakon periodikus visszaesés jellemezte, és az enyhe arthritis fokozatosan súlyosabb formát öltött. Az érintett ízületek szimmetrikus eloszlását is megfigyelték, ami a periodikus visszaeséssel és a csomópépződéssel együtt az arthritis, különösen a RA lefolyására emlékeztet.

Még meglepőbb módon azt tapasztaltuk, hogy a HC gp-39-cel történő kezelés immunológiai toleranciát eredményezett, és ami ennél is fontosabb, késleltette és/vagy megakadályozta az arthritis kialakulását.

Váratlan volt az a felismerés is, hogy állatokba injektálva arthritis indukálására alkalmasak azok a fehérjék, amelyek aminosavszekvenciája legalább 50%-ban homológ a HC gp-39 aminosavszekvenciájával. Közelebbről azok a fehérjék voltak alkalmasak arthritis indukálására állatokban a HC gp-39-cel azonos módon, melyek tartalmaznak egy aminosavszekvenciát, amely legalább 50%-ban homológ a YKLVCYTWSQYREGDGSCFPDALDRFLCTHIIYSFANISND szekvenciával [1. azonosító számú szekvencia (a továbbiakban 1. a. számú)].

Ezek az arthritogenikus fehérjék olyan aminosavszekvenciát tartalmaznak amely előnyösen legalább 70%-ban, előnyösebben 80%-ban, a legelőnyösebben 90%-ban homológ a HC gp-39 aminosavszekvenciájával, közelebbről a YKLVCYTWSQYREGDGSCFPDALDRFLCTHIIYSFANISND (1. a. számú) aminosavszekvenciával.

A találmány szerinti arthritogenikus fehérjék és az 1. azonosító számú szekvencia közötti százalékos szekvenciahomológia alatt az általánosan használt szekven-

cia-összehasonlító programokkal, mint például a FASTA [W. R. Pearson és D. J. Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 2444–2448, (1988)] segítségével meghatározható homológiát értjük.

5 A találmány szerint megfelelő arthritogenikus fehérjék például: a sertés eredetű 38 kDa-os heparinkötő fehérje, a marha 39 kDa-os savófehérje, a humán YKL-39 fehérje, az egér „breast-regressing” 39 kDa-os fehérje (brp39), a humánpetevezeték-specifikus glikoprotein, az egérpetevezeték-specifikus glikoprotein, a hörcsögpetevezeték-specifikus glikoprotein, a marhapetevezeték-specifikus glikoprotein, a humán kitotriozidáz prekursor fehérje és az egér YM-1 szekréciós fehérje prekursora. A találmány szerinti arthritogenikus fehérjék nagyon megfelelőek az immunrendszernek e fehérjékkel homológ autoantitestekkel szembeni szisztémás toleranciájának indukálására, és felhasználhatók az arthritis kialakulásának késleltetésére vagy megakadályozására emlősökben.

20 A HC gp-39 a beteg és az egészséges felnőttek szérumban is jelen van, de a betegeknél szérumkoncentrációja körülbelül duplája az egészséges felnőttekhez viszonyítva. Ráadásul a HC gp-39-et kódoló mRNS megtalálható az RA betegek ízületi hártájában vagy porcában, míg egészséges felnőttek sebészeti úton eltávolított porcminái nem tartalmaznak szignifikáns mennyiségű, HC gp-39-et kódoló mRNS-t. Amennyiben az ízületi kondrocitákat és az ízületi hártasejteket tenyésztik, tenyészetükben a fő szekréciós termék a HC gp-39 válik [Hakala és munkatársai J. Biol. Chem., 268, No.34, 25803 (1993)]. Hakala és munkatársai cikkükben nem céloznak és nem utalnak a HC gp-39 arthritogén természetére, és ilyen utalás egyéb publikációkban sem történik.

35 Olyan fehérjéket, melyek aminosavszekvenciája legalább 50%-ban homológ a HC gp-39 aminosavszekvenciájával, közelebbről a YKLVCYTWSQYREGDGSCFPDALDRFLCTHIIYSFANISND (1. a. számú) aminosavszekvenciával, már eddig is ismertettek és leírtak. A sertés heparin-kötő fehérje azonosítását ismertetik ugyan Shackleton és munkatársai [J. Biol. Chem., 270, No.270, 13076–13083 (1995)], a fehérje funkcióját nem azonosították. A marha 39 kDa-os savófehérje izolálását és jellemzését J. J. Rejman és munkatársai tették közzé [Biochem. Biophys. Res. Comm. 150, No. 1, 329–334, (1988)]. Az egér „breast regressing” 39 kDa-os fehérjét (brp39) Morrison és Leder [Oncogene 9, 3417, (1994)] írta le. A humánpetevezeték-specifikus glikoprotein cDNS-ének klónozását és aminosavszekvenciáját Arias és munkatársai írták le [Biology of Reproduction 51, 685–694, (1994)]. Más emlős-eredetű petevezeték-specifikus glikoproteineket, mint az egér- és hörcsögpetevezeték-specifikus glikoproteineket, a

45 JP-A-07107979 japán közzétételi irat (Kinosei Peptide Kenkyusho KK) tár fel. A marhapetevezeték-specifikus glikoprotein tisztítását és klónozását Y Sendai és munkatársai ismertetik [Biol. of Reprod. 50, 927–934 (1994)]. A humán kitotriozidáz prekursor proteint az aktivált humán makrofágok szekretálják és akti-

válják. A kitotriozidáz cDNS-ének klónozását és aminosavszekvenciáját Boot és munkatársai írták le [J. Biol. Chem. 270, No. 44, 26252–26256]. Az egér YM-1 szekréciós fehérje prekursorának aminosavszekvenciáját Chan és munkatársai benyújtották az EMBL Adattárba 1992. júniusában, M94584 nyilvántartási számmal, az adatok nincsenek leközölve. A humán kondrocita YKL-39 fehérje aminosavszekvenciáját Hu és munkatársai írták le [J. Biol. Chem. 271, No. 32, 19415–19420 (1996)]. Azonban a fenti publikációk egyike sem céloz vagy utal a találmány szerinti fehérjék arthritogénikus természetére, sem arra a tényre, hogy ezek a fehérjék felhasználhatóak gyógyhatású anyagként a HC gp-39 iránti specifikus T-sejt-tolerancia indukálására irányuló terápiában emlősökben, közelebbről emberekben, akik T-sejt-közvetített porckárosodásban, például arthritisben, közelebbről rheumatoid arthritisben szenvednek.

Így a találmány szerint a HC gp-39, valamint a HC gp-39 aminosavszekvenciájával, közelebbről a YKLVCCYTSWSQYREG DGSCFPDALD-RFLC-THIYSFANISND (1. a. számú) aminosavszekvenciával legalább 50%-ban homológ aminosavszekvenciát tartalmazó fehérjék rendkívül alkalmasak a HC gp-39 iránti specifikus T-sejt-tolerancia indukálására irányuló terápiában való alkalmazásra olyan betegek-nél, akik T-sejt-közvetített porckárosodásban, például arthritisben, közelebbről rheumatoid arthritisben szenvednek. Szintén a találmány oltalmi körébe tartoznak a HC gp-39 fragmensei és a találmány szerinti arthritogénikus fehérjék, amelyek alkalmasak a HC gp-39 autoantigén iránti specifikus T-sejt-tolerancia indukálására a megtámadott porcban.

A WO 95/01995 és a WO 95/02188 számú nemzetközi közzétételi iratban leírják a HC gp-39 diagnosztikumként, a RA markereként való alkalmazását, de a HC gp-39 arthritogénikus természetét nem tárják fel és nem is sugallják. Sehol sem említik vagy javasolják a HC gp-39 vagy fragmenseinek vagy a találmány szerinti T-sejt-reaktív fehérjék alkalmazását a HC gp-39 autoantigén iránti T-sejt-specifikus tolerancia indukálására a megtámadott porcban.

A HC gp-39-et, valamint a HC gp-39 aminosavszekvenciájával, közelebbről a YKLVCCYTSWSQYREGDGSCFPDALDRFLC-THIYSFANISND (1. a. számú) aminosavszekvenciával legalább 50%-ban homológ aminosavszekvenciát tartalmazó arthritogénikus fehérjéket, és a találmány szerinti arthritogénikus fehérjék fragmenseit rekombináns DNS-módszerekkel is előállíthatjuk. A HC gp-39-et, valamint a HC gp-39 aminosavszekvenciájával, közelebbről a YKLVCCYTSWSQYREGDGSCFPDALDRFLC-THIYSFANISND (1. a. számú) aminosavszekvenciával legalább 50%-ban homológ aminosavszekvenciát tartalmazó arthritogénikus fehérjéket, vagy a találmány szerinti arthritogénikus fehérjék fragmenseit vagy azok multimerjeit kódoló nukleinsavszekvenciát expressziós vektorba inszertálhatjuk. Megfelelő expressziós vektorok többek között a plazmidok, kozmidok, vírusok és „YAC”-k („Yeast Artificial

Chromosome”, vagyis mesterséges élesztő kromoszóma), amelyek tartalmazzák a replikációhoz és az expresszióhoz szükséges kontrollrégiokat. Az expressziós vektort gazdasejtben expresszálhatjuk. Erre alkalmas gazdasejtek például a baktériumok, az élesztő- vagy az emlőssejtek. Ezek a módszerek közismertek a technika állása szerint (Sambrooke és munkatársai Molecular Cloning: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989.)

A rekombináns DNS-módszerekkel a marha savófehérje (melynek szekvenciáját itt közöljük) gazdasejtben előállítható.

Így a találmány tárgyát képezi továbbá egy, a marha savófehérjét kódoló cDNS a (3. azonosító számú szekvencia), valamint a marha savófehérje, amelynek szekvenciáját a 2. azonosító számon adtuk meg. Nyilvánvaló, hogy fragmensek is előállíthatóak a találmány leírásában foglalt kitanításának megfelelően. A „fragmens” elnevezés bármely aminosavszekvenciát jelenthet, amely a jelen találmány oltalmi körébe tartozó fehérjékkel közös eredetű, szerkezetű és működési mechanizmusú fehérje aminosavszekvenciájának része.

A találmány szerinti arthritogénikus fehérjék megfelelő fragmenseit előállíthatjuk a peptidszintézis ismert szerves kémiai módszereinek egyikével. A peptidszintézis szerves kémiai módszerei a kívánt aminosavak kondenzációs reakcióval történő, homogén fázisú vagy akár úgynevezett szilárd fázisú összekapcsolását jelentik. A fenti kondenzációs reakciók legáltalánosabb módszerei: a karbodiimid-, az azid-, a vegyes anhidrid- és az aktivált észterek módszere [The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology 1–3. Szerk. Gross, E. és Meienhofer, J. (1979, 1980, 1981) Academic Press, Inc.].

A fent ismertetett HC gp-39 és a találmány szerinti arthritogénikus fehérjék alkalmas fragmenseinek találmány szerinti „szilárd fázisú” előállításának leírását például a J. Amer. Chem. Soc. 85, 2149 (1963) és az Int. J. Peptide Protein Res. 35: 161–214 (1990). közleményekben találjuk meg.

Egy előnyösen alkalmazható szilárd fázis például a p-alkoxi-benzil-alkohol gyanta, melyet Wang írt le [J. Am. Chem. Soc. 95: 1328 (1974)]. A szintézis után a peptidet enyhe körülmények között le lehet hasítani a szilárd fázisról.

A szintézis után a kívánt aminosavszekvenciát lehasítják a gyantáról (hordozóról) például trifluor-ecetsavval, mely gyökfogókat, például triizopropil-szilánt, anizolt vagy etándiolt, esetleg tioanizolt tartalmaz.

A reaktív csoport, amely nem vehet részt a kondenzációs reakcióban, mint említettük, hatásonként védhető olyan csoportokkal, melyeket később savval vagy bázissal történő hidrolízissel vagy redukcióval eltávolíthatunk. A lehetséges védőcsoportokról bővebb ismertetőt találunk a The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology c. kiadvány 1–9 kötetében (Szerk. Gross, Udenfriend és Meienhofer; Academic Press, 1979–1987). A védőcsoportokat számos hagyományos módszerrel lehasíthatjuk, az egyes csoportok természetétől függően, például trifluor-ecetsavval vagy enyhe redukcióval katas-

lizátoron, például palládiumon történő hidrogénezéssel vagy HBr-dal, jégecetben.

Habár paradoxonnak tűnik, hogy az immunrendszert ugyanazzal az antigénnel deszenzitizáljuk, amely az immunrendszer aktiválásáért felelős, ez a deszenzitizálás azon a régi megfigyelésen alapul, hogy azok az állatok, melyeket egy antigénnel vagy epitóppal etettek vagy azt inhaláltatták velük, kevésbé voltak képesek szisztémás immunválasz kifejtésére az említett antigénnel, illetve epitóppal szemben, amikor ezek a keringésbe kerülnek. Így a HC gp-39 és/vagy a HC gp-39 aminosavszekvenciájával, közelebbről a YKLVCCYYTWSQYREGDGSCFPDALDRFLCTHIIYSFANISND (1. a. számú) aminosavszekvenciával legalább 50%-ban homológ aminosavszekvenciát tartalmazó fehérjék kontrollált adagolása hatásos lehet az immunrendszer deszenzitizációjában. A találmány szerinti fehérjék fragmensei, amelyek képesek deszenzitizálni a betegeket a HC gp-39-cel szemben, szintén a találmány oltalmi körébe tartoznak.

A találmány szerinti megoldásban az autoreaktív T-sejtek okozta porcbántalmakban szenvedő betegek kezelhetőek olyan gyógyászati készítménnyel, amely a HC gp-39-et, a HC gp-39 aminosavszekvenciájával, közelebbről a YKLVCCYYTWSQYREGDGSCFPDALDRFLCTHIIYSFANISND (1. a. számú) aminosavszekvenciával legalább 50%-ban homológ aminosavszekvenciát tartalmazó fehérjék közül egyet vagy többet, vagy a találmány szerinti fehérjék egy vagy több fragmensét, valamint egy gyógyászatilag elfogadott hordozót tartalmaz; a kezelés célja a betegek specifikus T-sejtjeinek HC gp-39 iránti toleranciájának indukálása és a gyulladásos reakció mértékének csökkentése.

A találmány szerinti gyógyászati készítményben alkalmazható fehérjék, melyek a HC gp-39 aminosavszekvenciájával, közelebbről a YKLVCCYYTWSQYREGDGSCFPDALDRFLCTHIIYSFANISND (1. a. számú) aminosavszekvenciával legalább 70%-os, előnyösen 80%-os, előnyösebben 90%-os homológ aminosavszekvenciát tartalmaznak.

A találmány szerinti gyógyászati készítményben előnyösen alkalmazható fehérjék például a sertés heparinkötő 38 kDa-os fehérje, a marha 39 kDa-os savófehérje, az egér „*breast regressing*” (brp 39) fehérje, az egérpetevezeték-specifikus glikoprotein, a hörcsögpetevezeték-specifikus glikoprotein, a marhapetevezeték-specifikus glikoprotein, a humán YKL-39, a humánpetevezeték-specifikus glikoprotein, a humán kitoriozidáz prekursor protein és az egér YM-1 szekretoros prekursor fehérje.

A találmány szerinti gyógyászati készítményben szintén előnyösen alkalmazhatóak DNS (expressziós) vektorok is, melyek a HC gp-39-et, vagy a HC gp-39 aminosavszekvenciájával, közelebbről a YKLVCCYYTWSQYREGDGSCFPDALDRFLCTHIIYSFANISND (1. a. számú) aminosavszekvenciával legalább 50%-ban homológ fehérjét, vagy a találmány szerinti fehérjék fragmenseit kódoló DNS-t tartalmaznak. A DNS expressziós vektort célba juttatva expresszió révén a rekombináns HC gp-39, vagy a HC

gp-39 aminosavszekvenciájával, közelebbről a YKLVCCYYTWSQYREGDGSCFPDALDRFLCTHIIYSFANISND (1. a. számú) aminosavszekvenciával legalább 50%-ban homológ aminosavszekvenciát tartalmazó fehérje, vagy a találmány szerinti fehérjék fragmensei olyan szintet érhetnek el, mint ami HC gp-39-et vagy a peptideket tartalmazó gyógyászati készítmény közvetlen (direkt) alkalmazásakor elérhető.

A HC gp-39 autoantigénnek, vagy a HC gp-39 aminosavszekvenciájával, közelebbről a YKLVCCYYTWSQYREGDGSCFPDALDRFLCTHIIYSFANISND (1. a. számú) aminosavszekvenciával legalább 50%-ban homológ aminosavszekvenciát tartalmazó arthritogénikus fehérjéknek, vagy a találmány szerinti fehérjék fragmenseinek az az előnye, hogy specifikus „tolerizáló” hatásuk csak az autoreaktív T-sejtekkel szemben érvényesül, így érintetlenül hagyják az immunrendszer más komponenseit, ellentétben a nem specifikus immunszuppresszív gyógyszerek nem specifikus immunszuppresszív hatásaival. Az autoantigénnel, vagy a HC gp-39 aminosavszekvenciájával, közelebbről a YKLVCCYYTWSQYREGDGSCFPDALDRFLCTHIIYSFANISND (1. a. számú) aminosavszekvenciával legalább 50%-ban homológ aminosavszekvenciát tartalmazó arthritogénikus fehérjékkel, vagy a találmány szerinti fehérjék fragmenseivel történő kezelés biztonságos és nincs toxikus mellékhatása.

A tolerancia elérhető a találmány szerinti autoantigén vagy a találmány szerinti fehérjék magas vagy alacsony dózisaival. A dózis általában 0,01–1000 µg peptid testsúly-kilogrammonként, előnyösebben 0,5–500 µg, még előnyösebben 0,1–100 µg lehet.

Farmakológiai hordozók lehetnek a medicinában általánosan használtak, például steril sóoldat, laktóz, szacharóz, kalcium-foszfát, zselatin, dextrin, agar, pektin, mogyoróolaj, olívaolaj, szezámolaj vagy víz. Hordozó lehet például II. osztályú MHC molekula szükség szerint liposzómákba burkolva.

A találmány szerinti gyógyászati készítmény alkotóeleme lehet ezenfelül egy vagy több adjuváns. Megfelelő adjuváns többek között az alumínium-hidroxid, alumínium-foszfát, amfigén, a tokofenolok, monofoszfénil lipid-A, muramil dipeptid és a szaponinok, mint például a Quill A. Az adjuváns mennyiségét az adjuváns természete szabja meg.

A találmány szerinti gyógyászati készítmény ráadásul tartalmazhat egy vagy több stabilizátort, például szénhidrátokat, ezen belül szorbitolt, mannitolt, keményítőt, szacharóz-dextrint és glükózt; vagy fehérjéket, például albumint, kazeint; és puffereket, például alkáli foszfátokat.

Megfelelő beadási mód lehet az intramuszkuláris injekció, szubkután injekció, intravénás injekció, intraperitoneális injekció, orális és intranazális adagolás. Előnyös az orális és az intranazális adagolás.

Arthritogénikus természetének köszönhetően a HC gp-39 éppúgy, mint a HC gp-39 aminosavszekvenciájával, közelebbről a YKLVCCYYTWSQYREGDGSCFPDALDRFLCTHIIYSFANISND (1. a. számú) aminosavszekvenciával legalább 50%-ban homológ amino-

savszekenciát tartalmazó fehérjék felhasználhatóak klinikai arthritis indukálására állatokban. Kis mennyiségű HC gp-39, vagy egy vagy több, a HC gp-39 aminosavszekvenciájával, közelebbről a YKLVCY-YTWSQYREGD GSCFPDALDRFLCTHIIYSFANISND (1. a. számú) aminosavszekvenciával legalább 50%-ban homológ aminosavszekvenciát tartalmazó fehérje, vagy a találmány szerinti fehérjékből származó egy vagy több fragmens adagolása az állatokban arthritisra emlékeztető tünetek fejlődnek ki. A Balb/c transzgenikus egereknél a HC gp-39 fehérje, vagy egy vagy több, a HC gp-39 aminosavszekvenciájával, közelebbről a YKLVCY-YTWSQYREGD GSCFPDALDRFLCTHIIYSFANISND (1. a. számú) aminosavszekvenciával legalább 50%-ban homológ aminosavszekvenciát tartalmazó fehérje egyszeri, subcutan injektálására arthritis jelei mutatkoztak. A HC gp-39 által indukált betegség, ugyanúgy, mint a HC gp-39 aminosavszekvenciájával, közelebbről a YKLVCY-YTWSQYREGDGSCFPDALDRFLCTHIIYSFANISND (1. a. számú) aminosavszekvenciával legalább 50%-ban homológ aminosavszekvenciát tartalmazó fehérje által indukált betegség lefolyását a mellső és/vagy a hátsó lábakon periodikus visszaesés jellemzi, és az enyhe arthritis fokozatosan súlyosabb formát ölt. Az érintett ízületek szimmetrikus eloszlását is megfigyelték, ami a periodikus visszaeséssel és a csomóképződéssel együtt az arthritis, különösen a RA lefolyására emlékeztet.

Az érintett állatok így megfelelő állati modellt nyújtanak az arthritis iniciációjának és progressziója mechanizmusának tanulmányozására. Ráadásul az említett állatok felhasználhatóak az arthritis kezelésére alkalmas hatóanyagok keresésére és a gyógyszereknek az arthritis lefolyására gyakorolt hatásának tanulmányozására. Előnyösen egerek használhatóak az arthritis, különösen a rheumatoid arthritis modellállataként.

Az említett állatokban arthritis indukálására a HC gp-39 vagy a találmány szerinti fehérje megfelelő mennyiségét kell adagolni. Megfelelő mennyiség 0,1-1000 µg, előnyösen 1-100 µg, előnyösebben 10-50 µg testsúly-kilogrammonként. A HC gp-39, vagy a HC gp-39 aminosavszekvenciájával, közelebbről a YKLVCY-YTWSQYREGDGSCFP DALDRFLCTHIIYSFANISND (1. a. számú) aminosavszekvenciával legalább 50%-ban homológ fehérje, vagy ezek fragmenseinek mennyisége az adagolás módjától, az adagolás időtartamától és az állat fajtájától függ. Az adagolás megfelelő módja a leírtakkal megegyezik. Az arthritis indukálására a HC gp-39, vagy a HC gp-39 aminosavszekvenciájával, közelebbről a YKLVCY-YTWSQYREGDGSCFPDALDRFLCTHIIYSFANISND (1. a. számú) aminosavszekvenciával legalább 50%-ban homológ aminosavszekvenciát tartalmazó fehérjék vagy a találmány szerinti peptidok tartalmazhatnak egyet vagy többet a már leírt stabilizátorok és adjuvánsok közül.

A HC gp-39, a HC gp-39 aminosavszekvenciájával, közelebbről a YKLVCY-YTWSQYREGDGSCFPDALDRFLCTHIIYSFANISND (1. a. számú) ami-

nosavszekvenciával legalább 50%-ban homológ aminosavszekvenciát tartalmazó fehérjék vagy ezek találmány szerinti fragmensei rendkívül alkalmasak diagnosztikus eljárásban való alkalmazásra, az ízületi porcok krónikus gyulladásban szerepet játszó aktivált autoreaktív T-sejtek kimutatására.

A találmány szerinti diagnosztikai eljárást a következő lépések alkotják:

- a) az egyén vérmintájából perifériás mononukleáris vérsejtek (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) izolálása;
- b) az említett PBMC-sejtek tenyésztése alkalmas körülmények között;
- c) az említett PBMC-kultúra inkubálása a találmány szerinti autoantigénnel, fehérjével vagy ezek fragmentseivel; és
- d) a T-sejt-válasz – például proliferatív reakció – detektálása, amely az egyén aktivált autoreaktív T-sejtjeinek jelenlétére utal.

Abban az esetben, ha válaszreakcióként az autoreaktív T-sejtek proliferatív reakcióját mérjük, radioizotópok, például <sup>3</sup>H-timidin beépülésével követhetjük a proliferációt. Az autoreaktív T-sejtek reakciója PBMC-k jelenlétében is mérhető a citokinekibocsátás mérésével, citokinspecifikus ELISA-val, vagy a citotoxicitás meghatározása révén, az <sup>51</sup>króm kibocsátásának mérésével. Egy másik detektálási módszer az aktivációs markerek, például az IL-2R mérése FACS-analízissel. Így a találmány tárgyát képező diagnosztikai készítmény, mely a találmány szerinti egy vagy több peptidet, és megfelelő detektáló reagenst tartalmaz. A detektálás módjától függően a detektáló reagens lehet radioizotóp, enzim, vagy a sejtfelületre, illetve aktivációs markerekre specifikus antitestek.

Szintén a találmány tárgyát képezik kimutatási reagenskészletek, melyek a találmány szerinti egy vagy több peptidet tartalmaznak. Ezek a reagenskészletek alkalmasak a találmány szerinti diagnosztikai eljárásban való alkalmazásra.

Így a találmány szerinti eljárás alkalmas annak megállapítására, hogy jelen vannak-e HC gp-39-reaktív autoagresszív T-sejtek a T-sejt közvetített porckárosodásban, például arthritisben, közelebbről rheumatoid arthritisben szenvedő betegekben. Ha jelen vannak HC gp-39-re specifikus T-sejtek, akkor a T-sejtek toleranciájának kiváltásával a HC gp-39-et, vagy a HC gp-39 aminosavszekvenciájával, közelebbről a YKLVCY-YTWSQYREGDGSCFPDALDRFLCTHIIYSFANISND (1. a. számú) aminosavszekvenciával legalább 50%-ban homológ aminosavszekvenciát tartalmazó arthritogenikus fehérjéket vagy a találmány szerinti peptideket vagy ezek kombinációit tartalmazó gyógyászati készítmény készíthetjük vagy megakadályozhatjuk az arthritis kialakulását.

Az alábbiakban a találmány szerinti megoldást példák segítségével szemléltetjük amelyek azonban nem szűkítik annak oltalmi körét.

Itt adjuk meg az ábrák rövid leírását.

1. ábra.: Az arthritis iniciációja és progressziója a HC gp-39-cel kezelt és nem kezelt Balb/c egereknél.

AS=„arthritic score”, „találat”; az összes arthritisre utaló esemény a kezelt állatoknál a kezelés után. N=az érintett állatok száma az érzékenyítést követően.

2. ábra: Az arthritis iniciációja és progressziója Balb/c egereknél 0,2 µg, 1 µg, 5 µg, és 25 µg marha-savófehérje beadása után. A kezelés utáni iniciációt és a progressziót az akkumulatív találat/nap (összes találat az érintett állatoknál) jellemzi.

### 1. példa

#### Módszerek

A HC gp-39 tisztítása MG63 oszteosarkóma-sejtvonalból

Az MG63 (ATCC CRL 1427 humán osteosarcoma) sejteket sejtenyészítő készülékekben tenyésztették DMEM/HAM F12 szérummentes médiumban. A HC gp-39-et a sejtfelülűszóból heparin affinitáskromatográfiával, majd *super dex 75* kromatográfiával tisztítottuk. A tisztaságot SDS-PAGE-sel ellenőriztük. Az N-terminális aminosav-szekvenálás igazolta, hogy a fehérje azonos a Hakala és munkatársai által leírt fehérjével.

A HC gp-39 arthritogén jellege Balb/c egereknél

2×4 nőtény Balb/c egér (Harlan CPB, Zeist, Hollandia) mellkasába 10 vagy 50 µg tisztított HC gp-39 [PBS-ben (0,5 M NaCl, 0,01 M nátrium-foszfát-puffer, pH 7,5)] és inkomplett Freund-adjuváns (IFA) 1:1 arányú elegyét beadtuk subcutan injekcióban, míg 4 kontrollállatot PBS-sel (1:1 arányban IFA-sal keverve) oltottunk be. A klinikai arthritis tüneteinek jelentkezését naponta ellenőriztük. Az arthritis súlyosságának mértékének elbírálásakor minden végtagot 0–3 közötti

értékben pontoztunk (Glant és munkatársai közleménye alapján). Röviden: 0 pont: nincs változás, 1 pont: eritéma (bőrpír) és duzzanat, 2 pont: duzzanat és deformitás megjelenése, 3 pont: mozgásképtelenség a nyújtó- és hajlítóképeség elvesztése miatt.

*Tolerancia indukciója a HC gp-39 intranazális beadásával*

Intranazálisan 28 µg fehérjét adtunk be (2×10 µl-t) 10 nőtény Balb/c egernek (*Enflurance* alkalmazásával, enyhe altatásban), PT45 mikrocsovezeték és Hamilton fecskendő segítségével. Az antigént az arthritiszindukció előtti 15., 10. és 5. napon adtuk. A kontrollállatokat ugyanúgy a kezeltük, de ők csak a puffert (PBS) kapták (1. táblázat).

15 Az immunológiai toleranciát a késői típusú hiperszenzitivitás (delayed type hypersensitivity, DTH) reakció mérésével, a fent ismertetett, 0. napon történt szenzitizáció után, 10 µg fehérje felhasználásával határoztuk meg. A 0. napon történő szenzitizáció után a 8. napon a 10 µg HC gp-39-et injektáltunk 50 µl térfogatban a bal hátsó talpba (reakció kiváltása). A DTH-reakciót a talp méretének növekedése adja meg: ((bal oldali duzzadás (mm×10<sup>-3</sup>)/jobb oldali duzzadás (mm×10<sup>-3</sup>))×100%.  
20 A talp duzzadását háziilag készített mikrométerrel határoztuk meg a reakció kiváltása után 0, 24 és 48 órával.

25 Az arthritiszindukcióval szembeni toleranciát az egereknél tovább vizsgáltuk a szenzitizációt követő 31. napig; az klinikai tünetek megjelenését naponta ellenőriztük. Az arthritis súlyosságának mértékét a már ismertetett módon bíráltuk el.  
30

### 1. táblázat

A tolerancia kiváltásának sémája

Nap	Tolerancia kiváltása HC gp-vel	Nem kezelt
-15	28 µg HC gp-39 intranazálisan	PBS
-10	28 µg HC gp-39 intranazálisan	PBS
-5	28 µg HC gp-39 intranazálisan	PBS
0	10 µg HC gp-39 subcutan	10 µg HC gp-39 subcutan
8	10 µg HC gp-39 a talpba	10 µg HC gp-39 a talpba
9	24 órás DTH	24 órás DTH
10	48 órás DTH	48 órás DTH
0-31	Az arthritistünetek száma (találat)	Az arthritistünetek száma (találat)

DTH: késleltetett típusú hiperszenzitivitás. PBS: 0,5 M NaCl, 0,01 M nátrium-foszfát puffer, pH 7,5

### Eredmények

#### A HC gp-39 arthritogén jellege

Az 50 µg, IFA-val kevert Hc gp-39 injektálását követően minden egernél fokozatosan súlyos arthritis jelei mutatkoztak (2. táblázat). Az arthritis tüneteit először a négy egér közül három mellső végtagjain, 15–20 nappal a szenzitizáció után figyeltük meg. Annál az egernél, amelyik mellső végtagjain nem jelentkeztek tünetek, 34 nappal a szenzitizáció után a hátsó

végtagokon alakult ki az arthritis. A HC gp-39 által indukált betegség lefolyását a mellső és/vagy a hátsó lábakon periodikus visszaesés jellemzi, és az enyhe arthritis fokozatosan súlyosabb formát ölt (a betegség lefolyását 62 napig figyeltük). Igen gyakran (>50%) figyeltük meg az érintett ízületek szimmetrikus eloszlását, vagyis a mellső és a hátsó végtagoknál a két lábon ugyanabban az időben jelentkeztek a tünetek.

Hasonlóképpen hajtottuk végre az arthritis indukcióját, mikor IFA-val keverve 50 µg helyett 10 µg HC gp-39-et alkalmaztunk. Az arthritisre jellemző „találatok” száma kissé alacsonyabb volt (az adatokat nem tüntettük fel). A négy egér közül háromnál fejlődött ki súlyos arthritis. Az egyik egérmél a kísérlet folyamán csak enyhe tünetek jelentkeztek. A kísérlet teljes időtartama alatt a kontrollegereknél nem mutatkoztak az arthritis jelei.

Összefoglalva, a 10 és az 50 µg fehérje is megfelelő mennyiségű volt progresszív arthritis indukálására Balb/c egereknél. A HC gp-39-cel történő arthritis-indukció krónikus természetű, melyet periodikus visszaesés és az érintett ízületek szimmetrikus eloszlása jellemez, a rheumatoid arthritis (RA) lefolyására emlékeztet.

2. táblázat

Az arthritis iniciációja és progressziója HC gp-39-cel szenitizált Balb/c egereknél

Szenitizáció (n=4)	Az arthritis megjelenése (nap)		Az arthritis tünetei		
	MV	Hv	nincs	enyhe	súlyos
PBS kont.	–	–	4	0	0
10 µg HC gp-39	–, 13, 15, 57	32, 34, 36, 43	0	1	3
50 µg HC gp-39	13, 15, 15, 48	29, 34, 34, 53	0	0	4

MV: mellső végtag. HV: hátsó végtag. Kont.: kontrollok. Az arthritis tünetei: nincs: találat=0; enyhe: a találat állatonként kevesebb, mint 2; súlyos: a találat állatonként  $\geq 3$ .

#### Az immunológiai tolerancia DTH-vizsgálattal meghatározott mértéke

A 0. napon HC gp-39-cel beoltott, kontrollként alkalmazott egerek erős, antigénspecifikus DTH reakciót adtak, amely azt sugallja, hogy a HC gp-39-cel történő szenitizációval celluláris immunválaszt váltottunk ki. Ezzel szemben a HC gp-39 intranazális beadása teljes mértékben megakadályozta az antigénre adott DTH reakciót, ami azt mutatja, hogy a HC gp-39-specifikus T-sejtek valóban toleránssá váltak.

55 Figyelemre méltó, hogy a nem „tolerizált” 10 állatból 4-nél a provokáció helyével szomszédos bokánál arthritis alakult ki. Ezzel szemben a toleranciaindukált („tolerizált”) csoportban nem alakult ki arthritis a provokáció helyével szomszédos ízületekben, ami valószínűsíti, hogy a HC gp-39 iránti immunológiai tolerancia az arthritis kialakulásával szemben védelmet nyújt.

3. táblázat

A HC gp-39-re adott DTH válaszreakciók a nazális kezeléssel történő tolerancia-indukciót követően

Kezelés	Átlagos %-os duzzadás			Arthritis a bokánál
	0 óra	24 óra	48 óra	
kontroll (n=10)	–1,3	31,4	38,6	4/10
tolerizált (n=9)	–0,05	3,7	1,5	0/9

#### Az arthritis indukciója vagy progressziója iránti tolerancia

A HC gp-39-cel toleranciaindukált és nem kezelt Balb/c egereket tovább vizsgáltuk az arthritis iniciációja és progressziója szempontjából.

A betegséget a (nem tolerizált) kontrollcsoport minden tagjánál HC gp-39-cel történő szenitizálással váltottuk ki (4. táblázat). Hét egérmél súlyos arthritis alakult ki, azonban háromnál csak enyhe tüneteket jelentkeztek (maximum 2. találat). Ezzel ellentétben a HC gp-39-cel tolerizált csoportból öt egyed a kísérlet időtartama alatt védett volt a betegséggel szemben. Ráadá-

50 sul a tolerizált csoportból két egyed csak enyhe tüneteket mutatott, rövid ideig. Három állatnál fejlődött ki súlyos arthritis, melyet 4-es találati szám jellemez.

55 Érdekes módon a tolerizált állatoknál az arthritis a hátsó- és a mellső végtagokon legalább 7, illetve 9 nap késéssel jelentkezett (1. ábra). Habár a tolerizált csoportban kevesebb állat betegedett meg, a mellső végtagokon az egy állatra eső „arthritis-találat” a nem tolerizált állatok találati számával összevethető volt. Az egy állatra jutó találati szám viszont a hátsó végtagokon a tolerizált állatoknál kissé alacsonyabb volt (1. ábra).



4. táblázat

Az arthritis iniciációja és progressziója HC gp-39-cel tolerizált és a nem tolerizált Balb/c egereknél

Állatok	Az arthritis kezdete (nap)	Az arthritis tünetei		
		nincs	enyhe	súlyos
kontroll (n=10)	13-16	0	3	7
tolerizált (n=10)	23-24	5	2	3

Az arthritis kezdete: az első tünet megjelenése – a nap, melyen a legtöbb állat megbetegedett.

Az arthritis tünetei: nincs: találat=0; enyhe: a találat állatonként kevesebb, mint 2; súlyos: a találat állatonként  $\geq 4$ .

A fenti kísérletek a HC gp-39 arthritogénikus természetét igazolják Balb/c egereknél. A HC gp-39 által indukált betegség lefolyását a mellő és/vagy a hátsó lábakon periodikus visszaesés jellemezte, és az enyhe arthritis fokozatosan súlyosabb formát öltött. Az érintett ízületek szimmetrikus eloszlását is megfigyeltük, ami a periodikus visszaeséssel és a csomóképződéssel együtt a rheumatoid arthritis lefolyására emlékeztetett. A HC gp-39 heves arthritogén jellegét 10, illetve 50  $\mu\text{g}$  fehérje egyszeri, subcutan injektálásával demonstráltuk; ez minden állatnál arthritis tüneteinek megjelenését okozta. Azt, hogy a HC gp-39-szenzitizáció során valóban aktiváltuk a HC gp-39-specifikus T-sejteket, HC gp-39-specifikus DTH válaszreakció indukációjával mutattuk ki. Ezeket az eredményeket a HC gp-39-cel a talpukon immunizált állatok in vitro kiváltott proliferatív válaszreakciójának demonstrációjával is megerősítettük (az adatokat nem ismertettük). Meg kell jegyeznünk, hogy a nem tolerizált állatokon az injektálás mellett a bokán arthritis fejlődött ki, ami valóban a HC gp-39-specifikus T-sejtek arthritoid indukációban való szerepét valószínűsíti.

A peptid intranazális adagolását az antigénspecifikus immuntolerancia indukálása céljából alkalmaztuk. A kísérletek eredményei azt mutatták, hogy a HC gp-39 intranazális adagolása az immunológiai válaszreakció elmaradását okozza. A HC gp-39-cel tolerizált egereknél szenzitizációt követő DTH reakció teljesen elmaradt, míg a kontrollegereknél antigénspecifikus duzzadást tapasztaltunk. Ezek a megfigyelések azt valószínűsítik, hogy a HC gp-39-cel való kezelés periferális immuntoleranciához vezet.

A tíz állat közül, melyeknél nem váltottunk ki toleranciát, négyenél a szenzitizálást követő DTH-reakció a bokánál (a beoltott lábon) arthritisszel együtt jelentkezett. Ezzel szemben a HC gp-39-cel tolerizált állatoknál az ízületek valóban teljes védelmet nyertek, azt valószínűsítve, hogy az autoreaktív T-sejteket hatásosan elnémítottuk. Azt a véleményünket, hogy a HC gp-39-cel való toleranciaindukálás („tolerizálás”) védelmet nyújt a betegséggel szemben, tovább erősítette az a megfigyelés, hogy a tolerizált csoportban tíz állatból öt a kísérlet időtartama alatt teljes védelemben részesült. Habár a csoport másik öt egyedén végül kifejlődtek a

15 klinikai tünetek, az arthritis jóval később jelentkezett. Így levonhatjuk azt a következtetést, hogy a HC gp-39-specifikus T-sejtek szerepet játszanak az arthritogénikus folyamatban és, ami még fontosabb, e T-sejtek toleranciájának találmány szerinti gyógyászati készítménnyel való előidézése az arthritis kialakulása késleltethető vagy megakadályozható.

#### 20 2. példa

##### Módszerek

##### A marha 39 kDa savófehérje arthritogén jellege Balb/c egereknél

25 4  $\times$  10 nőtény Balb/c eger (Charles River, Sulzfeld, Németország) mellkasi régiójába 0,2, 1,5 vagy 25  $\mu\text{g}$  marha 39 kDa savófehérje és inkomplett Freund adjuváns (IFA) 1:1 arányú elegyét 100  $\mu\text{l}$  térfogatban (0,5 M NaCl, 0,01 M nátrium-foszfát-puffer, pH 7,5) subcutan injekcióban beadtuk, míg 10 kontrollállatot PBS-sel (1:1 arányban IFA-sal keverve) oltottunk be. 30 A klinikai arthritis tüneteinek jelentkezését naponta ellenőriztük. Az arthritis súlyossága mértékének elbírálásakor minden végtagot 0–3 közötti értékben pontoztunk (Glant és munkatársai közleménye alapján). Röviden: 0 pont: nincs változás, 1 pont: eritéma (bőrpír) és duzzanat, 2 pont: duzzanat és deformitás megjelenése, 35 3 pont: mozgásképtelenség a nyújtó- és hajlítóképesség elvesztése miatt.

##### 40 A marha 39 kDa savófehérje cDNS klónozása

A marha emlőmirigy Lambda Bluemid(-) cDNS-könyvtárát (oligo-dT és a Clontech Laboratories Inc. cégnél készült random primerek felhasználásával) amplifikáltuk, gazdasejtként az XL1 Blue MRF sejt vonalat alkalmaztuk; a könyvtárlemezeket és a replika-filtereket a gyártó ajánlásainak megfelelően készítettük. A filtereket a HC gp-39 cDNS PvuII fragmentummal hibridizáltuk; a cDNS-t előzőleg oligojelölő készlettel (Pharmacia)  $^{32}\text{P}$ -ral jelöltük. A pozitív plakkokat 45 amplifikáltuk, és újra vizsgáltuk és a megfelelő fág DNS-inszertjét Thermostequeenase-készlettel (Amersham) megszekvenáltuk. A szekvenciát a 3. azonosító számú szekvencia írja le. A 954. nukleotidpozícióban az egyik klón C-t, a másik T-t tartalmazott.

##### 55 Eredmények

##### A marha 39 kDa savófehérje arthritogén jellege

60 25  $\mu\text{g}$  marha 39 kDa-os savófehérje és IFA elegyének injektálása után minden egéren fokozatosan kifejlődött az arthritis (5. táblázat). A szenzitizálás utáni 8–20. napon figyeltük meg először az arthritis tüneteit

a mellső és a hátsó végtagokon. A marha 39 kDa-os savófehérje által indukált arthritis lefolyását a mellső és/vagy a hátsó lábakon periodikus visszaesés jellemezte, és az enyhe arthritis fokozatosan súlyosabb formát öltött (a betegség előrehaladását 70 napig kísértük figyelemmel). Nagyon gyakran megfigyeltük az érintett ízületek szimmetrikus eloszlását is, vagyis a mellső vagy a hátsó végtagokon az arthritis tünetei mindkét oldalon egyszerre jelentkeztek.

Az arthritis indukcióját 25 µg helyett 5, 1 vagy 0,2 µg marha 39 kDa-os fehérje és IFA keverékének alkalmazásával a fentiekhez hasonlóan végeztük el.

Azok az egerek, melyeket 1 vagy akár 0,2 µg marha 39 kDa-os fehérjével indukáltunk, az arthritis enyhébb formájában betegedtek meg: 7, illetve 6 egéren fejlődött ki enyhe, míg mindössze 3, illetve 4 egyedén súlyosabb arthritis.

A kísérlet végén minden vizsgálati csoportra kiszámítottuk a kumulatív találatok számát egy kísérleti napra vonatkoztatva. A 25 µg marha 39 kDa-os savófehérjével történt immunizálás után 30 nap után maximá-

san 27 találatot értünk el, ezután határozott visszaesés mutatkozott. Mikor a marha 39 kDa-os savófehérje alacsonyabb dózisaival immunizáltunk, az állatok valamivel alacsonyabb arthritis-„pontszámot” kaptak, mint a 25 µg-os dózissal indukált egerek. Habár a találati szám alacsonyabb volt, az arthritis lefolyásának „visszaeső” jellege minden csoportban észlelhető volt.

A PBS-sel kezelt kontroll egereknél a mellső lábon csekély mértékű és átmeneti duzzadást figyeltük meg. Ezt a jelenséget a kezeletlen, nem injektált állatoknál is megfigyeltük.

A naponkénti átlagos kumulatív duzzadási érték ezeknél az egércsoportoknál 3,4-es átlagértéket ért el és ezt vettük a biológiai háttérnek.

Összefoglalva: a marha 39 kDa-os savófehérje (25, 5, 1 és 0,2 µg-os dózisa is) képes progresszív arthritis indukálására nőstény Balb/c egerekben. A marha 39 kDa-os savófehérje által indukált arthritis krónikus jellege, melyet a periodikus visszaesés és az érintett ízületek szimmetriája jellemez, a rheumatoid arthritis (RA) betegség lefolyására emlékeztet.

5. táblázat

Az arthritis iniciációja és progressziója marha 39 kDa-os savófehérjével Balb/c egerekben

Szenzitizáció (n=10)	Az arthritis megjelenése		Az arthritis tünetei		
	MV	HV	nincs	enyhe	súlyos
0,2 µg B 39 kDa savófehérje	-, -, -, -, -, -, -, -, 14, 18	8, 14, 14, 14, 18, 18, 18, 18, 30, 54	0	6	4
1 µg B 39 kDa savófehérje	-, -, -, -, -, 8, 12, 12, 16, 18	8, 8, 8, 8, 8, 8, 14, 16, 18, 18	0	7	3
5 µg B 39 kDa savófehérje	-, -, -, -, -, 8, 10, 10, 12, 14	16, 16, 18, 20, 30, 8, 8, 10, 12, 12	0	0	10
5 µg B 39 kDa savófehérje	-, -, -, -, -, -, -, -, 12	8, 8, 10, 12, 12, 14, 14, 18, 18, 20	0	1	9

MV: mellső végtag. Az arthritis tünetei: nincs: találat=0; enyhe: a találat állatonként kevesebb, mint 2; súlyos: a találat állatonként ≥3.

## SZEKVENCIALISTA

## AZ 1. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

HOSSZA: 42 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

## AZ 1. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Tyr Lys Leu Val Cys Tyr Tyr Thr Ser Trp Ser Gln Tyr Arg Glu Gly  
1 5 10 15

Asp Gly Ser Cys Phe Pro Asp Ala Leu Asp Arg Phe Leu Cys Thr His  
20 25 30

Ile Ile Tyr Ser Phe Ala Asn Ile Ser Asn Asp  
35 40

## A 2. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 383 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: kettős

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: cDNS

A 2. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Met	Gly	Leu	Arg	Ala	Ala	Gln	Thr	Gly	Phe	Val	Val	Leu	Val	Leu	Leu
1				5					10					15	
Gln	Ser	Cys	Ala	Ala	Tyr	Lys	Leu	Ile	Cys	Tyr	Tyr	Thr	Ser	Trp	Ser
			20					25					30		
Gln	Tyr	Arg	Glu	Gly	Asp	Gly	Ser	Cys	Phe	Pro	Asp	Ala	Ile	Asp	Pro
		35				40						45			
Phe	Leu	Cys	Thr	His	Val	Ile	Tyr	Ser	Phe	Ala	Asn	Ile	Ser	Asn	Asn
	50					55					60				
Glu	Ile	Asp	Thr	Trp	Glu	Trp	Asn	Asp	Val	Thr	Leu	Tyr	Asp	Thr	Leu
65					70					75					80
Asn	Thr	Leu	Lys	Asn	Arg	Asn	Pro	Asn	Leu	Lys	Thr	Leu	Leu	Ser	Val
				85					90					95	
Gly	Gly	Trp	Asn	Phe	Gly	Ser	Gln	Arg	Phe	Ser	Lys	Ile	Ala	Ser	Lys
			100					105					110		
Thr	Arg	Ser	Arg	Arg	Thr	Phe	Ile	Lys	Ser	Val	Pro	Pro	Phe	Leu	Arg
		115					120					125			
Thr	His	Gly	Phe	Asp	Gly	Leu	Asp	Leu	Ala	Trp	Leu	Tyr	Pro	Gly	Trp
	130					135					140				
Arg	Asp	Lys	Arg	His	Leu	Thr	Thr	Leu	Val	Lys	Glu	Met	Lys	Ala	Glu
145					150					155					160
Phe	Val	Arg	Glu	Ala	Gln	Ala	Gly	Thr	Glu	Gln	Leu	Leu	Leu	Ser	Ala
				165					170						175
Ala	Val	Pro	Ala	Gly	Lys	Ile	Ala	Ile	Asp	Arg	Gly	Tyr	Asp	Ile	Ala
			180					185						190	
Gln	Ile	Ser	Arg	His	Leu	Asp	Phe	Ile	Ser	Leu	Leu	Thr	Tyr	Asp	Phe
		195					200						205		
His	Gly	Ala	Trp	Arg	Gln	Thr	Val	Gly	His	His	Ser	Pro	Leu	Phe	Arg
	210					215					220				
Gly	Gln	Glu	Asp	Ala	Ser	Ser	Asp	Arg	Phe	Ser	Asn	Ala	Asp	Tyr	Ala
225					230					235					240
Val	Ser	Tyr	Met	Leu	Arg	Leu	Gly	Ala	Pro	Ala	Asn	Lys	Leu	Val	Met
				245					250					255	
Gly	Ile	Pro	Thr	Phe	Gly	Arg	Ser	Tyr	Thr	Leu	Ala	Ser	Ser	Lys	Thr
			260					265						270	
Asp	Val	Gly	Ala	Pro	Ile	Ser	Gly	Pro	Gly	Ile	Pro	Gly	Gln	Phe	Thr
		275					280						285		
Lys	Glu	Lys	Gly	Ile	Leu	Ala	Tyr	Tyr	Glu	Ile	Cys	Asp	Phe	Leu	His
	290					295					300				
Gly	Ala	Thr	Thr	His	Arg	Phe	Arg	Asp	Gln	Gln	Val	Pro	Tyr	Ala	Thr
305					310					315					320
Lys	Gly	Asn	Gln	Trp	Val	Ala	Tyr	Asp	Asp	Gln	Glu	Ser	Val	Lys	Asn
				325					330					335	
Lys	Ala	Arg	Tyr	Leu	Lys	Asn	Arg	Gln	Leu	Ala	Gly	Ala	Met	Val	Trp
			340					345					350		
Ala	Leu	Asp	Leu	Asp	Asp	Phe	Arg	Gly	Thr	Phe	Cys	Gly	Gln	Asn	Leu
		355					360					365			
Ala	Phe	Pro	Leu	Thr	Ser	Ala	Ile	Lys	Asp	Val	Leu	Ala	Glu	Val	
	370					375					380				

A 3. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 1152 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: cDNS

A 3. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

ATGGGGCTGA	GGGCGGCTCA	GACAGGTTTT	GTGGTCCTGG	TGCTGCTCCA	GAGCTGTGCT	60
GCATACAAGC	TGATCTGCTA	CTACACCAGC	TGGTCCCAGT	ACCGGGAGGG	TGATGGGAGC	120
TGCTTCCCAG	ACGCCATCGA	CCCCTTCTCTG	TGCACCCATG	TCATCTACAG	CTTTGCCAAC	180
ATAAGCAACA	ATGAGATCGA	CACCTGGGAG	TGGAATGACG	TGACGCTCTA	TGACACACTG	240
AACACACTCA	AGAACAGGAA	CCCCAACCTG	AAGACCCTCC	TATCTGTTGG	AGGATGGAAC	300
TTCGGTTTCTC	AAAGATTTTC	CAAGATAGCT	TCCAAGACCC	GGAGTCGCAG	GACTTTCATC	360
AAGTCGGTGC	CACCATTCT	GCGGACCCAT	GGCTTTGATG	GACTGGACCT	AGCATGGCTC	420
TACCCCGGGT	GGAGAGACAA	GCGGCATCTC	ACCACTCTGG	TCAAGGAAAT	GAAGGCTGAG	480
TTTGTAAGGG	AAGCCCAAGC	AGGCACAGAG	CAGCTTCTGC	TCAGTGCAGC	AGTACCTGCA	540
GGGAAGATTG	CTATTGACAG	AGGCTATGAC	ATCGCCCAGA	TATCCCGACA	CCTGGACTTC	600
ATCAGCCTTT	TGACCTATGA	CTTTCACGGA	GCCTGGCGCC	AGACAGTCGG	ACACCACAGC	660
CCCCTGTTTC	GAGGCCAGGA	AGATGCAAGT	TCTGACAGAT	TCAGTAACGC	TGACTACGCT	720
GTGAGCTACA	TGCTGAGGCT	GGGGGCTCCA	GCCAATAAGC	TGGTGATGGG	TATCCCCACT	780
TTTGGGAGGA	GCTACACTCT	GGCCTCTTCC	AAGACAGATG	TGGGAGCCCC	CATCTCAGGG	840
CCAGGAATTC	CAGGCCAGTT	CACCAAGGAG	AAAGGGATCC	TTGCCTATTA	TGAGATCTGT	900
GACTTCCTCC	ACGGAGCCAC	CACCCACAGA	TTCCGTGACC	AGCAGGTCCC	CTATGCCACC	960
AAGGGCAACC	AGTGGGTGGC	GTATGACGAC	CAGGAGAGTG	TCAAAAACAA	GGCACGGTAC	1020
CTGAAGAACA	GGCAGCTGGC	TGGCGCCATG	GTGTGGGCCC	TGGACTTGGA	TGACTTCCGG	1080
GGCACCTTCT	GTGGGCAGAA	CCTGGCCTTT	CCTCTCACAA	GTGCCATCAA	AGATGTGCTT	1140
GCTGAGGTGT	AG					1152

#### SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. T-sejt-toleranciát indukáló fehérje, amely a YKLVCIYT SWSQYREGDGSCFPDALDRFLC-THIISFANISND (1. azonosító számon megadott szekvencia) aminosavszekvenciával legalább 70%-os homológiát mutató aminosavszekvenciát tartalmaz, terápiás anyagként való alkalmazásra.

2. Az alábbi fehérjék bármelyike terápiás anyagként való alkalmazásra: sertés eredetű heparinkötő 38 kDa-os fehérje, marha eredetű 39 kDa-os savófehérje, emberi YKL-39 fehérje, egér „breast regressing” 39 kDa-os fehérje (brp39), humánpetevezeték-specifikus glikoprotein, egérpetevezeték-specifikus glikoprotein, hörcsögpetevezeték-specifikus glikoprotein, marhapetevezeték-specifikus glikoprotein, humán kitotriozidáz-prekursorfehérje, valamint egér YM-1 szekréciós fehérje prekursora és ezek fragmensei.

3. Gyógyászati készítmény, amely az YKLVCIYTSWSQ YREGDGSCFPDALDRFLC-THIISFANISND (1. azonosító számú) aminosavszekvenciával legalább 70%-ban homológ aminosavszekvenciát tartalmazó fehérjék közül egyet vagy többet, valamint gyógyászatiilag elfogadható hordozót tartalmaz.

4. Gyógyászati készítmény, amely gyógyászatiilag elfogadható hordozót, valamint az alábbi fehérjék közül egyet vagy többet tartalmaz: sertés eredetű heparinkötő 38 kDa-os fehérje, marha eredetű 39 kDa-os savófehérje, emberi YKL-39 fehérje, egér „breast regressing” 39 kDa-os fehérje (brp39), humánpetevezeték-specifikus glikoprotein, egérpetevezeték-specifikus glikoprotein, hörcsögpetevezeték-specifikus glikoprotein, marhapetevezeték-specifikus glikoprotein, humán kitotriozidáz-prekursorfehérje, valamint egér YM-1 szekréciós fehérje prekursora és ezek fragmensei.

5. YKLVCIYTSWSQYREGDGSCFPDALDRFLC-THIISFANISND (1. azonosító számú) aminosavszekvenciával legalább 70%-os homológiát mutató aminosavszekvenciát tartalmazó fehérje alkalmazása T-sejt-közvetített porckárosodásban szenvedő állatokban homológ autoantigénnel szembeni, specifikus T-sejt-tolerancia kiváltására szolgáló gyógyászati készítmény előállítására.

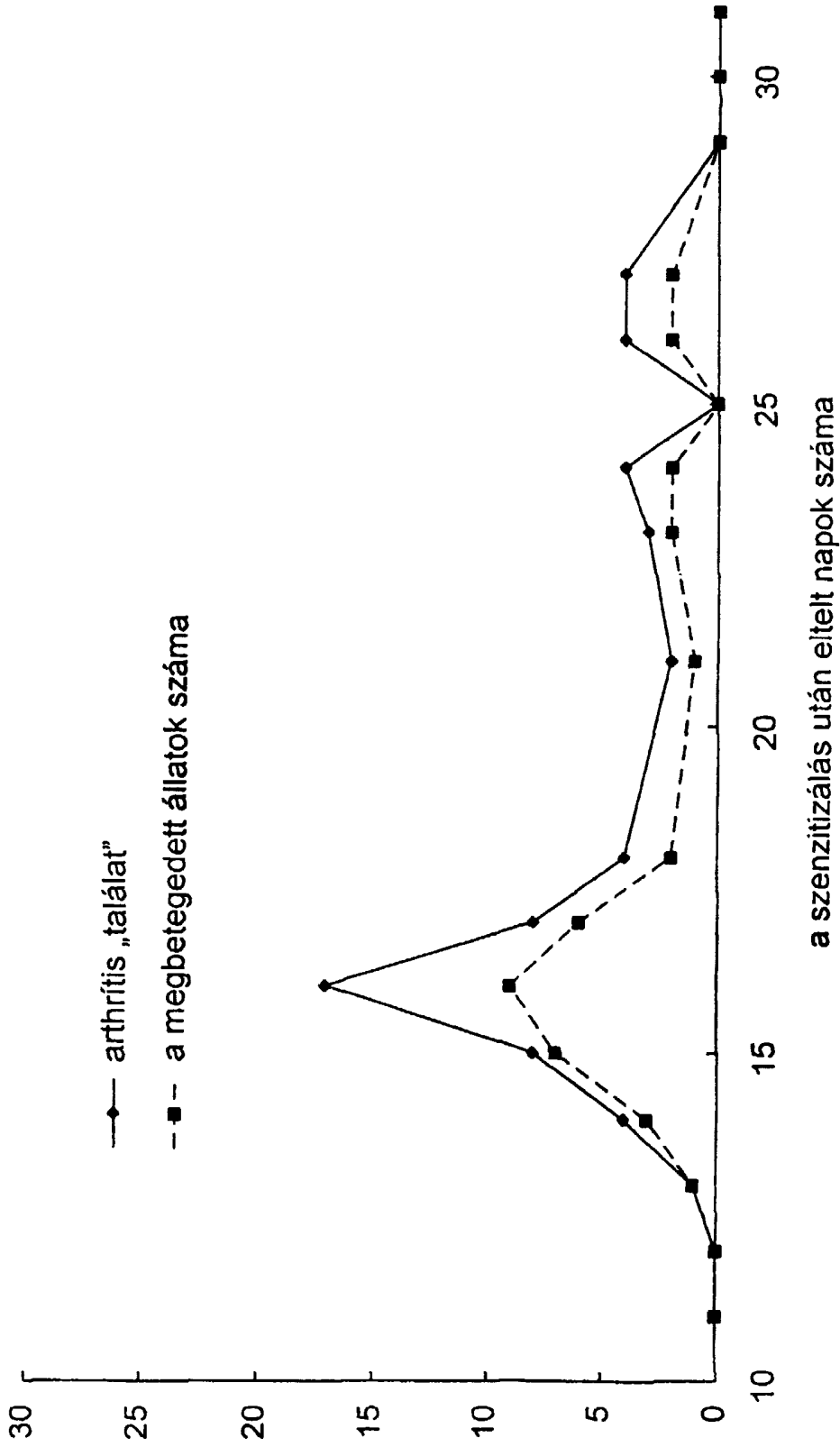
6. Az alábbi fehérjék közül egy vagy több alkalmazása T-sejt-közvetített porckárosodásban szenvedő állatokban homológ autoantigénnel szembeni, specifikus T-sejt-tolerancia kiváltására szolgáló gyógyászati készítmény előállítására: sertés eredetű heparinkötő 38 kDa fehérje, marha eredetű 39 kDa savófehérje, emberi YKL-39-fehérje, egér „breast regressing” 39 kDa fehérje (brp39), humánpetevezeték-specifikus glikoprotein, egérpetevezeték-specifikus glikoprotein, hörcsögpetevezeték-specifikus glikoprotein, marhapetevezeték-specifikus glikoprotein, humán kitotriozidáz-prekursorfehérje, valamint egér YM-1 szekréciós fehérje prekursora és ezek fragmensei.

7. YKLVCIYTSWSQYREGDGSCFPDALDRFLC-THIISFANISND (1. azonosító számú) aminosavszekvenciával legalább 70%-os homológiát mutató aminosavszekvenciát tartalmazó fehérje alkalmazása arthritis indukálására gyógyászati kutatásra szolgáló kísérleti állatokban, előnyösen egérben.

8. A marha eredetű 39 kDa-os savófehérje vagy emberi YKL-39-fehérje alkalmazása arthritis indukálására gyógyászati kutatásra szolgáló kísérleti állatokban, előnyösen egérben.

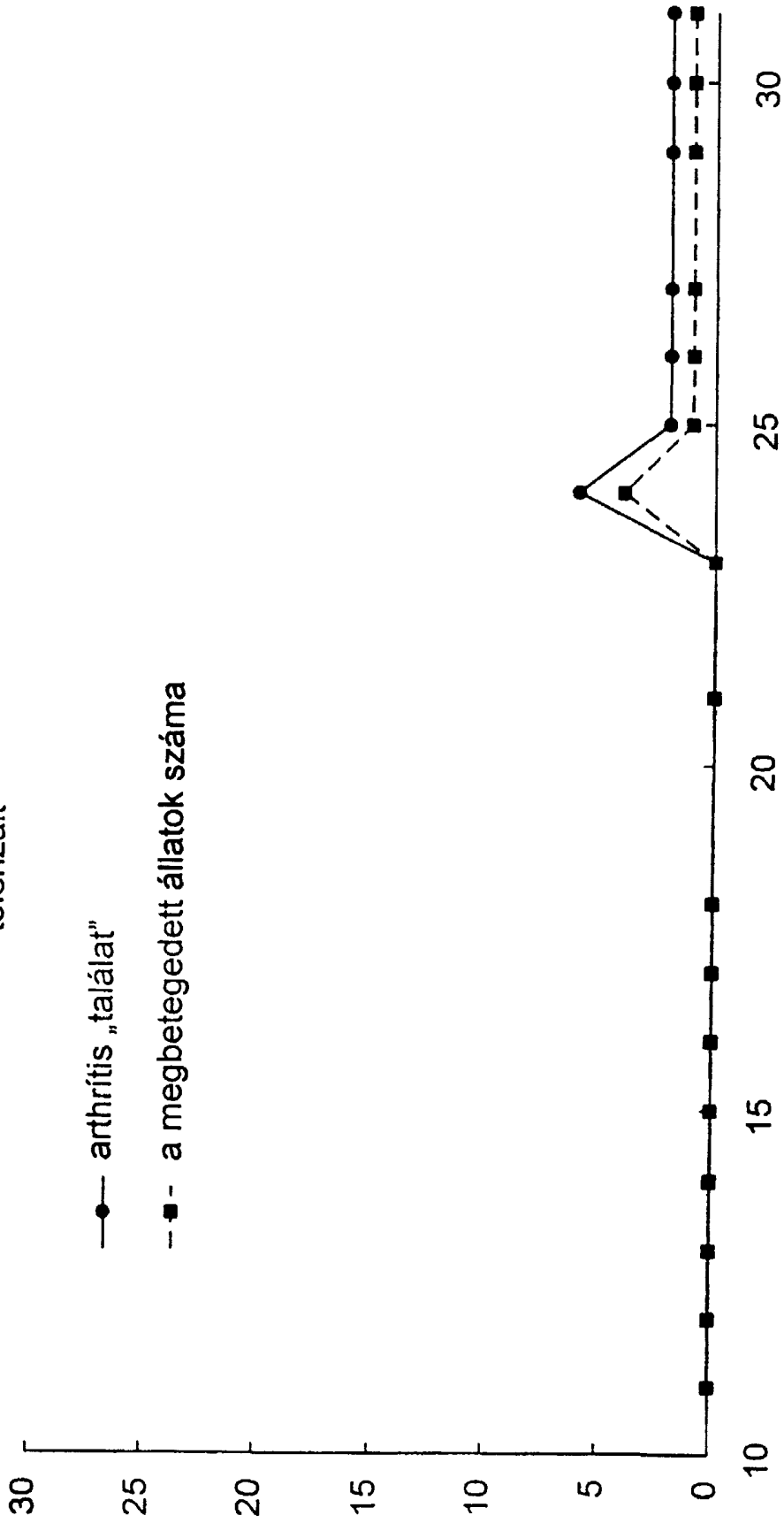
9. A 7. vagy 8. igénypont szerinti alkalmazással indukált arthritisben szenvedő állatok alkalmazása, arthritis kezelésére, előnyösen rheumatoid arthritis kezelésére szolgáló új drogok szkrínelésére.

Az arthritís „találatok” száma a mellső lábakon  
nem tolerizált



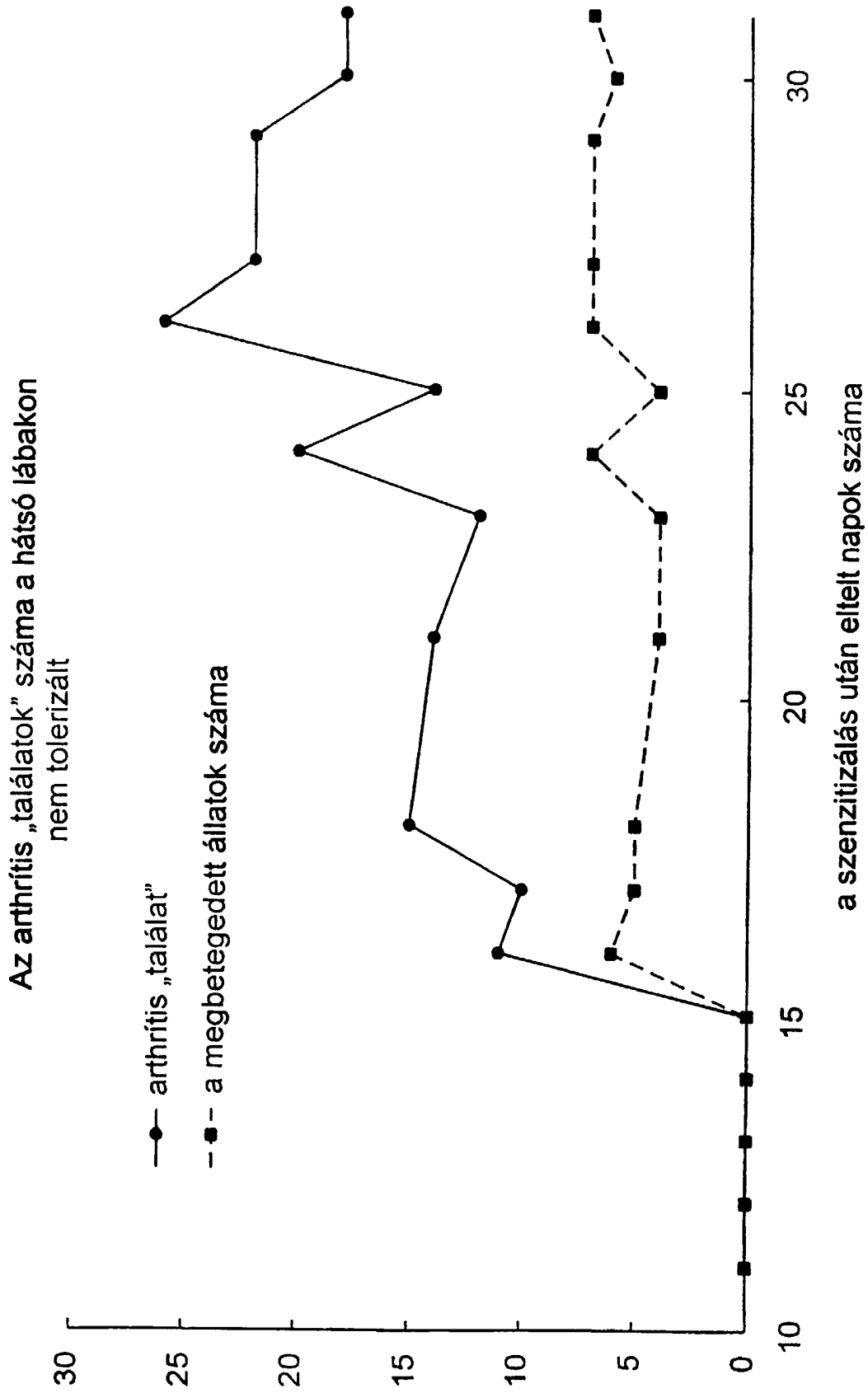
1A. ábra

Az arthritís „találatok” száma a mellső lábakon tolerizált



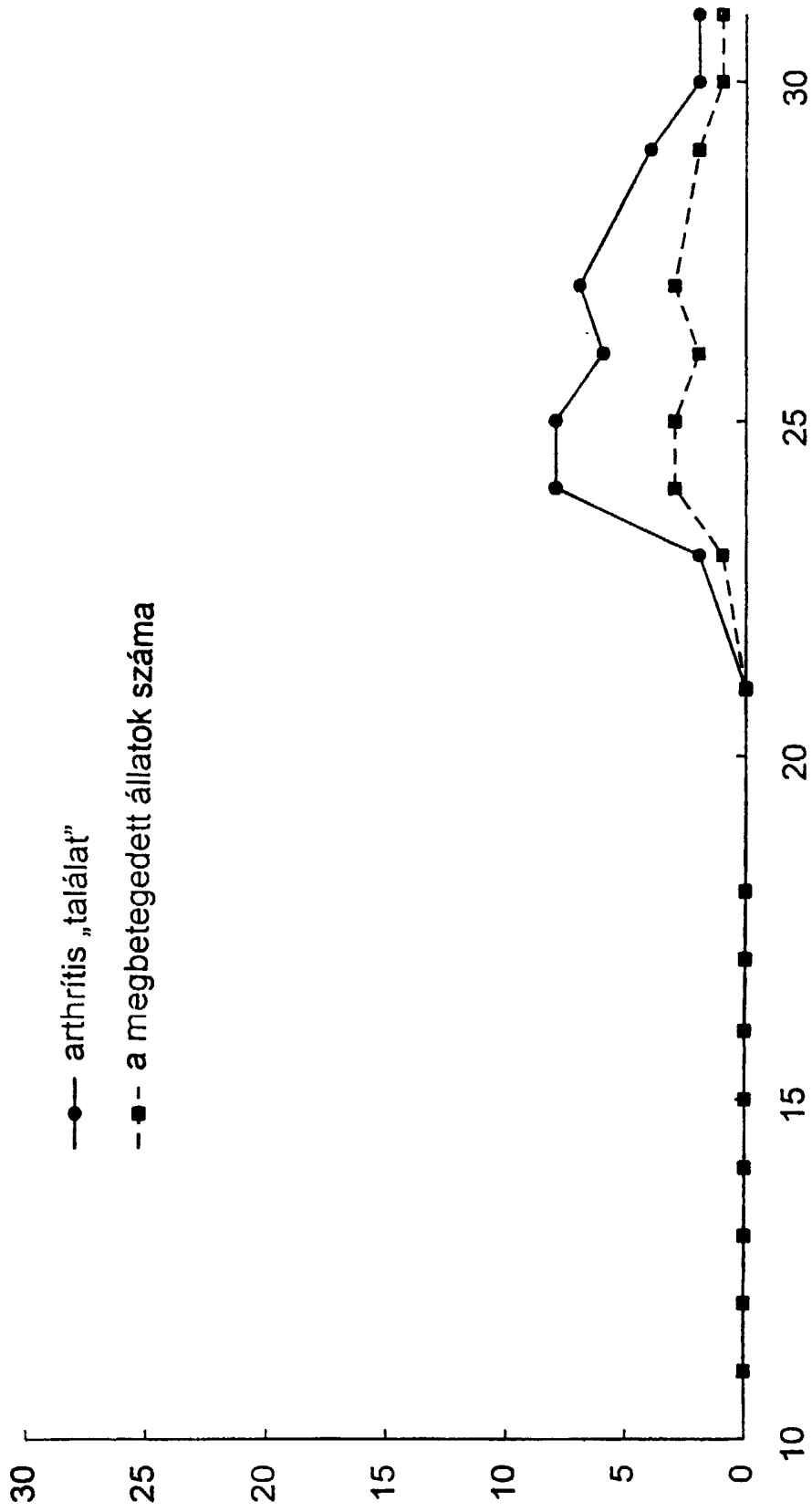
a szenítizálás után eltelt napok száma

1B. ábra



1C. ábra

Az arthrités „találatok” száma a hátsó lábakon  
tolerizált

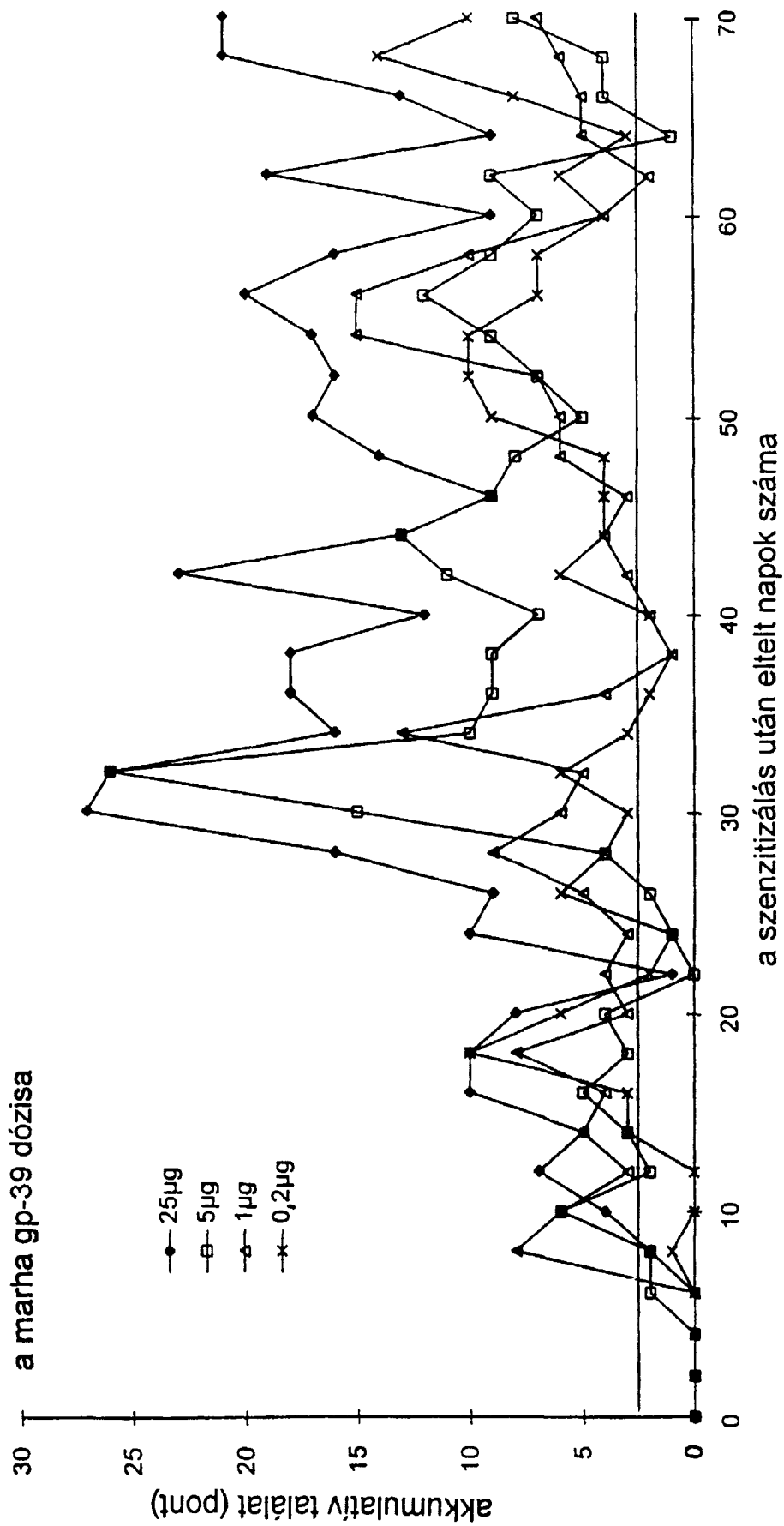


a szenzitizálás után eltelt napok száma

1D. ábra



Az arthrités „találatok” száma a hátsó lábakon



2. ábra