



FI000104179B



SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(12) PATENTTIJULKAISU
PATENTSKRIFT

(10) FI 104179 B

(45) Patentti myönnetty - Patent beviljats

30.11.1999

(51) Kv.lk.6 - Int.kl.6

C 07K 14/47

(21) Patenttihakemus - Patentansökning

961398

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag

27.03.1996

(24) Alkupaivä - Löpdag

14.03.1990

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig

27.03.1996

(86) Kv. hakemus - Int. ansökan

PCT/US90/01397

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet

14.03.1989 US 322864 P

26.06.1989 US 371249 P

(73) Haltija - Innehavare

1. Yeda Research and Development Co. Ltd, P.O. Box 95, 76 100 Rehovot, Israel, (IL)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Cohen, Irun R., 11 Hankin Street, 76 100 Rehovot, Israel, (IL)
2. Elias, Dana, Derech Yavne 57/13, 76 100 Rehovot, Israel, (IL)
3. Markovits, Doron, 11 Horovitz Street, 70 700 Gedera, Israel, (IL)

(74) Asiamies - Ombud: Kolster Oy Ab, Iso Roobertinkatu 23, 00120 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Menetelmä terapeuttisesti käyttökelpoisen polypeptidin valmistamiseksi
Förfarande för framställning av en terapeutiskt användbar polypeptid

(62) Jakamalla erotettu hakemuksesta - Avdelad från ansökan: 905614

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö koskee menetelmää polypeptidin valmistamiseksi, joka polypeptidi sisältää sekvenssin Val-Leu-Gly-Gly-Gly-Cys-Ala-Leu-Leu-Arg-Cys-Ile-Pro-Ala-Leu-Asp-Ser-Leu-Thr-Pro-Ala-Asn-Glu-Asp tai sen minkä tahansa muunnoksen, joka on sen kanssa immunologisesti ristireaktiivinen, mutta joka ei ole koko lämpösokkiproteiini, edellyttäen, että polypeptidi, jolla on seuraava aminohapposekvenssi

1 NAKTIAYDEE ARRGLEGLN ALADAVKVL GPKGRNVLE KMGAPITN DGVSIKKEE
61 LEDPYEKIGA ELVKEVAKT DDVAGDGTI ATVLAQALVR EGLRNVAAGA NPLGLKRGIE
121 KAVEKVTETL LKGAKEVETR EQIAATAAIS AGDQSIGDLI AEAMDKVONE GVITVEESNT
181 FGLQLELTG HRFDKCYISG YFVTDPERQE AVLEDPIYLL VSSKSVTVKD LLPLEKVG
241 AGKPLLIIE DVEGEALSTL VVKNIGTFK SVAVKAPGFC DRRAKLQDH AILTGGQVIS
301 EEVGLTLENA DLSLLGKARK VVTKDETTI VEGAGDTDAI AGRVAQIRQE IENSDSDYDR
361 EKLQERLAKL AGGVAVIKAG AATEVELKER KHRIDAVRN AKAAVEEGIV AGGGVTLLOA
421 APTLDELKLE GDEATGANIV KVALEAPLQK IAFNSGLEPG VVAEKVRNLP AGHGLNAQTC
481 VYEDLLAAGV ADPVKVTSA LQNAASIAGL FLITTEAVVAD KPEKASVP GGGDHGGHDF

ja polypeptidit, joilla on aminohapposekvenssit 234 - 540, 61 - 540, 109 - 540, 171 - 540, 272 - 540 ja 280 - 540, sekä ihmisen mitokondrioproteiini P1 ovat poissuljettua. Polypeptidi syntetisoidaan peptidikemiassa tavanomaisin menetelmin ja se on käyttökelpoinen insuliinista riippuvaisen sokeritaudin hoidossa.

Uppfinningen avser ett förfarande för framställning av en polypeptid som innehåller sekvensen Val-Leu-Gly-Gly-Gly-Cys-Ala-Leu-Leu-Arg-Cys-Ile-Pro-Ala-Leu-Asp-Ser-Leu-Thr-Pro-Ala-Asn-Glu-Asp eller vilken som helst modifikation av denna, vilken är immunologiskt korsreaktiv med denna men inte är ett helt värmechockprotein, under förutsättning att polypeptiden med följande aminosyrasekvens

1 NAKTIAYDEE ARRGLEGLN ALADAVKVL GPKGRNVLE KMGAPITN DGVSIKKEE
61 LEDPYEKIGA ELVKEVAKT DDVAGDGTI ATVLAQALVR EGLRNVAAGA NPLGLKRGIE
121 KAVEKVTETL LKGAKEVETR EQIAATAAIS AGDQSIGDLI AEAMDKVONE GVITVEESNT
181 FGLQLELTG HRFDKCYISG YFVTDPERQE AVLEDPIYLL VSSKSVTVKD LLPLEKVG
241 AGKPLLIIE DVEGEALSTL VVKNIGTFK SVAVKAPGFC DRRAKLQDH AILTGGQVIS
301 EEVGLTLENA DLSLLGKARK VVTKDETTI VEGAGDTDAI AGRVAQIRQE IENSDSDYDR
361 EKLQERLAKL AGGVAVIKAG AATEVELKER KHRIDAVRN AKAAVEEGIV AGGGVTLLOA
421 APTLDELKLE GDEATGANIV KVALEAPLQK IAFNSGLEPG VVAEKVRNLP AGHGLNAQTC
481 VYEDLLAAGV ADPVKVTSA LQNAASIAGL FLITTEAVVAD KPEKASVP GGGDHGGHDF

samt polypeptiderna med aminosyrasekvenserna 234 - 540, 61 - 540, 109 - 540, 171 - 540, 272 - 540 och 280 - 540, samt humant mitokondrioprotein P1 är uteslutna. Polypeptiden syntetiseras medelst inom peptidkemin sedvanliga metoder och den är användbar vid behandling av insulinberoende diabetes.

Menetelmä terapeutisesti käyttökelpoisen polypeptidin valmistamiseksi

Jakamalla erotettu FI-hakemuksesta 905614.

5

Keksinnön kenttä

Tämä keksintö koskee menetelmää polypeptidin valmistamiseksi, joka polypeptidi sisältää sekvenssin Val-Leu-Gly-Gly-Gly-Cys-Ala-Leu-Leu-Arg-Cys-Ile-Pro-Ala-Leu-Asp-Ser-Leu-Thr-Pro-Ala-Asn-Glu-Asp tai sen minkä tahansa muunnoksen, joka on sen kanssa immunologisesti ristireaktiivinen, mutta joka ei ole koko lämpösokkiproteiini, edellyttäen, että polypeptidi, jolla on seuraava aminohapposekvenssi

15

1 MAKTIAYDEE ARRGLEGLN ALADAVKVTL GPKGRNVVLE KKWGAPTITN DGVSIACEIE
61 LEDPYEKIGA ELVKEVAKKT DDVAGDGTAT TVLAQALVR EGLRNVAAGA NPLGLKRGIE
121 KAVEKVTTETL LKGAKEVETK EQIAATAAIS AGDQSIGDLI AEAMDKVGNE GVITVEESNT
181 FGLQLELTEG MRFDKGYISG YFVTDPERQE AVLEDPYILL VSSKVSTVKD LLPLLEKVIG
241 AGKPLLIIE DVEGEALSTL VVNKIRGTFK SVAVKAPGFG DRRKAMLQDM AILTGGQVIS
20 301 EEVGLTLENA DLSLLGKARK VVVKDETTI VEGAGDTDAI AGRVAQIRQE IENSDSDYDR
361 EKLQERLAKL AGGVAVIKAG AATEVELKER KHRIEDAVRN AKAAVEEGIV AGGGVTLLQA
421 APTLDELKLE GDEATGANIV KVALEAPLKQ IAFNSGLEPG VVAEKVRNLP AGHGLNAQTG
481 VYEDLLAAGV ADPVKVTRSA LQNAASIAGL FLTTEAVVAD KPEKEKASVP GGGDMGGMDF

25

ja polypeptidit, joilla on aminohapposekvenssit 234 - 540, 61 - 540, 109 - 540, 171 - 540, 272 - 540 ja 280 - 540, sekä ihmisen mitokondrioproteiini P1 ovat poissuljettuja. Polypeptidi on käyttökelpoinen insuliinista riippuvan sokeritaudin (IDDM, insulin dependent diabetes mellitus) estämiseen tai IDDM:n hoitamiseen sen alkuvaiheissa.

30

Keksinnön tausta

Insuliinista riippuvan sokeritaudin (IDDM:n) esiintymistiheys on kasvanut moninkertaiseksi viime vuosikymmenien aikana monissa maissa, ja arvioidaan, että 1 %:lle tällä hetkellä elävistä ihmisistä on kehittynyt IDDM, ennen kuin he saavuttavat 70 vuoden iän. IDDM:n aiheuttaa

35

autoimmuuniprosessi, joka tuhoaa insuliinia tuottavia beetasoluja. Diabetes tulee kliinisesti havaittavaksi vasta hyvin suuren osan (ehkä 90 %) beetasoluista tuhouduttua peruuttamattomasti, ja tämän yksilön elämä tulee riippuvaiseksi ulkoisesta insuliinilähteestä. Toisin sanoen
5 kliinisen diagnoosin tekohetkellä autoimmuuniprosessi on jo aiheuttanut palautumatonta vahinkoa, suurimman osan siitä ilman havaittavia oireita.

Mainitun sairauden syynä olevan autoimmuuniprosessin menestyksellinen hoito tulisi aloittaa, ennen kuin potilaalla on ilmeisiä sokeritaudin oireita ja hän tarvitsee insuliinia korvaamaan menetetty kyky tuottaa insuliinia. Tämän autoimmuuniprosessin pysäyttäminen johtaisi sairauden paranemiseen ja ulkopuolisen insuliinin tarpeen estämiseen vain silloin, jos sairausprosessi voitaisiin py-
10 säyttää vaiheessa, jossa potilaalla vielä on riittävä määrä beetasoluja endogeenisen insuliinin tuottamiseksi riittävässä määrin. Siksi mikä tahansa hoitomuoto olisi tehokkaampi, jos vaarassa olevat henkilöt voitaisiin identi-
15 fioida silloin, kun heillä ei vielä ole näkyviä IDDM-oireita, ja ennen kuin potilaat tarvitsevat eksogeenista insuliinia.

Onneksi on olemassa erilaisia IDDM-eläinmalleja, mukaan luettuina BB-rotat ja NOD-hiiret [katso esimerkiksi
25 Rossini et al., Ann. Rev. Immunol. 3 (1985) 289 - 320]. Monilla eläimillä kehittyy spontaanisti autoimmuuni-IDDM, jolla on monia ihmisten IDDM:m piirteitä.

Lämpösokkiproteiinit (hsp:t) ovat ryhmä proteiineja, joita tuottavat korotetuille lämpötiloille tai muille
30 rasituksille altistetut solut. hsp:ihin kuuluu proteiineja, joilla on erilainen moolimassa, mukaan luettuina 20 kD, 65 - 68 kD, 70 kD, 90 kD, 110 kD jne. Lämpösokki-
proteiineja esiintyy kaikkialla luonnossa; niitä tuottavat bakteerit, hiivat, kasvit, hyönteiset ja ylemmät eläimet,
35 mukaan luettuna ihminen. hsp-proteiinit ovat hyvin evoluu-

tiossa säilyneitä ja huomattavan homologisia kaikkien näiden erilaisten eliöiden kesken. Koska lämpösokkiproteiinit ovat säilyneet äärimmäisen hyvin koko evoluution ajan, niiden ajatellaan toteuttavan elintärkeitä tehtäviä. Niiden synteesi tavallisesti lisääntyy solujen jouduttua alttiiksi rasittaville ärsykkeille, mukaan luettuina lämpö, tietyt metallit, lääkkeet tai aminohappoanalogit. Näiden proteiinien erityistehtävät ovat kuitenkin vielä tuntemattomia.

10 Systeemistä punahukkaa (SLE, systemic lupus erythematosus) sairastavilla potilailla on esimerkiksi havaittu vasta-aineita 90 kD:n lämpösokkiproteiinille [Minota et al., J. Clin. Invest. 81 (1988) 106 - 109]. Näiden hsp90:n vasta-aineiden toimintaa ei tunneta.

15 hsp65:n on havaittu liittyvän adjuvanttiartriittiin rotilla [katso van Eden et al., Nature 331 (1988) 171 - 173]. Adjuvanttiartriitti on autoimmuuniartriitti, jonka laukaisee tiettyjen rottakantojen immunisointi Mycobacterium tuberculosis -organismien (MT) suhteen. On havaittu, että T-lymfosyyttiklooni, joka reagoi MT:n hsp65:n eräseen 20 9 aminohapon pituiseen peptidisekvenssiin (180-188), voi siirtää tämän taudin immunologisesti kehittymättömiin, säteilytettyihin rottiin. Niinpä ilmeni, että adjuvanttiartriitti on anti-hsp65-T-lymfosyyttien aikaansaama autoimmuunisairaus. Niveliin kohdistuvan autoimmuunihyökkäyksen aiheutti osittainen sekvenssihomologia hsp65-peptidin 25 180-185 ja ruston proteoglykaanin kytkentäproteiinin erään segmentin välillä [katso Cohen, Scientific American 256 (1988) 52 - 60]. On myös havaittu reumatoidista artriittia 30 sairastavien potilaiden nivelnesteiden T-lymfosyyttien reagoivan MT:n hsp65:een [katso Res et al., Lancet II (1988) 478 - 480].

 hsp65:n annon rotille ennen adjuvanttiartriitin indusointia havaittiin estävän artriitin myöhempi kehittyminen. Niinpä immuunivasteen läsnäolo hsp65:lle liittyi 35

artriittiin sekä rotissa että ihmisissä, ja hsp65:n anto pystyi johtamaan resistenssiin artriittin suhteen.

EP-hakemusjulkaisussa 262 710 esitetään polypepti-
dejä, jotka ovat käyttökelpoisia autoimmuuniartriitin ja
5 vastaavien autoimmuunisairauksien lievittämisessä, hoidos-
sa ja diagnosoinnissa. Ihmisen P1-proteiinin koko primaarirakenne, mukaan luettuina nukleotidisekvenssi ja päätelty aminohapposekvenssi, on julkaistu jokin aika sitten
10 [Jindal, S. et al., Primary Structure of a Human Mitochondrial Protein Homologous to the Bacterial and Plant Chaperonins and to the 65-Kilodalton Mycobacterial Antigen, Molecular and Cellular Biology 9, 5 (1989) 2 279 - 2 283]. Tämä proteiini, jonka moolimassan ilmoitetaan olevan noin 63 kD, on ihmisen lämpösokkiproteiini, jota kut-
15 sutaan tässä hHSP65-proteiiniksi. Tämän julkaisun koko sisältö mainitaan tässä viitteenä. Tämän hakemuksen kuviossa 3 toistettun tämän proteiinin rakenteen on tarkoitus olla identtinen Jindalin julkaisussa esitetyn kanssa.

EP-hakemusjulkaisussa 261 648 esitetään autoimmuunisairaudesta spesifisten aktivoitujen T-solujen käyttöä
20 tällaisen sairauden hoitoon. T-solut on edullista käsitellä ensin paineella ja sitten kemiallisella silloitusaineella ja/tai solurunkoa hajottavalla aineella niiden immunogeenisyyden parantamiseksi. Koko käsiteltyä solua tai
25 osaa siitä voidaan käyttää rokotteenä sitä autoimmuunisairautta vastaan, jolle T-solu on spesifinen.

Tunnetussa menettelyssä autoimmuuni-T-solujen salpaamiseksi kohde immunisoidaan heikennetyillä tai avirulenteilla T-soluilla, joilla on kyseinen autoimmuunispesifisyys, tai niiden fragmenteilla tai osilla. Kohde reagoi
30 aktivoimalla vähintään kahta tyyppiä olevia sääteleviä T-soluja: antiergotyyppi-T-soluja, jotka tunnistavat T-solujen aktivaatiomarkkereita, ja anti-idiotyyppi-T-soluja, jotka näyttävät tunnistavan patogeenisillä endogeenisillä
35 autoimmuuni-T-soluilla esiintyviä oma-antigeenireseptore-

ja. T-solurokotus indusoi koe-eläimissä tehokkaasti tode-
 tun sairauden pysyvän remission samoin kuin estää sairau-
 den. Howell et al. [Scence 246 (1989) 668 - 670] ja Van-
 denbark et al. [Nature 341 (1989) 541 - 544] esittävät T-
 solureseptorin β -ketjun peptidisekvenssien käyttöä rottien
 rokottamiseen kokeellista autoimmuunienkefalomyeliittiä
 vastaan ja tukevat siten päätelmää, että itse autoimmuuni-
 T-solun reseptori voi olla kohde-epitooppilähteenä sääte-
 ly-T-soluille.

Vaikka tällainen T-solujen tai niiden fragmenttien
 käyttö autoimmuunisairauksien yhteydessä on tunnettu ylei-
 sesti, ei juuri IDDM:lle spesifistä antigeenia ole aiemmin
 tunnettu, eikä aktivoituja T-soluja rokotusten tekemiseksi
 IDDM:ää vastaan ole siten ollut saatavissa.

Yhteenveto keksinnöstä

Tämä keksintö koskee menetelmää polypeptidin val-
 mistamiseksi, joka polypeptidi sisältää sekvenssin Val-
 Leu-Gly-Gly-Gly-Cys-Ala-Leu-Leu-Arg-Cys-Ile-Pro-Ala-Leu-
 Asp-Ser-Leu-Thr-Pro-Ala-Asn-Glu-Asp tai sen minkä tahansa
 muunnoksen, joka on sen kanssa immunologisesti ristireak-
 tiivinen, mutta joka ei ole koko lämpösokkiproteiini,
 edellyttäen, että polypeptidi, jolla on seuraava aminohap-
 posekvenssi

```

1 MAKTIAYDEE ARRGLERGLN ALADAVKVTL GPKGRNVVLE KKWGAPTITN DGVSIAKEIE
61 LEDPYEKIGA ELVKEVAKKT DDVAGDGTTT ATVLAQALVR EGLRNVAAGA NPLGLKRGIE
121 KAVEKVTETL LKGAKEVETK EQIAATAAIS AGDQSIGDLI AEAMDKVGNE GVITVEESNT
181 FGLQLELTEG MRFDKGYISG YFVTDPERQE AVLEDPYILL VSSKVSTVKD LLPLLEKVGIG
241 AGKPLLIIE DVEGEALSTL VVNKIRGTFK SVAVKAPGFG DRRKAMLQDM AILTGGQVIS
301 EEVGLTLENA DLSLLGKARK VVTKDETTI VEGAGDTDAI AGRVAQIRQE IENSDDYDR
361 EKLQERLAKL AGGVAVIKAG AATEVELKER KHRIEDAVRN AKAAVEEGIV AGGGVTLLQA
421 APTLDELKLE GDEATGANIV KVALEAPLKQ IAFNSGLEPG VVAEKVRNLP AGHGLNAQTG
481 VYEDLLAAGV ADPVKVTRSA LQNAASIAGL FLTTEAVVAD KPEKEKASVP GGGDMGGMDF

```

ja polypeptidit, joilla on aminohapposekvenssit 234 - 540,
 61 - 540, 109 - 540, 171 - 540, 272 - 540 ja 280 - 540,
 sekä ihmisen mitokondrioproteiini P1 ovat poissuljettuja,

jolle menetelmälle on tunnusomaista, että polypeptidi syntetisoidaan peptidikemiassa tavanomaisin menetelmin.

Uudet polypeptidit ovat käyttökelpoisia IDDM:n ehkäisemisessä ja hoitamisessa myös alkuvaiheissa.

5 Tämän keksinnön yhteydessä tehtyjen havaintojen mukaan IDDM:n kehittymisen aikana eläimet tuottavat hsp65-molekyylejä tai molekyylejä, jotka ovat sen kanssa risti-reaktiivisia ja jotka kulkeutuvat eläinten vereen ja virtsaan. Ne tuottavat myös vasta-aineita ja T-soluja, jotka
10 ovat spesifisesti tällaisten molekyyliden vastaisia. Niinpä hsp65:n tai sen kanssa ristireaktiivisten molekyyliden tai sille spesifisten vasta-aineiden tai T-solujen läsnäolo veressä tai virtsassa osoittaa IDDM-prosessin, ennen kuin beetasolut ovat kokonaan tuhoutuneet ja yksilö on tuomittu
15 elinikäiseen sokeritautiin.

Alkamassa olevan diabeteksen detektointi antaa siten potilaalle mahdollisuuden ryhtyä toimenpiteisiin, joiden päämääränä on pysäyttää autoimmuuniprosessi. hsp65:n tai sen aktiivisen epitoopin tai jonkin muun, sen kanssa
20 immunologisesti ristireaktiivisen molekyylin (antigeenin) anto indusoi esimerkiksi tehokkaasti resistenssin IDDM:ään liittyvälle autoimmuuniprosessille. Tällaisille antigeeneille spesifisten T-solujen antaminen heikennetyssä tai avirulentissa muodossa tai antigeenisyyttä parantavan käsittelyn jälkeen tai niiden fragmenttien tai aktiivisten
25 osien antaminen indusoi myös resistenssin IDDM:ään liittyvälle autoimmuuniprosessille.

Keksinnön yhteydessä on myös havaittu, että immunisoituminen sopivassa adjuvantissa olevalle hsp65:lle
30 tai sen aktiiviselle epitoopille tai muulle molekyylille (antigeenille), joka on immunologisesti ristireaktiivinen sen kanssa, voi indusoida IDDM:n. Rokottaminen tällaisella antigeenillä ilman tehokasta adjuvanttia ja edullisesti yhdessä tolerogeenisen kantajan kanssa voi kuitenkin saada
35 aikaan spesifisen toleranssin tälle antigeenille. Tämä

synnyttää tehokkaasti resistenssin IDDM-autoimmuuniprosesseille. Sama pätee rokottamiseen tällaisille antigeeneille spesifisillä T-soluilla heikennetyssä tai virulentissa muodossa tai antigeenisyyttä parantavan käsittelyn jälkeen tai niiden fragmenteilla tai aktiivisilla osilla. Jos potilaan osoitetaan jo olevan IDDM:n esiklinisessä alkuvaiheessa, tällaisen antigeenin tai T-solujen (tai fraktioiden) injektointi voi synnyttää toleranssin tälle antigeenille ja pysäyttää siten autoimmuuniprosessin ennen merkittävien, pysyvien vaurioiden tapahtumista.

Piirustusten lyhyt kuvaus

Keksintö lienee helpommin ymmärrettävissä seuraavasta piirustusten lyhyestä kuvauksesta ja sitä seuraavasta edullisten suoritusmuotojen yksityiskohtaisesta kuvauksesta.

Kuvio 1 esittää ihmisen P1-proteiinin, joka on hHSP65, nukleotidisekvenssiä ja pääteltyä aminohapposekvenssiä. Vasemmalla olevat numerot viittaavat nukleotidisekvenssiin suhteessa koordinaattiin 1, joka on otaksutun aloituskodonin alussa. Aminohapposekvenssi on numeroitu samasta pisteestä lähtien aloittaen numerosta 1. Tämän lukukehyksen 5'-pään pidennys esitetään yksikirjaimisin koodein. Sisäisen, lambda22a-sekvenssin alkua osoittavan EcoRI-kohdan (nukleotidi 712) sijainti on osoitettu. Polyadenylaatio-signaali, joka on 15 nukleotidin päässä 3'-pään A-hännästä, on alleviivattu. Oletettu mitokondriokohdistussekvenssi N-terminaalisessa päässä ja keratiinin kaltainen aminohapposekvenssi C-terminaalisessa päässä, joka sisältää toistuvia Gly-Gly-Met-jaksoja, on merkitty laatikolla. Positiivisesti varatut aminohapot C-terminaalisessa alkujaksossa on osoitettu (+).

Kuvio 2 on käyrä, joka esittää NOD/Lt-hiirten T-solujen spontaania reaktiivisuutta ihmisen hsp65:n, MT-hsp65:n ja MT-hsp70:n suhteen iän funktiona.

Kuvio 3 on käyrä, joka esittää T-solujen proliferaatiovastetta p277:ään ja p278:aan peptidipitoisuuden funktiona.

5 Kuvio 4 on pylvasdiagrammi, joka esittää T-solkloonien C7 ja C9, joilla on kyky siirtää akuutti diabetes nuoriin, diabetesta edeltävässä vaiheessa oleviin NOD/Lt-hiiriin, proliferaatiovastetta p277:ään, MThsp65:een ja plasmidivertailunäytteeseen.

10 Kuvio 5 esittää peptidien p277 ja p278 vastaisen immunisoinnin tuloksia indusoidun diabeteksen vastustamisessa. Täplät osoittavat veren glukoosipitoisuuden kolmen viikon kuluttua testiryhmien kunkin hiiren immunisoinnista.

15 **Edullisten suoritustuotojen yksityiskohtainen kuvaus**

Seuraavissa esimerkeissä esitetään tämän keksinnön erityissuoritusmuotoja ja tähän keksintöön liittyviä kohteita. Ne on tarkoitettu vain esimerkeiksi ja esitetään keksintöä rajoittamattomina.

20 **Esimerkki 1**

MThsp65-molekyylin tuotanto

Mycobacterium tuberculosisin hsp-molekyyli transfektoitiin E. coliin tavanomaisin menettelyin ja puhdistettiin van Edenin et al. [Nature 331 (1988) 171 - 173] kuvaamalla tavalla. Tällaiset geeniteknisesti käsitellyt E. coli -solut tuottavat olennaisia määriä MThsp65:ä. Eri-
25 laisista lähteistä peräisin olevien hsp:iden läheisen homologian ansiosta nisäkäs- tai ihmisperäinen hsp65 on tehokas myös tuotettuna geeniteknisesti tai eristämällä soluista.
30

hHSP65, jota esiintyy veressä tai virtsassa yksilöillä, joissa on kehittymässä IDDM, voisi tulla muutamista lähteistä. Näihin lähteisiin voi kuulua hHSP65, jota tuottavat normaalisti terveet beetasolut ja jota vapautuu
35 immunologisen tuhoutumisen esivaiheena beetasolujen joutu-

essa virusinfektion tai myrkkyyvaikutuksen kohteiksi, tai sitä voi vapautua beetasoluista immunologisen tuhoutumisen aiheuttaman rasituksen vuoksi. hHSP65:ä voisivat myös erittää immuunijärjestelmän solut pitkittyneen beetasolujen vastaisen aktiivisuutensa aikana. Vaikka hHSP65:n lähteitä tässä järjestelmässä ei tällä hetkellä tunneta lopullisesti, on määritetty, että kun hHSP65:ä vapautuu, yksilö stimuloituu tuottamaan vasta-aineita hHSP65-molekyyllille.

10 Vasta-aineita määrittämättömälle molekyylille, jonka moolimassa on 64 000, on kuvattu esiintyvän joissakin juuri diagnosoiduissa IDDM-potilaissa [Baekeskov et al., Nature 298 (1982) 167 - 168]. Ei kuitenkaan tiedetä, onko 64 kD:n antigeeni hsp. Lisäksi tämän 64 kD:n antigeenin ei
15 tiedetä esiintyvän veressä tai virtsassa ennen IDDM:n puhkeamista. Toisin kuin tämä määrittämätön 64 kD:n beetasoluantigeeni on hsp65 määritetty proteiini, jonka aminohapposekvenssi tunnetaan [Thole et al., Infection and Immunity 55 (1987) 1 466 - 1 475]. Samoin hHSP65:n aminohapposekvenssi tunnetaan ja esitetään kuviossa 1.

Esimerkki 2

MThsp65:n vastaisten vasta-aineiden tuotanto

Tavanomaisen laboratoriokannan kaniinit (New Zealand White) inokuloitiin injektoimalla ihonalaisesti selkään 100 µg esimerkin 1 mukaisesti tuotettua MThsp65:ä
25 fysiologisessa suolaliuoksessa (0,5 ml) emulgoituna mineraaliöljyyn (0,1 ml) (epätäydellinen adjuvantti). Kuukauden kuluttua kaniineille annettiin tehosteeksi 100 µg MThsp65:ä fysiologisessa suolaliuoksessa (1,0 ml) ja kahden viikon kuluttua kaniineista otettiin verinäytteet ja
30 kerättiin seerumi. Kaniineille annettiin tehosteannos samalla tavalla kahden kuukauden kuluttua ja otettiin jälleen verinäyte.

Esimerkki 3**Monet hiiren molekyylit ovat ristireaktiivisia mykobakteeri-hsp65:n kanssa**

Mykobakteeri-hsp65:n tunnistamien nisäkäsmolekyylien identifioimiseksi testattiin kaniinin anti-hsp65-antiseerumia samoin kuin monoklonaalista vasta-ainetta, josta käytetään merkintää TB78. Tämän vasta-aineen on kehittänyt ja toimitti tri J. Ivanyi, MCR Tuberculosis Unit, Hammersmith Hospital, Lontoo. Tämä vasta-aine on spesifinen M. tuberculosisin hsp65-molekyylille. Tutkittiin sitoutuminen näihin vasta-aineisiin viiden tyyppisestä valmisteesta: kloonatusta M. tuberculosisin hsp65:stä; NOD-hiirien, joille on kehittymässä IDDM, ja terveiden vertailueläinten seerumeista; ja lämpösokilla käsiteltyjen rotan fibroblastien lysaateista ja vertailufibroblastilysaateista.

hsp65 valmistettiin esimerkissä 1 kuvatulla tavalla. Rotan embryofibroblasteja viljeltiin tavanomaisin menettelyin. Lämpösokkiproteiinien indusoimiseksi fibroblastiviljelmiä inkuboitiin lämpötilassa 42,5 °C kaksi tuntia ja sitten lämpötilassa 37 °C ½ tuntia. Lämpösokkikäsiteltyjä fibroblasteja ja vertailufibroblasteja viljeltiin lämpötilassa 37 °C, ja hajotettiin ne sitten (noin $5 \cdot 10^6$ solua kumpaakin lajia) käyttämällä hajotuspuskuria, joka sisälsi 0,1 % SDS:ää ja 1 % Tritonia, yhdessä proteaasi-inhibiittoreiden kanssa. Proteiinipitoisuus säädettiin Bradford-määrityksen avulla arvoon 2 mg/ml. Materiaalille tehtiin tavanomainen elektroforeettinen käsittely 10-%:isessä polyakryyliamidigeelissä pelkistävässä olosuhteissa (2 % 2-merkaptetaanolia); näytemäärä oli 100 µg/kaista. Terveistä vertailuhiiristä ja IDDM:n kehittävästä NOD-hiiristä saadut seerumit laimennettiin pitoisuuteen 2 mg/ml. Kullekin näistä seerumivalmisteista tehtiin erotus polyakryyliamidigeelielektroforeettisesti edellä kuvatulla tavalla. Erotettuja proteiineja siirrettiin sitten yön yli

nitroselluloosapaperiin tavanomaisin menettelyin. Papereita inkuboitiin sitten yksi tunti huoneenlämpötilassa hemoglobiinin kanssa (1 %, suojaamista varten) ja sitten joko normaalin kaniinin seerumin tai anti-hsp65:n kanssa laimennussuhteen ollessa 1:100 tai TB78:n tai monoklonaalisen vertailuvasta-aineen kanssa laimennussuhteen ollessa 1:100 kaksi tuntia huoneenlämpötilassa. Vasta-aineiden sitoutuminen mihin tahansa erottuneeseen vyöhykkeeseen detektoitiin inkuboimalla vuohen ¹²⁵I-leimatun anti-kaniini-Ig:n tai anti-hiiri-Ig:n kanssa, pestiin ja kehitettiin autoradiografisesti. Mukaan sisällytettiin moolimassastandardit.

Havaittiin, että anti-hsp65-vasta-aineet tunnistivat muutaman vyöhykkeen. Mykobakteeri-hsp65:n tunnisti sekä kaniinin antiseerumi että monoklonaalinen TB68. Vasta-aineet tunnistivat myös yhden hiiren fibrioblastien 65 kD:n vyöhykkeen, joka syntyi autetusti lämpöshokin jälkeen. Kuummenetuissa fibroblastilysaateissa oli myös positiivisia vyöhykkeitä moolimassojen 30 kD ja 47 kD kohdalla. IDDM:n kehittävien NOD-hiirten seerumeissa tuli detektoiduksi yksi lisävyöhyke suunnilleen kohdalla 25 kD. Niinpä nisäkäsmolekyylit, joiden moolimassa on 65, 47, 30 ja 25 kD, ovat ristireaktiivisia mykobakteeri-hsp65:n kanssa.

Esimerkki 4

hsp65:ä muodostuu haiman saarekkeissa

Koska IDDM:n kehittymiseen liittyy hsp65:n voimistunut esiintyminen veressä ja virtsassa, ajateltiin, että saarekkeiden beetasolut voisivat olla hsp65:n lähde. Tämän teorian testaamiseksi tutkittiin kaniinin anti-hsp65:ä, jotta nähtäisiin, sitoutuuko se saarekesoluihin.

Käytettiin tavanomaista menetelmää 6 - 8 µm:n paksuisten pakastettujen rotan haimaleikkeiden valmistamiseksi. Leikkeet peitettiin normaalilla kaniinin seerumilla tai anti-hsp65-antiseerumilla (absorptiokäsitelty maksa-

jauheella epäspesifisten vasta-aineiden poistamiseksi) laimennettuna suhteessa 1:50, inkuboitiin 30 min huoneenlämpötilassa, pestiin perusteellisesti PBS:llä ja inkuboitiin sitten 5 min 5-%:isen normaalin vuohen seerumin kanssa ennen inkubointia vuohen fluoreseiinilla leimatun antikaniini-Ig:n kanssa 30 min huoneenlämpötilassa. Saarekkeet värjäytyivät voimakkaasti anti-hsp65-seerumin vaikutuksesta, mutta eivät kaniinin vertailuseerumilla. Siksi saarekkeet tuottavat hsp65:ä.

10 **Esimerkki 5**

Immunisointuminen hsp:lle indusoi IDDM:n

Koska havaittiin, että saarekesolut tuottavat hsp65:ä, oletettiin, että hsp:n vastainen immuunivaste vaurioittaa beetasoluja ja aiheuttaa siksi IDDM:n.

15 C57BL/Ksj-uroshiiret, jotka olivat 8 viikon ikäisiä, tai 4,5 viikon ikäiset NOD-naarashiiret immunisoitiin injektoimalla vatsakalvonsisäisesti 50 µg hsp65:ä, ja testattiin saattaisiko niille kehittyä IDDM, jonka osoituksena on arvon 250 mg/100 ml ylittävä veren glukoosipitoisuus.

20 4,5 viikon ikäisillä NOD-hiirillä spontaanin IDDM:n kehittyminen kestää vielä ainakin kolme kuukautta. C57BL/Ksj-hiirillä ei kehity spontaania IDDM:ää. hsp65 annettiin emulgoituna öljyyn tai PBS:ään. Öljyyn emulgoitua naudan seerumialbumiinia (BSA) käytettiin vertailunäytteenä. Tulokset esitetään taulukossa 1. Havaittiin, että hsp65 indusoi IDDM:n öljyssä mutta ei PBS:ssä annettuna. Siksi immuunivaste hsp65:een voi laukaista IDDM:n, todennäköisesti siitä syystä, että beetasolut tuottavat hsp65:n kanssa ristireaktiivista antigeenia.

30

Taulukko 1
hsp65 adjuvantissa indusoi IDDM:n

	<u>Hiiret</u>	<u>Antigeeni</u>	<u>Adjuvantti</u>	<u>IDDM:n esiinty- mistiheys 3 vii- kon kuluttua</u>
5	NOD	hsp65	öljy	7/10
		hsp65	PBS	0/10
		BSA	öljy	0/20
10	C57BL/ksj	hsp65	öljy	6/7
		hsp65	PBS	0/9
		ei anti- geenia	ei adjuvanttia	0/15

Lisäkokeessa normaalihiirikannat, joille ei kehity spontaanisti IDDM:ää, kuten NOD-hiirille, eikä edes pienen streptotsotosiiniannoksen jälkeen, kuten C57BL/ksj-hiirille, inokuloitiin intraperitoneaalisesti 50 µg:lla antigeenia, joko hsp65:ä tai naudan seerumiantigeenia (BSA), emulgoituna epätäydelliseen Freundin adjuvanttiin (öljy). Hiiristä otettiin verinäytteet aamulla 19 päivän kuluttua ja mitattiin veren glukoosi. IDDM-diagnoosina pidettiin veren glukoosipitoisuutta yli 200 mg/100 ml. Tulokset esitetään taulukossa 2. On nähtävissä, että immunisointi hsp65:llä voi indusoida IDDM:n jopa näennäisesti normaaleissa hiirkannoissa, erityisesti sopivana annoksena annettuna. Tämä tukee päätelmää, että hsp65 tai sen kanssa immunologisesti ristireaktiiviset molekyylit ovat kohdeantigeeneja IDDM:n yhteydessä.

Taulukko 2

Immunisointi hsp65:llä indusoi IDDM:n diabetesta sairastamattomissa hiirikannoissa

5	Hiirikanta	Veren glukoosi (mg %)		IDDM:n esiintymistiheys	
		Antigeenit		Antigeenit	
		<u>hsp65</u>	<u>BSA</u>	<u>hsp65</u>	<u>BSA</u>
10	C3H.eB/Fej	270±41	96±32	5/5	0/5
	C57BL/6j	298±52	122±26	5/5	0/5
	DBA/2	146±33	126±21	0/5	0/5
15	SJL/j	162±27	139±26	0/5	0/5

Esimerkki 6

hsp65 voi indusoida resistenssin IDDM:n kehittymiselle

20 On hyvin tunnettua, että antigeeni annettuna ilman tehokasta adjuvanttia tai yhdessä tolerogeenisen antigeenin kanssa voi indusoida immunologisen reagoimattomuuden, ts. spesifisen toleranssin mainitun antigeenin suhteen.

25 Siksi hiiret, joihin oli injektoitu hsp65:ä PBS:ssä, tutkittiin sen määrittämiseksi, olivatko hiiret saaneet resistenssin IDDM:lle, jonka indusoi hsp65 öljyssä. Kuukauden kuluttua siitä, kun C57BL/Ksj-hiiret olivat saaneet hsp65:ä PBS:ssä, niille annettiin hsp65:ä öljyssä, eikä yhdellekään näistä hiiristä kehittynyt IDDM:ää, jonka merk-

30 kinä pidettiin veren suurempaa glukoosipitoisuutta kuin 260 mg/100 ml kolmen viikon kuluttua. Sitä vastoin 8 vertailuhiirelle 10:stä, jotka eivät olleet saaneet hsp65:ä PBS:ssä, kehittyi IDDM, kun ne olivat saaneet hsp65:ä öljyssä.

Eräässä toisessa kokeessa annettiin hsp65:ä PBS:ssä 30 päivän ikäisille NOD-naarashiirille intraperitoneaalisesti 15 päivää ennen hsp65:n (50 µg) antamista öljyssä IDDM:n indusoimiseksi. IDDM:n esiintymisen mittana oli 5 veren glukoosipitoisuus yli 200 mg/100 ml 35 päivän kuluttua indusointiannoksen antamisesta. IDDM:n esiintyminen mitattiin uudelleen hiirten ollessa 5 kuukauden ikäisiä. Tiedetään, että tässä iässä 50 %:lla kaikista käsittelemättömistä NOD-hiiristä on detektoitavissa oleva IDDM. 10 Tulokset esitetään taulukossa 3.

Taulukko 3
hsp65:n käyttö rokotteenä IDDM:ää vastaan

	<u>IDDM:n esiintymistiheys</u>		
	<u>hsp65 PBS:ssä (µg)</u>	<u>35 päivää immuni- soinnin jälkeen</u>	<u>5 kuukauden iässä</u>
	0	7/8	
20	1	0/8	0/8
	5	0/8	0/8
	50	0/8	0/8

Niinpä on nähtävissä, että hsp65:ä voidaan käyttää indusoimaan toleranssi diabetekseen johtavan immuuniprosessin suhteen. Tämä toleranssi ei ole tehokas pelkästään immunogeenisen hsp65-hyökkäyksen suhteen vaan säilyy tehokkaana käsittelynä spontaanin IDDM:n luonnollista kehittymistä vastaan NOD-hiirissä.

30 **Esimerkki 7**

Alkavan IDDM:n hoito käyttämällä hHSP65:ä

Kuten esimerkissä 6 osoitetaan, hsp65:ä voidaan käyttää indusoimaan resistenssi IDDM-autoimmuuniprosessille. Tämän näyttää aiheuttavan beetasolujen immunologinen 35 toleranssimekanismi niiden jouduttua alttiiksi ulkopuoli-

selle hsp65:lle. Niinpä hsp65 voi olla käyttökelpoinen IDDM:n hoidossa ennen sairauden muuttumista kliinisesti havaittavaksi, ja autoimmuuniprosessi voidaan pysäyttää ennen merkittävien pysyvien vaurioiden syntymistä. Tauluk-
5 koon 3 kootut koetulokset, se että spontaanin IDDM:n luonnollinen kehittyminen voidaan estää NOD-hiirissä, on merkittävä todiste siitä, että hsp65:ä, erityisesti hHSP65:ä, voidaan käyttää terapeuttisesti. Tämä autoimmuuniprosessi alkaa hyvin varhain NOD-hiirissä. Insuliitti on havaitta-
10 vissa jo yhden kuukauden iässä. IDDM tulee kliinisesti havaittavaksi 5 kuukauden iässä 50 %:lla tämän kannan naarashiiristä. hsp65:n anto 30 päivän ikäisille hiirille pysäyttää tämän luonnollisen kehityksen. Tämä osoittaa, että hoito voi olla tehokas jopa autoimmunitietin saarekkeita
15 kohtaan jo synnyttyä.

Esimerkki 8

T-solujen reagointi hHSP65:een liittyy kehittymässä olevaan sokeritautiin

Kuviossa 3 esitetty ihmisen hsp65-geeni kloonattiin ilmentämistä varten tavanomaisella tavalla ja siitä saatiin suurin piirtein puhdasta ihmisen yhdistelmä-hsp65:ä.
20

Tämä koe osoittaa, että hiirissä, joiden beetasolut tuhoutuvat spontaanisti, T-solut reagoivat ihmisen yhdistelmä-hsp65:een. Pernasolususpensioista, jotka saatiin 5 -
25 7 eri ikäisen NOD/Lt-naarashiiren ryhmistä, tutkittiin T-solujen proliferaatio olennaisilta osiltaan T-solujen tyroglobuliinivasteiden yhteydessä kuvatulla tavalla [Maron, R. et al., J. Immunol. 131 (1983) 2 316 - 2 322]. Lyhyesti esitettynä soluja ($1 \cdot 10^6$ solua/ml) inkuboitiin 72 tuntia
30 kolmena rinnakkaisnäytteenä mikromaljan syvennyksissä kasvualustassa (0,2 ml) seuraavien antigeenien (5 μ g/ml) läsnä tai poissa ollessa: ihmisen hsp65, MThsp65 ja MThsp70. Proliferaatio mitattiin sisällyttämällä [3 H]tymidiiniä DNA:han 12 viimeisen inkubointitunnin aikana. Tulokset
35 esitetään Δ cpm-arvona, joka on tutkittavaa antigeenia si-

säلتävien syvennysten keskimääräinen cpm-arvo miinus ilman lisättyä antigeenia viljeltyjen vertailusyvennysten keskimääräinen cpm-arvo $\pm$ standardivirhe (SE). Vertailu-cpm-arvot vaihtelivat alueella 9 000 - 10 500. IDDM:n puhkeaminen noin 50 %:ssa hiiristä tapahtui 4 - 5 kuukauden iässä, kuten osoitetaan merkinnällä "IDDM" kuviossa 4.

Tämän kokeen tulokset, jotka osoittavat NOD/Lt-hiirten T-solujen spontaanin reaktiivisuuden erilaisten antigeenien suhteen iän funktiona, esitetään käyränä kuviossa 4. 1 kuukauden iässä, kun NOD/Lt-hiirissä esiintyy vähän tai ei ollenkaan insuliittia, ei ollut havaittavissa T-solujen reaktiivisuutta minkään antigeenin suhteen. 2 ja 3 kuukauden iässä, lisääntyvän insuliitin ohella, havaittiin kuitenkin voimakas ja kasvava reaktiivisuus ihmisen hsp65:n suhteen, suhteellisesti heikompi reaktiivisuus MThsp65:n suhteen eikä ollenkaan reaktiivisuutta MThsp70:n suhteen. Reaktiivisuus ihmisen hsp65:n ja MThsp65:n suhteen aleni IDDM:n puhjetessa 4,5 kuukauden iässä ja laski edelleen 6 kuukauden iässä IDDM:n kliinisen ilmenemisen jälkeen. Niinpä T-solujen reaktio ihmisen hsp65:een näytti liittyvän beetasolujen vaurioitumisen lisääntymiseen ennen näkyvää IDDM:ää. T-solujen reaktiivisuuden lasku IDDM:n puhkeamisen yhteydessä voidaan selittää alentuneella immuunistimulaatiolla, kun beetasolut ja niiden antigeenit on menetetty.

Esimerkki 9

Ihmisen hsp65:een reagoivat T-solut aiheuttavat diabeteksen

Pernasolususpensioita tehtiin ryhmistä, jotka sisälsivät viisi 3,5 kuukauden ikäistä kannan NOD/Lt, C57NL/6 tai C57BL/KS naarashiirtä. Yksi NOD/Lt-hiiriryhmä (ryhmä 2) oli pohjustettu 9 päivää aikaisemmin immunisoidulla intraperitoneaalisesti MThsp65:llä (50 μ g/ml) öljyssä. Jotkut pernasoluista (ryhmät 4, 6 ja 8) aktivoitiin inkuboimalla niitä 48 tuntia Con A:n kanssa (1,25 μ g/ml).

Con A -käsitteltyt solut siirrettiin kasvaamaan vielä 5 päiväksi elatusalustaan, josta puuttui Con A. Pernasoluis- ta testattiin niiden lisääntymisvasteet ihmisen yhdistel-
mä-hsp65:een, yhdistelmä-MThsp65:een tai E. coli -vertai-
5 luantigeeniin viikon kuluttua aktivoinnista esimerkissä 12 kuvatulla tavalla. E. coli -vertailusolut transfektoitiin plasmidilla pEX2, joka ei sisältänyt hsp65-geenejä. Anti-
geeneja käytettiin pitoisuutena 5 ug. Kolmesta rinnakkais-
näyttestä saadut lisääntymisvastetulokset esitetään stimu-
10 laatioindeksinä (SI), joka on tutkittavan antigeenin kans- sa inkuboituihin pernasoluihin sisällytetyksi tulleen [³H]-
tymidiinin cpm-arvon suhde lisättyä antigeenia sisältämät- tömiin vertailuviljelmiin sisällytetyksi tulleen [³H]tymi-
diinin cpm-arvoon. Vertailuviljelmien cpm-arvo oli 5 000 -
15 7 000 ja standardipoikkeamat cpm-arvon keskiarvosta olivat aina alle 10 % keskiarvosta. Solujen kyky saada aikaan diabetes testattiin aktivoimalla jotkut niistä viljelemäl-
lä Con A:n kanssa 48 tuntia. Diabetesta edeltävässä vai- heessa olevista, 1 kuukauden ikäisistä vastaanottajanaa-
20 rashiiristä koostuvat ryhmät inokuloitiin intraperitoneaa- lisesti koskemattomilla pernasoluilla tai MThsp65:llä poh-
justetuista tai käsittelemättömistä hiiristä saaduilla Con A -aktivoituilla pernasoluilla. Vastaanottajahiiristä ar- vioitiin 21 päivän kuluttua akuutin sokeritaudin kehitty-
minen, josta olivat osoituksena hyperglysemia (veren glu-
25 koosi > 200 mg/100 ml) ja histologiset merkit insuliitis- ta. Veren glukoosi mitattiin ottamalla kunkin hiiren hän-
tälaskimosta verinäyte noin klo 9 ja glukoosipitoisuus mitattiin käyttämällä Diascan Glucose Meter -laitetta ja
30 testiliuskoja (Behringwerke, Saksan liittotasavalta). Insuliitti määritettiin histologisesti osoittamalla (hema- toksilineosiini ja vaalean vihreä värjäytyminen, tekijä
the Histology Laboratory of The Weizmann Institute). Insu- liitin arvosteli yksilö, joka ei tuntenut testilevyjen
35 identiteettiä.

Tulokset esitetään taulukossa 4. Erot NOD/Lt-pernasolujen reaktioiden välillä ihmisen hsp65:n ja MThsp65:n suhteen (ryhmät 1 - 4) olivat merkitsevästi suuremmat ($P < 0,01$) kuin NOD-Lt-pernasolujen reaktiot *E. coli* -vertailuantigeeniin tai muiden hiirikantojen (ryhmät 5 - 7) reaktiot hsp65-antigeeneihin käytettäessä Studentin T-testiä; ND = ei määritetty.

Taulukko 4

T-solujen proliferaatiovasteet Hhsp65:een ja MThsp65:een

Ryhmä	Hiiri kanta	Pernasolut	Proliferaatiovasteet (SI) antigeeneihin				Akuutin diabeteksen siirto	
			Ihmisen hsp65	MThsp65	E. Coli vertailunäyte	Con A -aktiivointi	Esiintymistiheys	
1.	NOD/Lt	käsitlemättömät	12,4	3,5	1,0	ei	0/10	
2.		MThsp65:llä pohjustetut	26,8	4,7	1,3	kyllä	8/10	
3.	NOD/Lt	käsitlemättömät	10,8	2,5	1,1	ei	0/10	
4.		Con A -aktiivoinnin jälkeen	28,7	4,7	1,0	kyllä	8/9	
5.	C57BL/6	käsitlemättömät	1,0	1,2	N.D.	N.D.	N.D.	
6.		Con A -aktiivoinnin jälkeen	1,1	1,1	N.D.	N.D.	N.D.	
7.	C57BL/KS	käsitlemättömät	1,0	1,0	N.D.	N.D.	N.D.	
8.		Con A -aktiivoinnin jälkeen	1,1	0,9	N.D.	N.D.	N.D.	

Tulokset, jotka esitetään taulukossa 4, osoittavat, että 3,5 kuukauden ikäisten NOD/Lt-hiirten T-solujen reaktioita ihmisen hsp65:een voitiin voimistaa immunisoimalla hiiret MThsp65:llä (ryhmä 2) tai aktivoimalla T-solupopulaatio T-solumitogeenilla konkanavaliini A (Con A; ryhmä 4). Con A:n on osoitettu in vitro stimuloivan ensisijaisesti eläimissä in vivo esiintyviä aktivoituja autoimmuuni-T-soluja. Niinpä NOD/Lt-T-solut, jotka on herätetty in vivo immunisoimalla MThsp65:llä tai aktivoitu in vitro Con A:lla, reagoivat luonnostaan ihmisen hsp65:een.

Itse ihmisen hsp65 ei ole mitogeeni; täysikasvuisilla hiirillä, jotka kuuluvat kantoihin, joille ei spontaanisti kehity IDDM:ää, kuten kantaan C57BL/6 (ryhmät 5 ja 6) tai C57BL/KS (ryhmät 7 ja 8), ei esiinny T-solujen reaktiivisuutta Con A -stimuloinnin jälkeen.

Lopuksi mainittakoon, että taulukko 4 valaisee siitä, että ihmisen hsp65:n vastaisen T-solupopulaation aktiivointi in vitro Con A:lla teki T-solut kykeneviksi siirtämään akuutin diabeteksen 1 kuukauden ikäisiin diabetesta edeltävässä vaiheessa oleviin NOD/Lt-hiiriin (ryhmät 2 ja 4).

T-solujen reagoivuuden ihmis-hsp65:een ja diabeteksen välinen yhteys vahvistetaan taulukossa 5. Kokeessa, jossa saatiin taulukon 5 tulokset, T-solulinjat saatiin stimuloimalla toistuvasti pernasoluja MThsp65:llä (5 μ g/ml) Maronin (supra) kuvaamalla tavalla. Klooneja eristettiin solulinjoista rajalaimennusmenetelmällä. T-soluklooneista testattiin niiden kyky siirtää akuutti diabetes olennaisilta osiltaan taulukon 4 yhteydessä kuvatulla tavalla, paitsi että siirrettiin intraperitoneaalisesti $5 \cdot 10^6$ Con A -aktivoitua solua. Klooneiden lisääntymisvasteet antigeeneihin mitattiin SI:nä taulukon 4 yhteydessä kuvatulla tavalla. Vertailuviljemien cpm-arvo oli 4 500 - 6 500 ja standardipoikkeamat cpm-keskiarvosta olivat aina alle 10 %.

Taulukko 5

Diabetogeeniset T-solukloonit tunnistavat ihmisen hsp65:n

5	T-solu- klooni	Akuutin diabe- teksen siirto	Proliferaatiovasteet (SI) anti- geeneihin		
			(Esiintymis- tiheys)	Ihmisen hsp65 MT-hsp65	<u>E. coli</u> vertailunäyte
	27	9/11		16,9 7,1	0,9
10	C7	10/12		23,8 6,7	1,1
	C9	10/15		38,5 5,8	1,2
	21	0/13		6,3 2,8	1,0

15 Kloonien havaittiin reagoivan voimakkaammin ihmisen hsp65:een kuin MThsp65:een tai E. coli -vertailuantigeeniin. Lisäksi kloonit 27, C7 ja C9, jota reagoivat voimakkaasti ihmisen hsp65:een, olivat diabetogeenisiä, kun taas klooni 21, joka reagoi suhteellisen heikosti ihmisen hsp65:een, ei pystynyt siirtämään diabetesta. Koska kloonatuilla T-soluilla esiintyy spesifisyydeltään vain yhdenlaisia antigeenireseptoreja, voidaan päätellä, että akuutin diabeteksen voivat siirtää diabetesta edeltävässä vaiheessa oleviin NOD/Lt-hiiriin T-solut, jotka tunnistavat ihmisen hsp65:llä epitoopin, joka on jossakin määrin ristireaktiivinen MThsp65:n epitoopin kanssa.

Esimerkki 10**Virulentit T-solut toimivat rokotteenä spontaania IDDM:ää vastaan**

30 Ryhmät, jotka koostuivat 5 - 7 diabetesta edeltävässä vaiheessa olevasta kahden kuukauden ikäisestä NOD/Lt-naarashiirestä, pohjustettiin immunisoimalla antigeenilla (50 µg) öljyssä tai jätettiin pohjustamatta. Hiirten pernasolut aktivoitiin inkuboimalla niitä antigeenien (5 µg/ml) tai Con A:n (1,25 µg/ml) kanssa esimerkissä

9 taulukon 5 yhteydessä kuvatulla tavalla tai jätettiin aktivoimatta. Soluja ($25 \cdot 10^6$) siirrettiin sitten intraperitoneaalisesti kuukauden ikäisistä, diabetesta edeltävässä vaiheessa olevista hiiristä koostuviin ryhmiin. Hiiristä
5 tutkittiin akuutti diabetes (hyperglysemia; veren glukoosi >200 mg/100 ml) 3 viikon kuluttua esimerkissä 9 kuvatulla tavalla. Spontaani IDDM määritettiin 8 kuukauden iässä tutkimalla hyperglysemia ja insuliitti. Erot vertailuryhmään (ryhmä 1) nähden olivat merkitseviä osoitetuissa tapauksissa (* $p < 0,01$). Luvut edustavat 2 - 3 kokeen kumulatiivisia tuloksia.
10

Taulukko 6

nsp65:n vastaiset T-solut indusoivat akuutin ohimenevän diabeteksen ja toimivat rokotteenä myöhempää spontaania IDDM:ää vastaan

Ryhmä	T-soluinokulaatin valmistus			Akuutin diabeteksen esiintymistiheys (%)		Spontaanin IDDM:n esiintymistiheys (%)
	Pohjustus	Aktivointi-aine	Inokuloitujen hiirien lukumäärä	heys (%)		
1	ei	ei	72	0		81
2	ei	MT hsp65	20	70*		15*
3	ei	Con A	15	60*		2*
4	BSA	BSA	10	0		70
5	MT hsp70	MT hsp70	21	0		71
6	MT hsp65	MT hsp65	20	80*		0*

Kuten odotettiin, käsittelemättömät vertailuhiiret (ryhmä 1) eivät olleet hyperglyseemisiä 7 viikon ikäisinä, ja spontaani IDDM havaittiin 81 %:lla 8 kuukauden iässä. Akuutti diabetes (veren glukoosi yli 200 mg/100 ml) siir-
tyi sitävastoin käytettäessä diabetesta edeltävässä vai-
heessa olevien hiirten pernasoluja sillä edellytyksellä,
että pernasolut oli aktivoitu in vitro MThsp65:llä (ryhmä
2) tai Con A:lla (ryhmä 3).

Pernasoluja, jotka oli saatu hiiriltä, jotka oli
pohjustettu in vivo MThsp65:llä, BSA:lla tai MThsp70:llä,
annettiin aktivoituina in vitro vastaavalla antigeenilla.
Anti-MThsp65-solut (ryhmä 6) indusoivat akuutin diabetek-
sen, mutta anti-BSA- tai anti-MThsp70-solut (ryhmät 4 ja
5) eivät. Toisin kuin Con A:lla ja MThsp65:llä aktivoitu-
jen solujen kohdalla, jotka reagoivat voimakkaasti ihmisen
hsp65:een (taulukot 3 ja 4), BSA:n tai MThsp70:n kanssa
reagoivien solujen proliferaatiomäärityksissä ei havaittu
reaktiivisuutta MThsp65:een tai ihmisen hsp65:een (tulok-
sia ei esitetä). Niinpä akuutin diabeteksen siirto oli
spesifinen solupopulaatioille, jotka sisälsivät ihmisen
hsp65:een reagoivia T-soluja.

Taulukko 6 osoittaa myös, että akuuttia diabetes-
kohtausta seurasi merkittävä alentuminen 8 kuukauden iässä
kehittyvän spontaanin IDDM:n esiintymistiheydessä. Hiirten
inokulointi BSA:n tai MThsp70:n vastaisilla pernasoluilla
ei indusoinut akuuttia diabetesta eikä estänyt spontaania
IDDM:ää (ryhmät 4 ja 5).

Akuutin, ulkoa siirretyn diabeteksen kyky keskeyt-
tää spontaani IDDM-prosessi havaittiin myös kokeissa, joi-
ta tehtiin edellä kuvatuilla hsp65:n vastaisilla T-solu-
klooneilla (taulukko 4). 31 hiireen injektoitiin virulent-
tia kloonia 27, C7 tai C9, ja kaikille syntyi akuutti dia-
betes 1 - 2 viikon kuluessa. Kaikki toipuivat spontaanisti
hyperglysemiasta 2 viikon aikana, ja vain 2:lle 31:stä
kehittyi spontaani IDDM 8 kuukauden iässä. 13 hiirelle,

joihin injektoitiin avirulenttia kloonia 21, ei sen sijaan kehittynyt akuuttia diabetesta, ja 6:lle näistä hiiristä kehittyi spontaani diabetes 6 kuukauden iässä ($P < 0,01$).

Niinpä diabetes, joka aiheutetaan siirtämällä ulkoapäin ihmisen hsp65:n vastaisia T-soluja, on ohimenevä. Hiiret eivät kuitenkaan pelkästään toipuneet akuutista diabeteksesta vaan saivat resistenssin myöhemmän spontaanin IDDM:n kehittymistä vastaan. Niinpä luonnollisen IDDM:n puhkeamisen nopeuttamisen tai vakavuuden lisäämisen sijasta diabetesta edeltävässä vaiheessa olevien hiirten saattaminen alttiiksi virulenteille T-soluille itse asiassa johti resistenssin saamiseen diabetesprosessia vastaan.

Esimerkki 11

Heikennetyt T-solut toimivat rokotteenä hsp65:een kohdistuvaa autoimmunitettia vastaan ja estävät IDDM:n

Muodostettiin T-solurokotteita 3 kuukauden ikäisten diabetesta edeltävässä vaiheessa olevien NOD/Lt-hiirten pernasoluista aktivoimalla solut inkuboimalla niitä Con A:n tai MThsp65:n kanssa esimerkissä 8 taulukon 3 yhteydessä kuvatulla tavalla ja heikentämällä sitten aktivoidut solut gammasäteilytyksellä (1500 R) tai glutaarialdehydillä (0,3 %, 15 min) Liderin et al. kuvaamalla tavalla [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84 (1987) 4 577]. Ryhmät, jotka koostuivat 15 tai 25 viiden viikon ikäisestä diabetesta edeltävässä vaiheessa olevasta NOD-Lt-naarashiirestä, jätettiin sitten rokottamatta tai rokotettiin inokuloimalla intraperitoneaalisesti 10^7 käsitellyllä pernasolulla. Kuuden kuukauden iässä kunkin ryhmän 5 hiirestä tutkittiin pernan T-solujen proliferaatiovasteet ihmishsp65:een, jotka esitetään stimulaatioindeksinä (SI). Ilman lisättyä antigeenia saadut vertailu-cpm-arvot olivat $2\,465 \pm 235$ ja $2\,246 \pm 185$ rokottamattomilla ja vastaavasti rokotetuilla hiirillä. Lopuista hiiristä otettiin verinäytteet ihmisen hsp65:n vastaisten vasta-aineiden määrit-

tämiseksi tavanomaisella kiinteäfaasiradioimmuunimäärityksellä [Schechter et al., J. Biol. Chem. 259 (1984) 6 411 - 6 419]. Seerumin vasta-aineiden detektoimiseksi mikromalljat päällystettiin inkuboimalla niitä hsp65:n (anti-hsp65:n määrittämiseksi), insuliinin (anti-insuliinin määrittämiseksi) tai marsun DM-idiotyypille positiivisen anti-insuliinin (anti-idiotyyppivasta-aineen määrittämiseksi) kanssa (50 µg/ml kutakin). Näiden antigeenien vasta-aineiden läsnäolo detektoitiin inkuboimalla päällystettyjä syvennyksiä tutkittavien hiiren seerumien kanssa (laimennettuina suhteessa 1:50) ja kehittämällä vuohen ¹²⁵I-leimattulla anti-hiiri-Ig:llä (Amersham, Englanti; 10⁵ cpm/syvennys). hsp65-antigeenin (tai sen kanssa ristireagoivan antigeenin) detektoimiseksi syvennyksiä inkuboitettiin 1,5 µl:n kanssa tutkittavaa seerumia, joka oli laimennettu suhteessa 1:5, ja peitettiin sitten kaniinin anti-hsp65-Ig:llä (laimennettuna suhteessa 1:100). Sitoutuminen mitattiin käyttämällä vuohen ¹²⁵I-leimattua anti-kaniini-Ig:tä (Amersham). Suhteellinen tiitteri merkitsee suhteessa 1:100 laimennetun seerumin sitoutumista ihmisen hsp65:een cpm-arvona. Diabetesta sairastamattomilta 1 kuukauden ikäisiltä NOD/Lt-hiiriltä saadun ihmisen hsp65:n vastaisen seerumivasta-aineen keskimääräinen cpm-arvo oli 1 450 ± 194. Hiirten seerumeista määritettiin hsp65:n tai ristireaktiivisen antigeenin läsnäolo käyttämällä edellä kuvattua kiinteäfaasiradioimmuunimääritystä. Tulokset esitetään taulukossa 7. Rokotetut hiiret erosivat merkitsevästi rokkotamattomista vertailuhiiristä (*p < 0,01).

Taulukko 7

T-solurokotus kontrolloii T-solujen ja vasta-aineiden reaktiivisuutta ihmisen hsp65:n suhteen, vähentää hsp65:n kanssa ristireaktiivista seerumiantigeenia IDDM:n

Ihmisen hsp65:n vastainen
immunititeetti 6 kk:n iässä

Aktivointi	Heikennys	T-solut (SI)	Vasta-aine- tiitteri (cpm·10 ⁻³ ± SD)	Seerumin hsp65 tai risti- reaktiivinen antigeeni 6 kk:n iässä (cpm·10 ⁻³ ±SD)	IDDM 7 kk:n iässä (esiintymistiheys)
ei	ei	11,3	3,5±0,7	3839±688	16/20
Con A	säteilytys	2,5*	N.D.	N.D.	1/10*
Con A	glutaarialdehydi	2,7*	N.D.	1930±570*	0/10*
MT hsp65	glutaarialdehydi	4,3*	2,0±0,4*	N.D.	2/10*

Taulukossa 7 esitetyt tulokset osoittavat, että muuten virulentit Con A:lla tai MThsp65:llä aktivoidut T-solut voidaan heikentää käsittelemällä ne gammasäteilyllä (1 500 R) tai glutaarialdehydillä (0,3 %) ja niitä voidaan
5 käyttää rokottamiseen spontaania IDDM:ää vastaan. Samoin kuin on osoitettu muiden kokeellisten sairauksien yhteydessä, säteilytetyt tai glutaarialdehydillä käsitellyt autoimmuuni-T-solut eivät olleet virulentteja eivätkä aiheuttaneet akuuttia diabetesta (tuloksia ei esitetä).
10 IDDM:n ehkäisyyn liittyi rokotettujen hiirten spontaanin T-solu- ja vasta-aineaktiivisuuden merkittävä heikkeneminen ihmisen hsp65:n suhteen.

Kuten aiemmissa esimerkeissä on kuvattu, NOD/Lt-hiirten saarekkeiden vaurioituminen on merkittävää siihen
15 mennessä, kun seerumiin ilmaantuu proteiini, jonka hsp65:n vastaisen vasta-aineet tunnistavat. Koska tämä seerumiantigeeni on mahdollisesti peräisin vahingoittuneista beeta-soluista, oli kiinnostavaa nähdä, oliko T-solurokotuksella mitään vaikutusta sen määrään. On nähtävissä (taulukko 7),
20 että T-solurokotteen anto vähensi merkittävästi 6 kuukauden iässä seerumiin ilmaantuvan hsp65:n tai ristireaktiivisen antigeenin määrää. Tämä väheneminen liittyi detektoitavissa olevan insuliitin puuttumiseen histologisessa tutkimuksessa (tuloksia ei esitetä).

25 Niinpä MThsp65:llä tai Con A:lla aktivoituja virulentteja ihmisen hsp65:n vastaisia T-soluja voitiin heikentää ja käyttää NOD/Lt-hiirten rokottamisen spontaanin IDDM:n kehittymistä vastaan. Rokotetun tilan merkkienä oli IDDM-prosessin immunologisten merkkien, ihmisen hsp65:n
30 vastaisten T-solujen ja vasta-aineiden, väheneminen. Samalla hsp65:n tai hsp65:n kanssa ristireagoivan seerumiantigeenin määrä väheni, mikä on selitettävissä insuliitin pysähtymisellä.

Esimerkki 12**T-solurokotus antaa resistenssin akuuttia indusoitua diabetesta vastaan**

Esimerkissä 5 osoitettiin, että akuutti diabetes, jonka merkkeinä on insuliitti ja hyperglysemia, voitiin indusoida diabetesta edeltävässä vaiheessa olevissa NOD/Lt-hiirissä immunisoimalla ne MThsp65:llä öljyssä. Havaittiin myös, että tämä akuutin diabeteksen muoto oli ohimenevä ja johti itse asiassa resistenssiin myöhempää spontaania IDDM:ää vastaan. Tässä kokeessa tutkitaan ihmisen hsp65:llä tehdyn immunisoinnin vaikutuksia ja T-solurokotuksen vaikutusta akuuttiin indusoituu diabetekseen.

Ryhmät, jotka koostuivat 4 viikon ikäisistä NOD/Lt-naarashiiristä, rokotettiin 10^7 Con A:lla aktivoidulla, glutaarialdehydillä käsitelyllä pernasolulla esimerkissä 15 taulukon 12 yhteydessä kuvatulla tavalla tai jätettiin rokottamatta. Kahden viikon kuluttua hiirille annettiin MThsp65:ä tai ihmisen hsp65:ä ($50 \mu\text{g}$ öljyssä) akuutin diabeteksen indusoimiseksi. Hiiristä tutkittiin sitten spontaanin IDDM:n kehittyminen 8 kuukauden iässä mittaamalla hyperglysemia ja insuliitti esimerkissä 9 kuvatulla tavalla. Tulokset esitetään taulukossa 8. Erot olivat merkitseviä, kun $*p < 0,01$.

Taulukko 8

T-solurokotus akuuttia hsp65:n indusoimaa diabetesta ja spontaania diabetesta vastaan

<u>Indusoitu diabetes</u>				Spontaanin IDDM:n esiintymis- tiheys <u>IDDM</u>
30	<u>T-soluantigeeni rokotus</u>	<u>Indusointi</u>	<u>Esiintymis- tiheys</u>	veren glukoosi (mg/dl)
	ei	ei	0/10	151±19
	ei	Ihmisen hsp65	12/15	258±22*
	ei	MT hsp65	8/10	339±116*
35	kyllä	MT hsp65	0/20	140±20
				1/20*

On nähtävissä, että rokottamattomat hiiret reagoivat ihmisen hsp65:een tai MThsp65:een, ja niissä kehittyi akuutti, ohimenevä diabetes. Tätä seurasi resistenssi spontaanille IDDM:lle. T-soluilla käsitellyt hiiret olivat sitä vastoin resistenttejä antigeenilla indusoidulle akuutille diabetekselle. Ne olivat suojassa myös spontaanilta IDDM:ltä. Niinpä T-solurokotus antaa tehokkaasti resistenssin sekä keinotekoisella immunisoinilla aiheutetulle akuutille diabetekselle että myöhemmälle spontaanille IDDM:lle.

Esimerkki 13

Peptidisynteesi

Otaksuttiin, että ihmisen hsp65-molekyylin avainepitooppi oli aminohapposekvenssi, joka on osittain, mutta ei täydellisesti, homologinen MThsp65-sekvenssin kanssa. Koska viimeksi mainittu toimii vähemmän hyvin, on vastaavan epitoopin sekvenssi otaksuttavasti hieman erilainen.

Syntetisoitiin sarja peptidejä aloittaen ihmisen hsp65-sekvenssin karboksyylipäästä ja valiten sekvenssejä, joissa oli pieniä eroja mykobakteerin ja ihmisen sekvenssien välillä. Eräässä tällaisessa peptidissä on kuviossa 1 esitetyn ihmisen hsp65-molekyylin aminohapposekvenssi 437-460, ts. H-Val-Leu-Gly-Gly-Gly-Cys-Ala-Leu-Leu-Arg-Cys-Ile-Pro-Ala-Leu-Asp-Ser-Leu-Thr-Pro-Ala-Asn-Glu-Asp-OH. Tälle peptidille on annettu nimeksi p277.

Vertailupeptidi p278 menee päällekkäin p277:n karboksyylipään kanssa 3 aminohapon verran, ja sillä on seuraava sekvenssi: H-Asn-Glu-Asp-Gln-Lys-Ile-Gly-Ile-Glu-Ile-Ile-Lys-Arg-Thr-Leu-Lys-Ile-OH. Tämä vastaa kuvion 1 aminohapposekvenssiä 458-474.

Esimerkki 14**Immuunivaste p277:ään IDDM:n kehittymisen diagnosoinnissa**

Diabetesta edeltävässä vaiheessa olevien 3 kuukauden ikäisten NOD/Lt-naarashiirten pernasolususpensioista testattiin niiden proliferaatiovasteet p277:ään esimerkiksi 8 kuvatulla tavalla, ja tulokset esitetään kuviossa 3. Vaikka näillä hiirillä ei kehity näkyvää IDDM:ää vielä 1 - 3 kuukauteen, niiden pernan T-solut reagoivat voimakkaasti p277:ään mutta eivät p278:aan. Optimaalinen peptidipitoisuus tässä ja muissa in vitro -kokeissa on 5 ug/ml.

Esimerkki 15**Patogeeniset T-solukloonit reagoivat p277:ään ja hsp65-variantteihin**

Kuvio 4 osoittaa, että T-solukloonit C7 ja C9, joilla on kyky siirtää akuutti diabetes nuoriin, diabetesta edeltävässä vaiheessa oleviin NOD/Lt-hiiriin (katso edellä oleva taulukko 5), reagoivat p277:ään. Kloonien havaitaan reagoivan p277:ään samoin kuin koko mykobakteeri-hsp65:een mutta ei vertailuplasmidivalmisteseen, joka ei sisällä hsp65-geeniä. Niinpä on päätelty, että peptidi p277 sisältää patogeenisen epitoopin, koska patogeeniset T-solut tunnistavat sen.

p277-epitooppi esiintyy myös mykobakteerin hsp65-molekyyliin, koska C7 ja C9 reagoivat myös siihen molekyliin. Niinpä sekvenssille p277 homologinen mykobakteerin hsp65-sekvenssi on immunologisesti toimiva. Seuraavana esitetään mykobakteerisekvenssi, jossa on alleviivattu ihmisen p277-sekvenssin korvatut ryhmät: H-Asp-Ala-Gly-Gly-Gly-Val-Thr-Leu-Leu-Gln-Ala-Ala- Pro-Thr-Leu-Asp-Glu-Leu-Lys----Leu-Glu-Gly-Asp-OH. On nähtävissä, että 13 aminohappoa 24:stä on korvautunut. Siksi voimme päätellä, että peptidin p277 immunologiset ominaisuudet pystyvät sietämään sekvenssin noin 60-%:isen muuttumisen. Vaikka pienin mahdollinen epitooppi olisi 10 aminohappoa 24:n si-

jasta, ei ole olemassa p277:n 10 aminohapon sekvenssiä, joka ei eroa vähintään 4 - 6 aminohapon kohdalla mykobakteerisekvenssistä.

Esimerkki 16

5 Peptidiä p277 voidaan käyttää diabeteksen hoitoon

Esimerkissä 6 on osoitettu, että ei-immunogeenisessä muodossa oleva koko hsp65-molekyyli voi indusoida NOD/Lt-hiirissä resistenssin akuuttia diabetesta vastaan, joka indusoidaan immunisoimalla immunogeenisellä hsp65:llä
10 adjuvantissa. Kuvio 5 osoittaa, että myös peptidiä p277, mutta ei peptidiä p278, voitaisiin käyttää resistenssin aikaansaamiseksi indusoitua diabetesta vastaan. Ryhmiä, jotka koostuivat 7 viiden viikon ikäisestä diabetesta edeltävässä vaiheessa olevasta NOD/Lt-naarashiirestä, käsiteltiin p277:llä tai p278:lla (50 µg) epätäydellisessä
15 Freundin adjuvantissa. Kahden viikon kuluttua hiiret immunisoitiin immunogeenisellä hsp65:llä (50 µg) epätäydellisessä Freundin adjuvantissa akuutin diabeteksen indusoidumiseksi. Kolmen viikon kuluttua mitattiin veren glukoosi.
20 On nähtävissä, että yksikään p277:llä käsitellyistä hiiristä ei tullut hyperglyseemiseksi (vereen glukoosipitoisuus vähintään 200 mg/100 ml). Sen sijaan 5 peptidillä p278 käsitellyistä 7 hiirestä sai diabeteksen.

Hoito p277:llä esti myös spontaanin diabeteksen kehittymisen kaikilla näillä 7 hiirellä, kun taas 80 %:lle vertailuhiiristä, joita oli hoidettu erilaisilla antigeneilla, kuten naudan seerumialbumiinilla tai hsp70:llä, kehittyi diabetes 7 kuukauden ikään mennessä. Niinpä p277-käsittely johti resistenssiin sekä indusoitua että spontaania diabetesta vastaan. Niinpä jokin tietty peptidi voi
30 saada aikaan ei-immunogeenisessä muodossa annettavan koko hsp65-molekyylin terapeuttisen tehon.

Vaikka edellä esitetyt p277:llä saadut tulokset koskevat NOD-hiirten diabetesta, on ilmeistä, että tätä peptidiä, samoin kuin koko hsp65-molekyyliä tai mitä ta-
35

hansa muuta sen kanssa immunologisesti ristireaktiivista molekyylä, voidaan käyttää hoitoon ihmisillä. Tämä johtuu siitä, että NOD-hiirten diabetes tunnustetaan ihmisen IDDM:n luotettavaksi malliksi. Lisäksi Toddin et al. mukaan [Nature 329 (1987) 599] NOD-hiirillä on eräs päähistokompatibiliteettikompleksiryhmän (MHC-ryhmän) II molekyyli (Ia), joka on samanlainen kuin ihmisen IDDM:ään liittyvä ihmis-DQ₈. Siten voidaan odottaa, että sekä ihmisen että NOD-hiiren diabetogeenisten T-solujen pitäisi tunnistaa sama peptidisekvenssi, joka esiintyy MHC-ryhmän II molekyylissä, josta puuttuu asparagiinihappo DQ₈-ketjun asemasta 57. Jos ihmiset ja NOD-hiiret, joille kehittyy diabetes, tunnistavat samanlaisen peptidiantigeenin, kuten p277:n, voidaan tällaista peptidiä käyttää ihmisillä samoin kuin NOD-hiirillä IDDM:n hoitoon.

Se nimenomainen proteiini, jota ihmiselimistö tuottaa IDDM:n kehittymisen aikana, on ihmisen lämpösokki-proteiini, jonka koko on noin 65 kD (tai sen kanssa ristireagoiva antigeeni). Ihmisen 65 kD:n lämpösokkiproteiinin nukleotidisekvenssi ja päätelty aminohapposekvenssi esitetään kuviossa 1. Tätä proteiinia kutsutaan tästedes hHSP65:ksi. In vivo voi syntyä myös muita proteiineja, jotka ristireagoivat 65 kD:n proteiiniin sitoutuvien vasta-aineiden kanssa. Esimerkiksi hiiristä ja rotista on löydetty 47, 30 ja 25 kD:n molekyylit, jotka myös ristireagoivat M. tuberculosisin hsp65-molekyylille spesifisen monoklonaalisen vasta-aineen kanssa. Rotan fibroblasteista on löydetty myös 47 kD:n molekyyli, joka on ristireagoiva tällaisen vasta-aineen kanssa. Kun otetaan huomioon lämpösokkiproteiinin säilyminen lajien kesken, on täysin odotettavaa, että niitä esiintyy myös ihmisessä. Lisäksi IDDM:n aikana vereen ja virtsaan vapautuva proteiini voi olla muu molekyyli kuin hHSP65, joka on kuitenkin ristireagoiva sen kanssa. Se voi olla beetasoluilla esiintyvä

pintaproteiini tai jopa proteiinifragmentti, jossa on säilynyt hHSP65:llä esiintyvä epitooppi.

Niinpä molekyyli, joka toimii diagnostisena markkerina alkavan IDDM:n läsnäololle, on molekyyli, joka reagoi immunologisesti hHSP65:ä vastaan syntyneiden polyklonaalisten vasta-aineiden kanssa ja edullisesti hHSP65:n p277-sekvenssiä vastaan syntyneiden monoklonaalisten tai polyklonaalisten vasta-aineiden kanssa. Tämän selityksen ja patenttivaatimusten yhteydessä termi "hHSP65" on tarkoitettu lyhenteeksi ihmisen 65 kD:n lämpösokkiproteiinin lisäksi myös mille tahansa muulle ihmisen seerumissa esiintyvälle sukulaismolekyyllille, joka reagoi ristiin minkä tahansa lajin 65 kD:n lämpösokkiproteiinia vastaan syntyneiden polyklonaalisten vasta-aineiden kanssa. Tämän määritelmään piiriin on erityisesti tarkoitettu kuuluviksi, mainittuihin kuitenkin rajoittumatta, 65, 30, 25 ja 47 kD:n proteiinit, jotka on jo löydetty ja joita käsitellään tässä.

Vaikka edellä yksityiskohtaisesti kuvatuissa kokeissa sekvenssin p277 on osoitettu vastaavan patogeenista epitooppia NOD/Lt-hiirissä, T-solut eivät reagoi p277:ään eräässä toisessa hiirikannassa, C57BL/6:ssa, jossa diabetes voidaan indusoida ihmisen hsp65:llä ja jonka T-solut reagoivat ihmisen hsp65:een. Siten on ilmeistä, että tämä ei ole hHSP65:n ainoa patogeeninen epitooppi. Itse asiassa on määritetty, että diabetesta edeltävässä vaiheessa olevien ihmispotilaiden veressä ja virtsassa esiintyvän markeriproteiinin moolimassa on noin 62 kD. Niinpä olisi odotettavissa, että päähistokompatibiliteettikompleksissa (MHC) kulloinkin esiintyvä epitooppi (ihmisen leukosyytti-antigeeni, HLA) voi vaihdella yksilöstä toiseen. Niinpä, vaikka sekvenssi p277 on tällä hetkellä edullinen, ammattimiehet ymmärtänevät, että hHSP65-proteiinista löydettyneen myös muita antigeenisekvenssejä, joilla on sama tai samantapainen vaikutus kuin p277:llä. Tämän keksinnön tar-

koituksena on sulkea piiriinsä kaikki tällaiset sekvenssit.

On merkittävää, että spontaani IDDM väistyy, kun on toivuttu akuutista diabeteskohtauksesta, jonka joko siirtävät virulentit hsp65:n vastaiset T-solut tai indusoi aktiivinen immunoisoituminen hsp65:lle. Tämä viittaa siihen, että autoimmuunivasteen kinetiikka ja voimakkuus voivat johtaa itsesäätelyyn. Ilmeisesti salakavala, krooninen prosessi voi "luikerrella läpi" luonnollisesta puolustuksesta autoimmuunisairautta vastaan, kun taas avoin autoimmuuniärsyke saattaa voimistaa säätelyä. Resistenssin saaminen autoimmuunisairaudesta itse sairauden akuutin kohtauksen jälkeen havaitaan säännöllisesti kokeellisessa autoimmuunienkefalomyeliitti (EAE-) rottamallissa. Kun rotat ovat spontaanisti toipuneet akuutista EAE:sta, jonka on indusoinut joko aktiivinen immunoisoituminen myeliinin emäksiselle proteiinille tai aktivoitujen T-solujen passiivinen siirto, ne ovat resistenttejä lisäyrityksille indusoida EAE. On havaittu, että EAE-kohtaus aktivoi mekanismeja, mahdollisesti anti-idiotyyppisuppression, joilla on kyky kontrolloida myeliinin emäksiseen proteiiniin reagoivia virulentteja T-soluja.

T-solurokotus, jossa käytetään heikennettyjä autoimmuuni-T-soluja, näyttää olevan eräs tapa aktivoida säätelymekanismeja, ilman että hintana on akuutti sairaus. Anti-isotyyppi- ja antiergotyyppi-T-solut, jotka ovat EAE:n vastaisen T-solurokotuksen yhteydessä esitettyjen kaltaisia, tukahduttavat hsp65:n vastaisia autoimmuuni-T-soluja ja estävät siten IDDM:n kliinisen ilmaantumisen.

Nämä perustelut auttavat selittämään, miten toleranssin indusointi tai hHSP65:n vastaisen immuunivasteen suppressio estää tai parantaa diabetesprosesin jopa sen alkamisen jälkeen. Niinpä hsp65:ä, hsp65:n kanssa ristireagoivia moolimassaltaan pieniä molekyylejä (25, 30 tai 47 kD) tai fragmentteja, muunnettuja peptidisekvenssejä,

synteettisiä peptidejä tai jopa orgaanisia molekyylejä, jotka perustuvat fuusioproteiinin kopioon ja suunnitellaan siten, että ne täyttävät hsp65:lle asetetut fysikokemialliset vaatimukset, voidaan käyttää estämään tai hoitamaan

5 IDDM-prosessia, kunhan ne ovat ristireaktiivisia hHSP65:ä vastaan muodostuneiden polyklonaalisten vasta-aineiden kanssa tai saavat aikaan vasta-aineiden syntymisen, jotka on ristireaktiivisia hHSP65:n kanssa. hHSP65:n sekvenssi p277 on eräs edullinen aine tähän tarkoitukseen. Lisäksi

10 hHSP65:lle tai sen sukulaisantigeenille spesifisiä heikennettyjä T-soluja samoin kuin niiden fragmentteja tai aktiivisia osia voidaan käyttää mainitunlaisen immunitetin indusointiin tai mainitunlaisen immuunivasteen heikentämiseen.

15 hsp65-molekyylin on osoitettu olevan käyttökelpoinen terapeuttisena koostumuksena, joka on tehokas IDDM:n kehittymisen jatkumista vastaan synnyttämällä toleranssin hHSP65:lle ja pysäyttämällä siten beetasolujen itsetuhutumisen. Aktiivinen aineosa käytettäväksi tällaisessa alkavan IDDM:n hoidossa voi olla mikä tahansa materiaali,

20 joka on immunologisesti ristireaktiivinen hHSP65:n kanssa, ts. joko reagoi ristiin hHSP65:ä vastaan muodostuneiden polyklonaalisten vasta-aineiden kanssa tai saa aikaan hHSP65:n kanssa ristiin reagoivien vasta-aineiden muodostumisen. Tällainen materiaali, olipa se sitten peptidi, proteiini, hiilihydraatti tai jokin muu aine, indusoi tolerogeenisesti annettuna toleranssin hHSP65:lle ristireaktiivisuutensa ansiosta. Jos tämä aine on hsp65-proteiini, se voi olla peräisin mistä lajista tahansa. Aineen ei tarvitse olla kokonainen proteiini ollakseen immunologisesti

25 ristireaktiivinen hHSP65:n kanssa. Se voisi olla proteiinifragmentti, jossa on jäljellä itse proteiinin antigeeniaktiivisuus, kuten sekvenssi p277. Se, onko jokin määrätty aine ristireaktiivinen hHSP65:n kanssa, määritetään rutii-

30 nikokein. Jos aine reagoi ristiin hHSP65:ä vastaan muodos-

35

tuneen polyklonaalisen vasta-aineen kanssa tai jos se saa aikaan hHSP65:n kanssa ristireaktiivisten vasta-aineiden muodostumisen, se on käyttökelpoinen alkavan IDDM:n hoitoon. Lisätodisteita tällaisen aineen kyvystä toimia ihmisen hoidossa saataisiin testaamalla toleranssin indusoitumista esimerkissä 10 kuvatussa hiirikokeessa. Tällaisten kokeiden tekeminen olisi rutiinitoimintaa eikä siihen liittyisi tarpeetonta kokeellista työtä.

Edullinen yhdiste ihmisen IDDM:n hoitamiseksi on hHSP65. Ihmisen lämpösokkiproteiinin aminohapposekvenssi esitetään kuviossa 1. Tätä proteiinia voidaan käyttää mainittuun tarkoitukseen. Sen sekvenssi p277 on eräs toinen tähän tarkoitukseen erityisen edullinen molekyyli.

Tässä käsitelty hsp65-proteiinin lisäksi sen suo-
loja, funktionaalisia johdannaisia, esiasteita ja aktiivisia fraktioita, joilla on kyky immunologisesti ristireagoida hHSP65:n kanssa, voidaan myös käyttää. Sellaiset sekvenssit kuin kuvion 1 mukaiset tai Van Edenin et al. (supra) esittämät sekvenssit, joissa yksi tai useampi aminohappo on poistettu, lisätty tai korvattu muilla aminohapoilla, on tarkoitettu kuuluviksi tämän keksinnön piiriin, kunhan niillä on kyky immunologisesti ristireagoida hHSP65:n kanssa.

Tässä käytettynä termi "suolat" tarkoittaa sekä karboksyyliyhdyntien suo-
loja että proteiinimolekyylin aminoryhmien happoadditiosuoloja. Karboksyyliyhdyntien suo-
loja voidaan muodostaa alalla tunnetuin menetelmin, ja niihin kuuluvat epäorgaaniset suolat, esimerkiksi natrium-, kal-
sium-, ammonium-, rauta(III)- tai sinkkisuolat tms., ja suolat orgaanisten emästen kanssa, kuten suolat, joita muodostuu esimerkiksi amiinien, kuten trietanoliamiinin, arginiinin tai lysiinin, piperidiinin, prokaiinin tms., kanssa. Happoadditiosuoloihin kuuluvat esimerkiksi mineraalihappojen, kuten esimerkiksi vetykloridihapon tai rik-

kihapon, ja orgaanisten happojen, kuten esimerkiksi etikkahapon tai oksaalihapon, kanssa muodostuneet suolat.

Termi "funktionaaliset johdannaiset" tässä käytettynä kattaa johdannaiset, joita voidaan valmistaa funktionaalisista ryhmistä, joita esiintyy ryhmien sivuketjuina tai N- tai C-terminaalisina ryhminä, alalla tunnetuin menetelmin, ja ne sisällytetään keksinnön piiriin, kunhan ne säilyvät farmaseuttisesti hyväksyttävänä, ts. ne eivät tuhoa proteiinin aktiivisuutta, tuo toksisia ominaisuuksia
5 niitä sisältäviin koostumuksiin eivätkä vaikuta haitallisesti niiden antigeenisiiin ominaisuuksiin.
10

Näihin johdannaisiin voi esimerkiksi kuulua karboksyyli-ryhmien alifaattisia estereitä, karboksyyli-ryhmien amideja, joita muodostuu reaktiossa ammoniakkin tai primaaristen tai sekundaaristen amiinien kanssa, aminohapporyhmien vapaiden aminoryhmien N-asyylijohtannaisia, joita muodostuu asyyli-ryhmittymien (esimerkiksi alkanoyyli- tai karboksyklisten aroyyli-ryhmien) kanssa, tai vapaan hydroksyyli-ryhmän (esimerkiksi seryyli- tai treonyyli-ryhmien
15 hydroksyyli-ryhmän) O-asyylijohtannaisia, joita muodostuu asyyli-ryhmittymien kanssa.
20

"Esiasteet" ovat yhdisteitä, joita syntyy ennen hsp65:ä ja jotka muuttuvat hsp65:ksi eläin- tai ihmiseläinmisteissä.

.. 25 Suurin piirtein puhdistetun proteiinin "aktiivisiin fraktioihin" kuuluvat hsp65-proteiinimolekyylin polypeptidiketjun mitkä tahansa fragmentit tai esiasteet yksinään tai yhdessä niihin liittyvien molekyylien tai kytkeytyneiden ryhmien, esimerkiksi sokeri- tai fosfaattiryhmien,
30 kanssa tai proteiinimolekyyliaggregaatit tai itse sokeriryhmät sillä edellytyksellä, että fraktiolla on kyky ristireagoida immunologisesti hHSP65:n kanssa. Eräs esimerkki tällaisesta aktiivisesta fraktiosta on hHSP65:n sekvenssi p277.

On ratkaisevaa, että edellä kuvattu aktiivinen aineosa annetaan tavalla, joka indusoi toleranssin immuogeenisen vasteen herättämisen sijasta. Niinpä sitä ei tulisi antaa öljyssä eikä missään muussakaan immunogeenisessä adjuvantissa. Eräs edullinen tapa antaa aktiivista aineosaa siten, että se indusoi toleranssin, on antaa se yhdessä kantajan kanssa, joka suosii antigeenitoleranssin indusoitumista annettaessa antigeeni-kantajakonjugaattia. Tällaiset kantajat tunnetaan tolerogeenisina kantajina. Esimerkkejä tunnetuista tolerogeenisistä kantajista ovat D-aminohappojen polymeerit, polyetyleeniglykoli, sokerimolekyylien polymeerit, omat IgG-molekyylit, omat pernasolut ja rasvahappomolekyylit. Antigeenia voidaan antaa myös monomeerisessä hyvin liukenevassa muodossa toleranssin indusoimiseksi. Eräs tunnettu menetelmä toleranssin indusoimiseksi antigeenille on sen antaminen suun kautta, jopa ilman tolerogeenisten ominaisuuksiensa vuoksi erityisesti valittua kantajaa. Ammattimiehet tuntevat tapoja antigeenin antamiseksi toleranssin indusoivalla tavalla, ja mitä tahansa mainitunlaista tapaa voidaan käyttää tämän keksinnön mukaisesti. Tällaiset menetelmät eivät itsessään ole tämän keksinnön osana.

Mainitunlaista tolerogeenista koostumusta voidaan antaa rokotteenä IDDM:n kehittymisen estämiseksi esimerkiksi IDDM-potilaiden perheenjäsenille, joilla voi olla perinnöllinen IDDM:n kehittymisvaara. Koostumusta käytetään kuitenkin edullisesti pysäyttämään IDDM:n kehittymisen jatkuminen henkilöillä, joiden veressä tai virtsassa on detektoivaissa olevaa hHSP65:ä, mutta edullisesti ennen kuin heissä on kehittynyt immuunivaste hHSP65:een. Toleranssin indusointi estää mainitun immuunivasteen ja siten kontrolloimattoman hHSP65:n vastaisen reaktion aiheuttaman vaurion (IDDM:n). Ei kuitenkaan ole myöhäistä käyttää koostumusta edes hHSP65:n vastaisten vasta-aineiden ilmaantumisen jälkeen. Kokeet, joiden tulokset esitetään

taulukkoissa 8 ja 13, osoittavat, että tämä keksintö voi pysäyttää immuunireaktion jopa autoimmunitietin saarekkeita kohtaan jo alettua. Koska autoimmuuniprosessi voi viedä vuosia ihmisellä, olisi jopa vastetta heikentävä säätely suotuisaa.

hsp65:ä tai sen sukulaismolekyyliä (joita on käsitelty edellä) voidaan käyttää immunogeenina farmaseuttisissa koostumuksissa, erityisesti rokotteissa, IDDM:n lievittämiseksi tai hoitamiseksi.

Eräs tapa parantaa hsp65:n tehoa rokotteena tai terapeuttisena aineena on muodostaa, tunnetuin geenitekniisin menetelmin, mikro-organismeja, jotka tuottavat hsp65:ä joko sellaisenaan tai osana fuusioproteiinia tai multimeerinään. Itse näitä mikro-organismeja voidaan käyttää elävän rokotteena valmistamiseen, joka ei pelkästään laukaise kyseisen mikro-organismin vastaisten vasta-aineiden tuotantoa, vaan on myös käyttökelpoinen IDDM:n lievittämisessä ja hoidossa. Esimerkkejä soveltuvista geeniteknisesti käsitellyistä mikro-organismeista ovat Vaccinia- ja Salmonella-kannat.

Tämän keksinnön mukaisesti saatua yhdistettä voidaan antaa oraalisesti tai parenteraalisesti, kuten ihonalaisesti, lihaksensisäisesti, laskimonsisäisesti, nenänsisäisesti tai rektaalisesti. Farmaseuttiset tolerogeeniset koostumukset voidaan valmistaa alalla tunnetulla tavalla.

Edellä oleva erityissuoritusmuotojen kuvaus valaisee niin täydellisesti keksinnön yleisluonnetta, että muut pystyvät yleisesti tunnettuja tietoja soveltamalla helposti muuntamaan tällaisia erityissuoritusmuotoja ja/tai soveltamaan niitä erilaisiin käyttötarkoituksiin poikkeamatta keksinnön yleisajatuksista, ja siksi tällaiset sovellukset ja muunnokset on tarkoitettu kuuluviksi esitettyjen suoritusmuotojen ajatuksen ja ekvivalenttien piiriin. On ymmärrettävä, että tässä käytetyn fraseologian tai terminologian tarkoituksena on kuvaaminen eikä rajoittaminen.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä polypeptidin valmistamiseksi, joka polypeptidi sisältää sekvenssin Val-Leu-Gly-Gly-Gly-Cys-Ala-Leu-Leu-Arg-Cys-Ile-Pro-Ala-Leu-Asp-Ser-Leu-Thr-Pro-Ala-Asn-Glu-Asp tai sen minkä tahansa muunnoksen, joka on sen kanssa immunologisesti ristireaktiivinen, mutta joka ei ole koko lämpösokkiproteiini, edellyttäen, että polypeptidi, jolla on seuraava aminohapposekvenssi

10
15
1
MAKTIAYDEE ARGLERGLN ALADAVKVTL GPKGRNVVLE KKWGAPTITN DGVSIKEIE
61 LEDPYEKIGA ELVKEVAKKT DDVAGDGTTT ATVLAQQLVR EGLRNVAAGA NPLGLKRGIE
121 KAVEKVTETL LKGAKEVETK EQIAATAAIS AGDQSIGDLI AEAMDKVGNE GVITVEESNT
181 FGLQLELTEG MRFDKGYISG YFVTDPERQE AVLEDPYILL VSSKVSTVKD LLPLLEKVG
241 AGKPLIIAE DVEGEALSTL VVNKIRGTFK SVAVKAPGFG DRRKAMLQDM AILTGGQVIS
301 EEVGLTLENA DLSLLGKARK VVVTKDETTI VEGAGDTDAI AGRVAQIRQE IENSDDSDYDR
361 EKLQERLAKL AGGVAVIKAG AATEVELKER KHRIEDAVRN AKAAVEEGIV AGGGVTLLQA
421 APTLDELKLE GDEATGANIV KVALEAPLKQ IAFNSGLEPG VVAEKVRNLP AGHGLNAQTG
481 VYEDLLAAGV ADPVKVTRSA LQNAASIAGL FLTTEAVVAD KPEKEKASVP GGGDMGGMDF

ja polypeptidit, joilla on aminohapposekvenssit 234 - 540, 61 - 540, 109 - 540, 171 - 540, 272 - 540 ja 280 - 540, sekä ihmisen mitokondrioproteiini P1 ovat poissuljettuja, t u n n e t t u siitä, että polypeptidi syntetisoidaan peptidikemiassa tavanomaisin menetelmin.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että valmistetaan polypeptidi, joka sisältää sekvenssin Val-Leu-Gly-Gly-Gly-Cys-Ala-Leu-Leu-Arg-Cys-Ile-Pro-Ala-Leu-Asp-Ser-Leu-Thr-Pro-Ala-Asn-Glu-Asp tai sen minkä tahansa muunnoksen, jonka sekvenssi on vähintään 40-%:isesti homologinen sen kanssa.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että valmistetaan polypeptidi, jossa on 24 aminohappoa.

Patentkrav

1. Förfarande för framställning av en polypeptid innehållande sekvensen Val-Leu-Gly-Gly-Gly-Cys-Ala-Leu-Leu-Arg-Cys-Ile-Pro-Ala-Leu-Asp-Ser-Leu-Thr-Pro-Ala-Asn-Glu-Asp eller någon modifikation av denna, vilken modifikation är immunologiskt korsreaktiv med denna, men inte är ett helt värmechockprotein, under förutsättning att polypeptiden med aminosyrasekvensen

1 MAKTIAYDEE ARGLERGLN ALADAVKVTL GPKGRNVVLE KKWGAPTITN DGVSIKEIE
 61 LEDPYEKIGA ELVKEVAKKT DDVAGDGTAT ATVLAQALVR EGLRNVAAGA NPLGLKRGIE
 121 KAVEKVTETL LKGAKEVETK EQIAATAAIS AGDQSIGDLI AEAMDKVGNE GVITVEESNT
 181 FGLQLELTEG MRFDKGYISG YFVTDPERQE AVLEDPYILL VSSKVSTVKD LLPLLEKVIG
 241 AGKPLLIIE DVEGEALSTL VVNKIRGTFK SVAVKAPGFG DRRKAMLQDM AILTGGQVIS
 301 EEVGLTLENA DLSLLGKARK VVVTKDETTI VEGAGDTDAI AGRVAQIRQE IENSDDYDR
 361 EKLQERLAKL AGGVAVIKAG AATEVELKER KHRIEDAVRN AKAAVEEGIV AGGGVTLTQA
 421 APTLDELKLE GDEATGANIV KVALEAPLKQ IAFNSGLEPG VVAEKVRNLP AGHGLNAQTG
 481 VYEDLLAAGV ADPVKVTRSA LQNAASIAGL FLTTEAVVAD KPEKEKASVP GGGDMGGMDF

och polypeptiden med aminosyrasekvenserna 234 - 540, 61 - 540, 109 - 540, 171 - 540, 272 - 540 och 280 - 540 samt humant mitokondrieprotein P1 är uteslutna, k ä n n e - t e c k n a t av att polypeptiden syntetiseras med inom peptidkemin konventionella metoder.

2. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e - t e c k n a t av att man framställer en polypeptid innehållande sekvensen Val-Leu-Gly-Gly-Gly-Cys-Ala-Leu-Leu-Arg-Cys-Ile-Pro-Ala-Leu-Asp-Ser-Leu-Thr-Pro-Ala-Asn-Glu-Asp eller någon modifikation av denna, vars sekvens till åtminstone 40 % är homolog med denna.

3. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e - t e c k n a t av att man framställer en polypeptid med 24 aminosyror.

KUVIO 1

-45 GACGACCTGTCTCGCCGAGCGACGCTTGCCGCCGCCCGCCGAGAAATGCTTGGGTTACCCACAGTCTTTCCGCCAGATGAGACCGGTGTCC
D D L S R R A H A C R R P A E MetLeuArgLeuProThrValPheArgGlnMetArgProValSer 15
+ +

46 AGGGTACTGGCTCCTCATCTCACTCGGGCTTATGCGAAAGATGTAAATTTGGTGACAGTCCCAGACCTTAATGTCTCAAGGTGTAGAC
ArgValLeuAlaProHisLeuThrArgAlaTyrAlaLysAspValLysPAGlyAlaAspAlaArgAlaLeuMetLeuGlnGlyValAsp 45
+ +

136 CTTTTAGCCGATGCTGTGGCCGTTACAAATGGGCCAAAGGAAGACAGTGAATTATTGAGCAGAGTTGGGGAAGTCCCAAAGTAACAAA
LeuLeuAlaAspAlaValAlaValThrMetGlyProLysGlyArgThrValIleIleGluGlnSerTrpGlySerProLysValThrLys 75

226 GATGGTGTGACTGTTGCCAAAGTCAATTGACTTAAAGATAAATAACAAGAACAATTGGAGCTAAACTTGTTCAGATGTTGCCAATAACACA
AspGlyValThrValAlaLysSerIleAspLeuLysAspLysTyrLysAsnIleGlyAlaLysLeuValGlnAspValAlaAsnAsnThr 105

316 AATGAAGGAGCTGGGATGCCACTACCACTGCTACTGTACTGGCCAGCTCTATAGCCAAAGGAGGCTTCGAGAAAGATTAGCAAAGGTGCT
AsnGluGluAlaGlyAspGlyThrThrThrAlaThrValLeuAlaArgSerIleAlaLysGluGlyPheGluLysIleSerLysGlyAla 135

406 AATCCAGTGGAAATCAGGAGAGGTGTGATGTTAGTGTCTGTAATTGCTGAAACTAAAAAGCAGTCTAAACCTGTGACCCACCCCT
AsnProValGluIleArgArgGlyValMetLeuAlaValAlaAspAlaValIleAlaGluLeuLysLysGlnSerLysProValThrThrPro 165

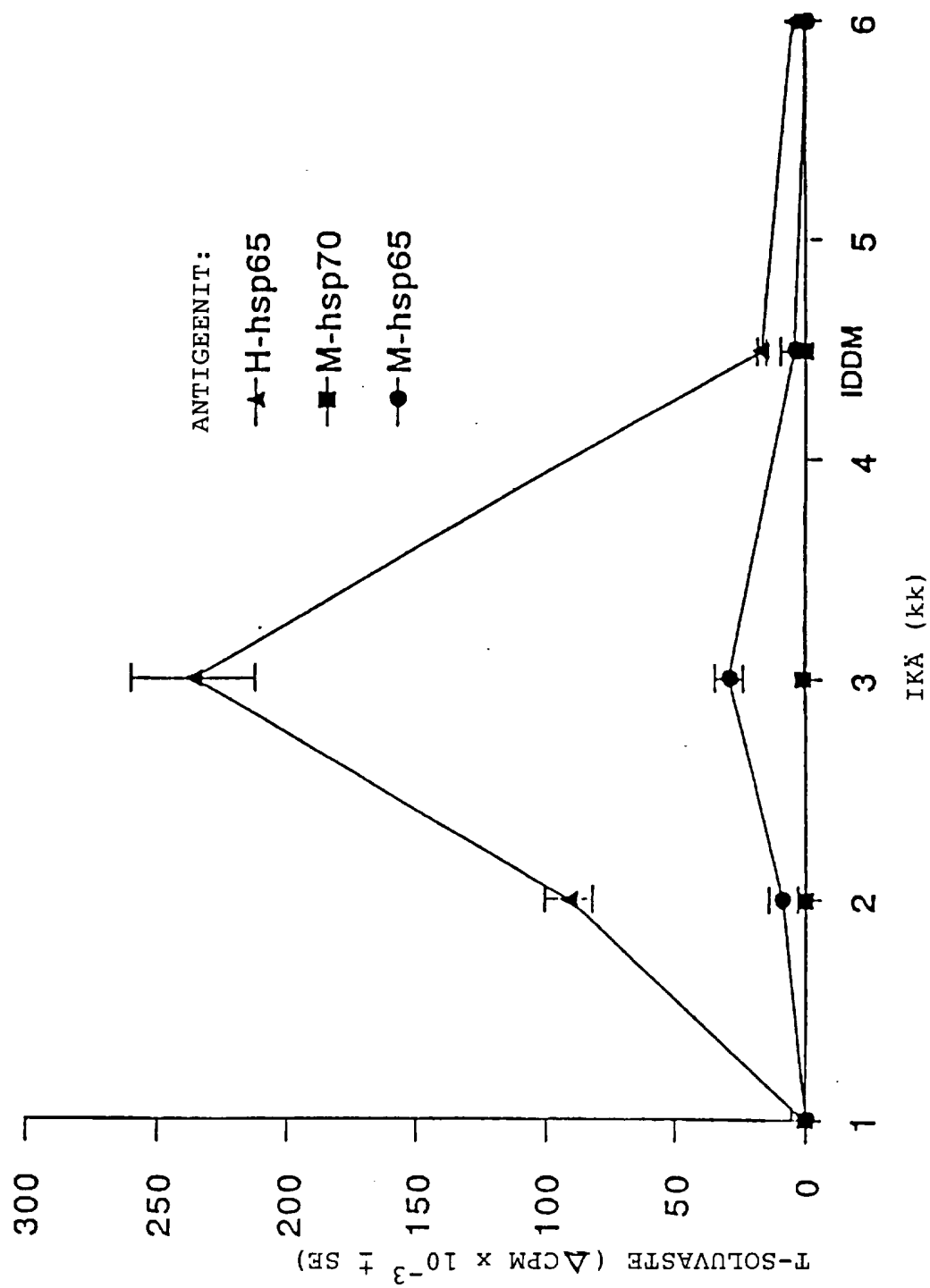
496 GAAGAAATTGCACAGGTTGCTACGATTTCTGCAAAACGGAGACAAAGAAATTTGGCAATATCATCTCTGATGCAATGAAAAAGTTGGAAGA
GluGluIleAlaGlnValAlaThrIleSerAlaAsnGlyAspLysGluIleGlyAsnIleIleSerAspAlaMetLysLysValGlyArg 195

586 AAGGGTGTCAATCAGTAAGGATGGAAAAACACTGAATGATGAATAATTATGAAGGCATGAAGTTTGATCGAGGCTATATTTCT
LysGlyValIleThrValLysAspGlyLysThrLeuAsnAspGluLeuGluIleIleGluGlyMetLysPheAspArgGlyTyrIleSer 225
FCORI

676 CCATACTTTATTAATACATCAAAAGGTCAGAAATGTAATTCAGGATGCCCTATGTTCTGTTGAGTGAAAAAGAAAAATTTCTAGTATCCAG
ProTyrPheIleAsnThrSerLysGlyGlnLysCysGluPheGlnAspAlaTyrValLeuLeuSerGluLysLysIleSerSerIleGln 255

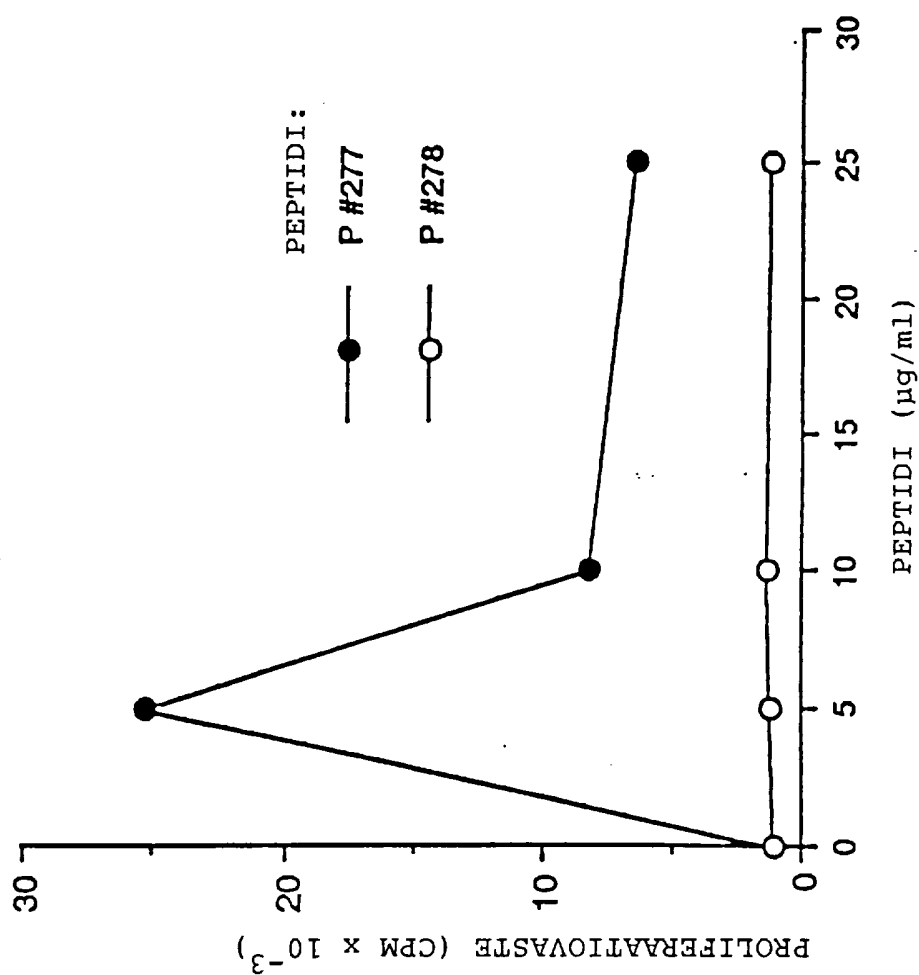
766 TCCATTGTACCTGCTCTTGAAATTGCCAATGCTCAGCGTAAGCCCTTTGGTCATAATCGCTGAAGATGTTGATGGAGAAAGCTCTAAGTACA
SerIleValProAlaLeuGluIleAlaAsnLeuValLeuAsnArgLeuLysValGlyLeuGlnValValAlaValLysAlaProGlyPhe 285

856 CTCGTCTTGAATAGGCTAAAGTTGCTCTTCAGGTTGTGGCAGTCAAGGCTCCAGGGTTTGGTGACAATAGAAAGAACCCAGCTTAAAGAT
LeuValLeuAsnArgLeuLysValGlyLeuGlnValValAlaValLysAlaProGlyPheGlyAspAsnArgLysAsnGlnLeuLysAsp 315

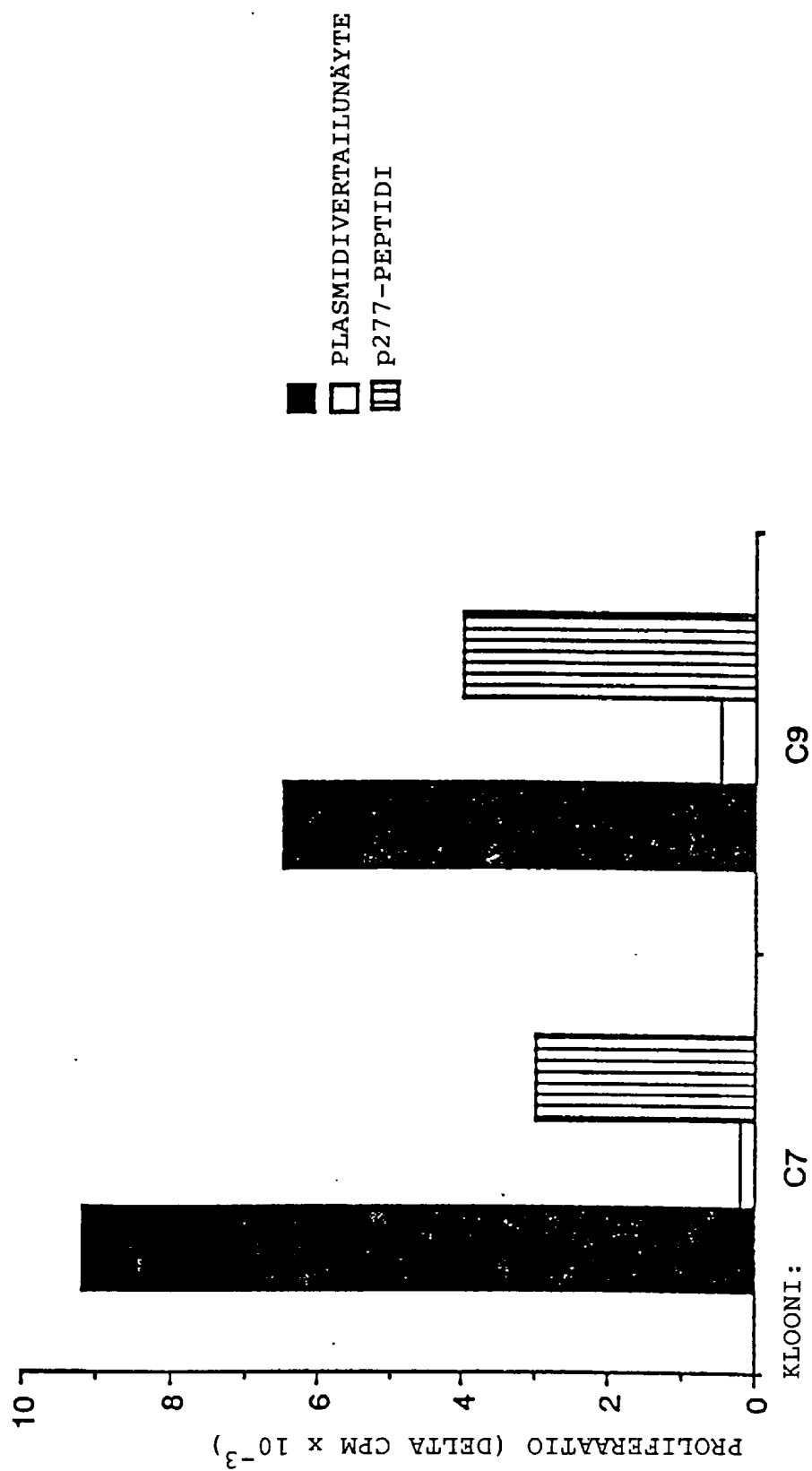


KUVIO 2

T-SOLUVASTE IHMISEN hsp65-ANTIGENIN PEPTIDIIN p277



KUVIO 3



KUVIO 4

