

KIVONAT

Eljárás gyulladásos betegségek hősokk proteinek alkalmazásával történő kezelése
sére

National Jewish Medical and Research Center., Denver, CO, US

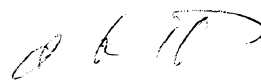
A bejelentés napja: 1999.01.22.

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/US99/01421

Elsőbbsége: 1998.01.23. (09/012,330 US)

A nemzetközi közzététel száma: WO 99/37319

A találmány tárgya hősokk-fehérjék alkalmazása olyan gyógyszerek gyártására, mely gyógyszerek valamely emlősnek gyulladásos válaszreakcióval összefüggésben jelentkező eozinofiliás megbetegedéstől való megvédésére szolgálnak, továbbá eljárás emlősnek gyulladásos válaszreakcióval összefüggő, eozinofilával jellemezhető betegségtől való megvédésére, mely eljárásban az ilyen betegségben szenvedő emlősnek hősokk-fehérjét adunk be.



2001.02.24.



70.776/SM

P0100241

Eljárás gyulladásos betegségek hősokk proteinek alkalmazásával történő kezelé- sére

National Jewish Medical and Research Center., Denver, CO, US

Feltalálók: GELFAND Erwin W., Englewood, CO, US

HACZKU Angela Francisca, Junction, NJ, US

LUKACS Katalin, London, GB

A bejelentés napja: 1999.01.22.

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/US99/01421

Elsőbbsége: 1998.01.23. (09/012,330 US)

A nemzetközi közzététel száma: WO 99/37319

A jelen találmány emlősöknek gyulladásos betegségektől, s főként olyan megbetegedésektől való megvédésére szolgáló eljárásra vonatkozik, mely betegségekre a gyulladásos válaszreakcióval összefüggő eozinofília a jellemző.

A gyulladással járó megbetegedésekre olyan sejt-típusok és mediátor anyagok beáramlása jellemző, melyek szöveti károsodáshoz és néha halálhoz vezetnek. A gyulladással járó megbetegedések különösen veszélyesek, ha ezek a légzőrendszert teszik próbára akadályozott légzést, hipoxémiát, hypercapniát és tüdőszövet-károsodást okozva. A légúti akadályokat okozó betegségek esetében a levegő-beáramlás korlátozott (vagyis a levegő útja elzárt vagy beszűkült) a légúti simaizmok összeszorulása, ödéma vagy túlzott nyálkaelválasztás követ-



keztében, s ez megnövelt légzési munkához, nehézlégzéshez, hipoxémiához és hypercapniához vezet. Míg a légúti akadályokat okozó betegségek különböző típusai az akadályozott légzés során a tüdők mechanikai tulajdonságait egyaránt próbára teszik, a patofiziológia különbözhet.

Számos gyulladáskeltő/közvetítő, így pl. allergének, hideg levegő, edzés, fertőzés és légszennyezés válthat ki korlátozott levegő-beáramlást. Főként az allergének és az allergiás vagy szenzibilizált állatokban lévő más közvetítők (azaz antigének és haptének) okozzák azoknak a gyulladáskeltő mediátoroknak a felszabadulását, melyek mozgósítják a gyulladásos folyamatban szerepet-játszó sejteket. Ilyen sejtek a limfociták, eozinofil sejtek, masztociták, bazofil és neutrofil sejtek, makrofágok, monociták, fibroblasztok és vérlemezkék. A gyulladás légúti túlérzékenységi válasz reakciót (airway hyperresponsiveness) eredményez. Több különböző vizsgálat talált kapcsolatot a gyulladásos folyamat mértéke, súlyossága, időzítése, és a légúti túlérzékenységi reakció mértéke között. Vagyis a gyulladásnak egy közösleges következménye a korlátozott levegő-beáramlás és/vagy a légúti túlérzékenységi válaszreakció.

Az asztma egy kiemelt figyelemmel kísért tüdőbetegség, mely közel 16 millió amerikait érint. Az asztma tipikusan periodikusan fellépő, korlátozott levegőellátással és/vagy túlérzékenységi reakcióval járó betegség, mely valamely inger hatására következik be és számottevő légút-szűkülést eredményez. További jellemzője lehet a légúti gyulladás és eozinofília. Konkrétabban: az allergiás asztma gyakran magas IgE-szintekkel, eozinofiliás légúti gyulladással és légúti túlérzékenységi reakcióval jár együtt.

Az asztma elterjedtsége (mind előfordulását, mind időtartamát tekintve) fokozódik. Jelenleg közel a lakosság 10%-ára terjed ki, és az elmúlt 20 évben

25%-os volt a növekedés. Még figyelemreméltóbb azonban a halálozási arány emelkedése. Ha ehhez hozzávesszük, hogy az intenzív szobai ellátások és kórházi beutalások száma is nő, az újabb adatok alapján megállapítható, hogy az asztma súlyossága fokozódik. Míg a legtöbb asztmás eset könnyen kézben tartható, azoknál akik súlyosabb stádiumban vannak, a költségek, a mellékhatások, és mind gyakrabban a kezelés hatástalansága, komoly problémát jelent. A krónikus antigén behatásra fellépő fibroproliferatív válaszreakciók mind az asztma súlyosságára, mind a kezelés gyenge eredményére magyarázatul szolgálhatnak, különösen, ha a kezelésre késve kerül sor. Az asztmás betegek többségénél enyhék a tünetek és könnyen kezelhetők, de az asztmások egy jelentős részénél a tünetek súlyosabbak. Ezenkívül a krónikus asztmásoknál progresszív és irreverzibilis korlátozott levegőellátás alakul ki valamilyen ismeretlen mechanizmus útján.

A gyulladásos megbetegedések, így pl. a mérsékelttől a súlyosig változó asztma kezelésére jelenleg alkalmazott gyógymód dominánsan immunszuppressziós glükokortikoszteroidok használatán alapul. A légúti gyulladások kezelésében használatos egyéb gyulladásgátlók pl. a kromolin és a nedokromil. Beta-agonistákkal, antikolinerg szerekkel és metil-xantinokkal végzett tüneti kezelés klinikailag jótékony hatású, amennyiben ezek enyhítik a rossz közérzetet, viszont a betegséget kiváltó gyulladásos folyamatot nem tudják megállítani. A gyakran alkalmazott szisztémás glükokortikoszteroidoknak számos mellékhatása van, így pl. súlygyarapodás, diabetesz, magas vérnyomás, csonttritkulás, hályog, fokozott hajlam a fertőződésre, növekvő lipid és koleszterol-szint és enyhe kisebbedés. Az aeroszol formában alkalmazott glükokortikoszteroidoknak

kevesebb mellékhatásuk van, de kevésbé hatásosak és mellékhatásként pl. afta jelentkezhethet.

Az egyéb gyulladásgátló szerek, mint pl. a kromolin és a nedokromil sokkal kevésbé hatásosak, de kevesebb mellékhatással rendelkeznek, mint a glükokortikoszteroidok. Olyan gyulladásgátlókat, melyek elsősorban immunszuppressziós szerként és rákellenes szerként használatosak (így pl. citoxén, metotrexát és immuran) ugyancsak alkalmaztak légúti gyulladás kezelésére vegyes eredménnyel. Ezeknek a szereknek a mellékhatásai azonban súlyosak, így pl. fokozzák a fertőzésre való hajlamot, okozhatnak máj-toxicitást, gyógyszer által előidézett tüdő-megbetegedést és csontvelő immunszuppressziót. Így ezeket a gyógyszereket csak korlátozottan alkalmazták a légúti túlérzékenységgel járó tüdő megbetegedések klinikai kezelésére.

A gyulladásgátló szerek és a tüneteket csökkentő reagensek alkalmazásánál komoly problémát jelentenek ezek mellékhatásai, valamint az a körülmény, hogy nem tudják megszüntetni a gyulladásos folyamatot kiváltó alapokat. Folyamatosan igény van tehát kevésbé káros és hatékonyabb, a gyulladás kezelésére alkalmas szerek iránt; vagyis szükség van olyan gyógyászati eljárásokra, melyek kisebb mellékhatást okozó, kevésbé toxikus szerek alkalmazásán alapulnak, mint a jelenlegi gyulladásgátló gyógymódok.

A jelen találmány általánosságban emlősöknek gyulladásos válaszreakcióval összefüggő betegségektől való megvédésére szolgáló eljárásra vonatkozik; konkrétan eozinofiliás, légúti túlérzékenységi reakcióval és/vagy Th2-típusú immunválasszal járó betegségekről van szó, mely betegségeknek ezen jellemzői gyulladásos válaszreakcióval vannak összefüggésben. Az eljárás egyik lépése-

ben az ilyen betegségben szenvedő emlősnek valamely hősokk-fehérjét adunk be. Előnyösen az ilyen emlős egy ember.

A jelen találmány egyik fogatosítási módja emlősöknek gyulladásos válaszreakcióval járó eozinofiliás megbetegedéstől való megvédésére szolgáló eljárásra vonatkozik. Az eljárás egyik lépésben az ilyen betegségben szenvedő emlősnek valamely hősokk-fehérjét adunk be. Az eozinofiliás megbetegedés kezelésére szolgáló eljárás előnyösen csökkenti az eozinofiliát az emlősben. Az egyik fogatosítási mód szerint az ilyen eljárás az emlősben az eozinofil vérsejtek számát kb. 0 - kb. 300 sejt/mm³-re, előnyösebb esetben kb. 0 - kb. 100 sejt/mm³-re csökkenti. Egy másik fogatosítási mód szerint az eljárás az ilyen emlősben az eozinofil vérsejtek számát az emlős össz-fehérvérsejt számának kb. 0% - kb. 3%-ára csökkenti.

Azok a betegségek, melyekkel szemben a jelen találmány szerinti eljárás védőhatású lehet, pl. a következők: allergiás légúti megbetegedések, hiper-eozinofiliás szindróma, helmintikus parazitogén fertőzés, allergiás rhinitis, allergiás kötőhártya-gyulladás, dermatitis, ekcéma, kontakt dermatitis, és étel allergia. Egy másik fogatosítási mód szerint, a kérdéses betegség eozinofiliás légúti gyulladással és légúti túlérzékenységi reakcióval járó légzőszervi megbetegedés, mint amilyen pl. az allergiás asztma, intrinzik asztma, az allergiás bronchopulmonális aspergillosis, az eozinofiliás tüdőgyulladás, allergiás bronchitis bronchiectasia, foglalkozási asztma, reaktív légúti megbetegedési szindróma, intersticiális tüdő megbetegedés, hipereozinofiliás szindróma vagy a parazitogén tüdő megbetegedés. Egy másik fogatosítási mód szerint a kérdéses betegség egy allergénnel szembeni túlérzékenységre visszavezethető megbetegedés, főként allergiás asztma.

Az egyik fogatosítási mód szerint a találmány szerinti eljárásban alkalmazható hősokk-fehérje a HSP-60 hősokk-fehérjék családjába a HSP-90 hősokk-fehérjék családjába vagy a HSP-27 hősokk-fehérjék családjába tartozhat. A jelen eljárás alternatív fogatosítási módjai szerint a hősokk-protein a következők közül választható: a HSP 60 hősokk-fehérjék családjába, a HSP-70 hősokk-fehérjék családjába vagy a HSP-27 hősokk-fehérjék családjába tartozó protein; a HSP-90 hősokk-fehérjék családjába vagy a HSP-27 hősokk-fehérjék családjába tartozó protein; vagy a bakteriális hősokk-proteinek vagy emlős hősokk-fehérjék csoportjába tartozó protein. Az előnyös fogatosítási mód értelmében az alkalmazott hősokk-fehérje valamely mycobakteriális hősokk-protein, előnyösebben egy mycobakteriális hősokk-fehérje-65 (HSP-65).

Bizonyos fogatosítási módok esetében azt a betegséget, mellyel szemben a jelen eljárás védelmet nyújt, légúti túlérzékenységi reakciót jellemzi. Ezen fogatosítási módok esetében az eljárás emlősökben előnyösen csökkenti a légutak metakolinnal szembeni reakcióját. Más fogatosítási módok esetében az emlősökben a levegő-beáramlás korlátozottságát úgy csökkenti, hogy az emlős FEV₁/FVC értéke legalább kb. 80% legyen. Egy további fogatosítási mód esetében a hősokk-fehérje beadása az emlős PC₂₀ metakolin FEV₁ értékét úgy javítja, hogy a hősokk-fehérje beadása előtt mért PC₂₀ metakolin FEV₁ érték, amikor az emlőst a metakolin első koncentrációjával provokáljuk, ugyanakkora, mint a hősokk-fehérje beadása után mért PC₂₀ metakolin FEV₁ érték, amikor az emlőst az első metakolin koncentráció duplájával provokáljuk. Egy még további fogatosítási mód szerint a hősokk-fehérje beadásával az emlős FEV₁ értékét kb. 5 - kb. 100%-kal javítjuk az emlős várható FEV₁ értékéhez képest. Egy másik fogatosítási mód értelmében a hősokk-fehérje beadása az emlősben a levegő-



beáramlás korlátozottságát úgy javítja, hogy az emlős R_L értéke legalább kb. 20%-kal csökken.

Az egyik foganatosítási mód szerint az a betegség, mellyel szemben a jelen találmány szerinti eljárás védőhatást biztosít, valamely citokin, így pl. interleukin-4 (IL-4), interleukin-5 (IL-5), interleukin-6 (IL-6), interleukin-9 (IL-9), interleukin-10 (IL-10), interleukin-13 (IL-13) vagy interleukin-15 (IL-15) fokozott termelődésével lehet összefüggésben. Ennek megfelelően, ez a jelen találmány szerinti eljárásoknak egy olyan foganatosítási módja, amikor a hősokk-fehérje beadás hatására az emlősben a T-limfociták interferon- γ -t (IFN- γ) termelnek. Egy másik foganatosítási mód szerint a hősokk-fehérje beadásával lecsökkenthetjük az emlősben a T-limfociták interleukin-4 (IL-4) és interleukin-5 (IL-5) termelését.

A jelen találmány szerinti eljárások értelmében a hősokk-fehérjét kb. 0,1 mikrogramm x kilogramm⁻¹ és kb. 10 milligramm x kilogramm⁻¹ közötti mennyiségben adhatjuk be az emlős testsúlyára számítva; az előnyösebb mennyiség kb. 1 μ g/testsúly kg és kb. 1 mg/testsúly kg között van. Ha a hősokk-fehérjét aeroszol formájában vesszük be, a hősokk-fehérje mennyisége kb. 0,1 mg/kg és kb. 5 mg/kg között lehet. Ha a hősokk-fehérjét parenterálisan adjuk be, a hősokk-fehérje mennyisége kb. 0,1 μ g/testsúly kg és kb. 10 μ g/testsúly kg között lehet.

A jelen találmány szerinti, fentiekben leírt eljárások egyik foganatosítási módja értelmében a hősokk-fehérjét valamely gyógyászatilag elfogadható excipienssel együtt adjuk be. Az előnyös beadási mód a következők közül legalább az egyik; és pedig: orális, nazális, topikális, inhalációs, transzdermális, rektális vagy parenterális beadásmód, előnyösebb esetben inhalációs vagy nazális beadási mód.

A jelen találmány egy másik foganatosítási módja emlősöknek gyulladásos válaszreakcióval járó, légúti túlérzékenységi reakcióval jellemezhető megbetegedéstől való megvédésére szolgáló eljárásra vonatkozik, mely eljárásban az ilyen betegségben szenvedő emlősnek valamely hősokk-fehérjét adunk be. Ennek a módszernek különböző konkrét foganatosítási módjait a fentiekben már leírtuk az eozinofiliával jellemezhető megbetegedések kapcsán.

A jelen találmány egy további foganatosítási módja emlősöknek Th2-típusú immunválasszal járó gyulladásos megbetegedéstől való megvédésére szolgáló eljárásra vonatkozik, mely eljárásban az ilyen betegségben szenvedő emlősnek valamely hősokk-fehérjét adunk be. Ennek a módszernek különböző konkrét foganatosítási módjait a fentiekben már leírtuk az eozinofiliával jellemezhető megbetegedések kapcsán.

A jelen találmány egy másik foganatosítási módja kezelési előírására szolgáló eljárásra vonatkozik légúti túlérzékenységi reakció vagy korlátozott levegő-beáramlás azon esetére, ha ez gyulladásos válaszreakcióval járó megbetegedéssel függ össze. Ez az eljárás a következő lépéseket tartalmazza: (a) az emlősnek hősokk-fehérjét adunk be; (b) mérjük, hogy valamely provokáló ágens hatására az emlősnek mennyit változik a tüdőfunkciója és ez alapján meghatározzuk, hogy a hősokk-fehérje modulálhatja-e a légúti túlérzékenységi reakciót vagy a levegő beáramlás korlátozottságát; és (c) előírjuk a farmakológiai gyógymódot, melyre jellemző, hogy az emlősnek annyi hősokk-proteint adunk be, mely a tüdőfunkcióban beállt változás alapján hatásosan csökkenti a gyulladást. Az egyik foganatosítási mód szerint a mérési lépésben a következő értékek valamelyikét mérhetjük: FEV₁, FEV₁/FVC, PC₂₀ metakolin FEV₁, továbbá post-enhanced h (Penh), vezetőképesség, dinamikus teljesítőképesség, tüdő ellenállás (R_L), a lég-

úti nyomás idő-index (airway pressure time index; APTI) vagy az áramlási csúcsértékek. A provokáló ágens lehet közvetlen vagy közvetett inger, és ez előnyösen a következők valamelyike: allergén, metakolin, hisztamin, leukotrién, sóoldat, hiperventilláció, edzés, kéndioxid, adenozin, propranolol, hideg levegő, valamely antigén, brandikinin, acetil-kolin, valamely prosztaglandin, ózon, környezeti levegőszennyeződés vagy ezek keverékei. Ezen eljárás egyik fogatosítási módja szerint a betegség légúti eozinofiliával jellemezhető.

A jelen találmány egy további fogatosítási módja emlősöknek gyulladásos válaszreakcióval összefüggő eozinofiliás megbetegedéstől való megvédésére szolgáló készítményekre vonatkozik, mely készítmény hősokk-fehérjét és valamely gyulladásgátló szert tartalmaz. A gyulladásgátló lehet pl. valamely antigén, allergén, haptén, gyulladáskeltő citokin antagonistája, gyulladáskeltő citokin receptor-antagonistája, anti-CD23, anti-IgE, leukotrién szintézis inhibitorok, leukotrién receptor antagonisták, glükokortikoszteroidok, szteroidok kémiai származékai anti-ciklooxygenáz hatású szerek, anti-kolinerg hatású anyagok, β -adrenerg agonisták, metil-xantinok, antihisztaminok, kromonok, zileuton, anti-CD4 reagensek, anti-IL-5 reagensek, felületaktív anyagok, anti-tromboxán reagensek, anti-serotonin reagensek, ketotiphen, citoxin, ciklosporin, metotrexát, makrolid antibiotikumok, heparin, kis molekulatömegű heparin vagy ezek keverékei. Az egyik fogatosítási mód szerint a jelen találmány szerinti készítmény valamely gyógyászatilag elfogadható excipienst is tartalmazhat előnyösen a következők közül választva: biológiailag összeférhető polimerek, más polimer mátrixok, kapszulák, mikrokapszulák, mikrorészecskék, bólusz preparátumok, ozmotikus pumpák, diffúziós eszközök, liposzómák, liposzférikus vagy transzdemális beviteli rendszerek.

A jelen találmány egy még további foganatosítási módja emlősöknek a következő jellemzőkkel azonosítható betegségtől való megvédésére szolgáló eljárásra vonatkozik, mely jellemzők választhatóan: eozinofília, légúti túlérzékenységi reakció vagy Th2-típusú immunválasz, és mely jellemzők gyulladásos válaszreakcióval függnek össze. Az eljárás egyik lépésében a betegségben szenvedő emlősnek hősokk-fehérjét kódoló nukleinsav molekulát adunk be. Az egyik foganatosítási mód szerint a nukleinsav molekula a transzkripciót szabályozó szekvenciához van kapcsolva. Egy másik foganatosítási mód szerint a nukleinsav molekulát a következő gyógyászatilag elfogadható excipiensek valamelyikével adjuk be: vizes fiziológiailag kiegyenlített oldat, mesterséges lipid-tartalmú szubsztrát, természetes lipid-tartalmú szubsztrát, valamely olaj, észter, glikol, vírus, fém-részecske vagy kationos molekula. Egy előnyös foganatosítási mód szerint a gyógyászatilag elfogadható excipiens a következők valamelyike: liposzómák, micellák, sejtek vagy sejtmembránok. A nukleinsav molekula beadható intradermális injekcióban, intramuszkuláris injekcióban, intravénás injekcióban, szubkután injekcióban vagy ex vivo beadásmóddal.

A rajzok rövid ismertetése

Az 1. ábra egy blokk-diagram, mely azt szemlélteti, hogy a mycobactérium eredetű HSP-65-tel történő kezelés ovalbuminnal szenzitizált egerekben egy 7-napos kísérlet során mind a nem specifikus, mind az antigén-specifikus T-sejt proliferációt fokozza.

A 2A. ábra egy vonal-diagram, mely azt mutatja, hogy a mycobacterium eredetű HSP-65-tel történő kezelés ovalbuminnal az optimálisnál kisebb mérték-

ben szenzitizált egerekben fokozza az antigén-specifikus T-sejt proliferációt a lépben.

A 2B. ábra egy vonal-diagram, mely azt mutatja, hogy a mycobacterium eredetű HSP-65-tel történő kezelés ovalbuminnal az optimálisnál kisebb mértékben szenzitizált egerekben fokozza az antigén-specifikus T-sejt proliferációt a peribronchiális nyirokcsomókban (PBLN).

A 3. ábra egy blokk-diagram, mely azt mutatja, hogy a mycobacterium eredetű HSP-65 ovalbuminos szenzitizálást és provokációt követően egerekben mind a nem specifikus, mind az antigén-specifikus T-sejt proliferációval járó reakciót fokozza.

A 4A. ábra egy blokk-diagram, mely egerekben ovalbuminos szenzitizálást és provokációt követően a mycobacterium eredetű HSP-65-nek az ovalbuminnal stimulált szplenociták interferon- γ termelésére kifejtett hatását mutatja in vitro.

A 4B. ábra egy blokk-diagram, mely egerekben ovalbuminos szenzitizálást és provokációt követően a mycobacterium eredetű HSP-65-nek az ovalbuminnal stimulált szplenociták IL-4-termelésére kifejtett hatását mutatja in vitro.

A 4C. ábra egy blokk-diagram, mely egerekben ovalbuminos szenzitizálást és provokációt követően a mycobacterium eredetű HSP-65-nek az ovalbuminnal stimulált szplenociták IL-5-termelésére kifejtett hatását mutatja in vitro.

Az 5A. ábra egy blokk-diagram, mely egerekben ovalbuminos szenzitizálást és provokációt követően a mycobacterium eredetű HSP-65-nek az ovalbuminnal stimulált szplenociták ovalbumin-specifikus IgG2a termelésre kifejtett hatását mutatja in vitro.

Az 5B. ábra egy blokk-diagram, mely egerekben ovalbuminos szenzitizálást és provokációt követően a mycobacterium eredetű HSP-65-nek az ovalbuminnal

stimulált szplenociták ovalbumin-specifikus IgG1 termelésre kifejtett hatását mutatja in vitro.

Az 5C. ábra egy blokk-diagram, mely egerekben ovalbuminos szenzitizálást és provokációt követően a mycobacterium eredetű HSP-65-nek az ovalbuminnal stimulált szplenociták ovalbumin-specifikus IgE termelésre kifejtett hatását mutatja in vitro.

A 6. ábra egy blokk-diagram, mely azt szemlélteti, hogy az ovalbuminos szenzitizálással és provokációval egerekben előidézett eozinofiliás légúti fertőzést a mycobacterium eredetű HSP-65-tel történő kezelés megszünteti, in vivo.

A 7. ábra egy vonal-diagram, mely azt mutatja, hogy az ovalbuminos szenzitizálással és provokációval egerekben előidézett, metakolinnal szembeni légúti túlérzékenységi reakciót a HSP-65-tel történő kezelés megszünteti, in vivo.

A jelen találmány általánosságban emlősöknek gyulladásos válaszreakcióval összefüggő betegségektől, főként eozinofiliával, légúti túlérzékenységi reakcióval és/vagy Th2-típusú immunválasszal jellemezhető betegségektől való megvédésére szolgáló eljárásra és készítményre vonatkozik, mely betegségi jellemzők gyulladásos válaszreakcióval függenek össze. A jelen találmány feltalálói azt találták, hogy az emlősöknek beadott hősokk-fehérjék jelentősen gátolják a gyulladást, közelebbről megjelölve a gyulladással összefüggő eozinofiliát. Ezenkívül azt találták, hogy a korlátozott levegő-beáramlással és/vagy légúti túlérzékenységi reakcióval járó légzőszervi megbetegedések esetén hősokk-fehérje beadással szintén jelentősen gátolni lehet a légúti túlérzékenységi reakciót. Végül, a jelen feltalálók kimutatták, hogy ha a Th2-típusú reakcióval jellemezhető gyulladásos megbetegedésben szenvedő emlősnek hősokk-fehérjét adnak be, akkor a Th2-típusú immunválasz eltolódik (azaz modulálódik) a Th1-típusú immunválasz irá-

nyába, pl. a citokinek és/vagy immunglobulin izotípusok termelődésének modulációja útján.

A hősokk-fehérjék erősen immunogén proteinek, melyek különböző gyulladáskeltő citokinek termelődésével (melyek akár Th1-, akár Th2-vel kapcsolatba hozható citokinek lehetnek, s melyeket az alábbiakban részletesen ismertetünk) és bizonyos betegségekkel, így pl. az autoimmun betegséggel és természetesen a mycobacterium fertőzésekkel hozhatók kapcsolatba. A jelen feltalálók azon felismerése tehát, hogy az immunstimuláló hatású hősokk-fehérjék emlősöknek történő beadása a gyulladásos betegség kezelésében hatásos, meglepő és különösen annak fényében az, hogy az ilyen betegségek jelenlegi kezelése kifejezetten immunszuppressziós jellegű. Anélkül, hogy bármiféle elmélethez kívánnánk kötni e felismerést, a jelen feltalálók úgy vélik, hogy az emlősnek valamely gyulladásos megbetegedéstől való megvédésére szolgáló eljárásban a beadott hősokk-fehérje immunstimuláló hatást kelt, mely a káros, gyulladásos immunválaszt jótékony hatású, protektív, de legalábbis ártalmatlan immunválasszá modulálja.

A jelen találmány értelmében a hősokk-fehérje (HSP) bármely olyan protein lehet, mely a fehérjék azon csoportjába tartozik, mely fehérjéket eredetileg az emelt hőmérsékletre és más, a stresszel összefüggésbe hozható ingerekre adott válaszuk - a fokozott termelődés - alapján identifikáltuk és amelyeket a szakirodalom együttesen „hősokk-fehérjék”-ként említ. Ismeretes, hogy a hősokk-fehérjék nemcsak valamely celluláris stressz hatására képződnek, hanem sejtalkotóelemként is jelen lehetnek valamely sejtben és ott különféle teendőket látnak el a sejtházttartásban.

A hősokk-fehérjéket jelenleg legalább öt nagyobb családba sorolhatjuk a protein mérete alapján. Az 5 család a következő: HSP-100 család (kb. 100kD

protein mérettel); HSP-90 család (kb. 90 kD protein mérettel); HSP-70 család (kb. 70 kD protein mérettel); HSP-60 család (kb. 60 kD protein mérettel); és HSP-27 család (kb. 27 kD protein mérettel). A hősokk-fehérjék számos egyedülálló tulajdonsággal rendelkeznek. Pl. a HSP-27, HSP-60 és HSP-70 részt vesz a protein előállításában és összehajtogatásban (folding), és fontos lehet a megfelelő anti-gén prezentálásában. A HSP-27 és HSP-90-ről ismert, hogy részt vesz a szteroidnak a megfelelő receptorhoz való kötésében. A mycobacterium eredetű fehérjéről, és különösen a mycobacterium eredetű hősokk-fehérje-65-ről (HSP-65, mely a HSP-60 család tagja) tudjuk, hogy erős a celluláris immunválaszokat előidéző hatása, és konkrétan ismert, hogy elősegíti/fokozza a monocita/makrofág és T-sejtes funkciókat.

A jelen találmányban alkalmazható hősokk-fehérje bármely ismert hősokk-fehérje családba tartozó hősokk-protein lehet, beleértve a fent megadott hősokk-fehérje családokat. A jelen találmányban alkalmazható hősokk-fehérje pl. a HSP-90, HSP-70, HSP-60 és HSP-27 hősokk-fehérje családból származhat. Az egyik fogatosítási mód szerint a jelen találmányban alkalmazható hősokk-fehérje a HSP-90 családból vagy a HSP-27 családból való. Egy másik fogatosítási mód szerint a jelen találmányban alkalmazható hősokk-protein a HSP-60, HSP-70 és/vagy HSP-27 családból származik. Egy előnyös fogatosítási mód szerint a jelen találmányban alkalmazható hősokk-fehérje a HSP-60 családból származik.

A jelen találmányban alkalmazható hősokk-fehérje bármely szervezetből, előnyösen valamely emlősből vagy baktériumból származhat vagy kinyerhető, még előnyösebben a *Mycobacterium* nem (genus) egy tagjából származhat. Azon különösen előnyös *Mycobacterium* fajok (species) példái melyekből a hősokk-fehére származhat, a *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* és a

Mycobacterium leprae. Az egyik fogantatosítási mód szerint a jelen találmányban alkalmazható hősokk-fehérje egy mycobacteriális hősokk-protein-65 (HSP-65), mely egy 65 kD méretű, a HSP-60 családkhoz tartozó mycobakterium eredetű hősokk-fehérje.

A jelen találmány szerinti eljárásban hasznosítható hősokk-fehérjéket ki-nyerhetjük ezek természetes forrásából, előállíthatjuk rekombináns DNS technika-val vagy kémiai szintézis útján. A hősokk-fehérje fogalmán beleértjük a teljes hosszúságú hősokk-proteint vagy ennek bármely homológját; így pl. az olyan hősokk-fehérjét, melyből aminosavakat töröltek (pl. a protein csonka verziója, mint amilyen pl. egy peptid), vagy amelybe aminosavakat inszertáltak, ilyeneket in-vertáltak, helyettesítettek és/vagy valamely származékká alakítottak (pl. glikozil-, foszforil-, acetyl-, mirisztoil-, prenil-, palmitinsav-, amid-származékokká alakítottuk és/vagy glikol-foszfatidil-inozit hozzáadásával alakítottuk át). Hősokk-fehérje homológja alatt olyan proteint értünk, melynek aminosav szekvenciája kellőképpen hasonló a természetes hősokk-fehérje aminosav szekvenciájához, olyan értelemben, hogy egy, a homológot kódoló nukleinsav szekvencia stringes körülmények között képes egy olyan nukleinsav molekulával hibridet alkotni, mely nukleinsav a természetes hősokk-fehérjét kódolja (vagyis: a komplement nukleinsav fonalhoz kapcsolódik, mely a természetes hősokk-fehérje aminosav szekvenciáját kódolja). Egy bármilyen nukleinsav szekvenciához képest komplement nukleinsav szekvencia egy olyan nukleinsav-fonal nukleinsav szekvenciáját jelen-ti, mely komplementer azzal a fonallal (vagyis amellyel komplett kettős spirált al-kot), melynek a szekvenciájáról szó van. A jelen találmány szerinti eljárásban al-kalmazható hősokk-proteinek pl. a következők: a teljes hosszúságú hősokk-fehérje kódolására alkalmas kódoló régióval rendelkező nukleinsav molekulák

által kódolt proteinek; a hősokk-fehérje egy részletének kódolására alkalmas kódoló régióval rendelkező nukleinsav molekulák által kódolt proteinek; mely proteinek az emlősöket olyan betegségektől védik meg, melyek a következő jellemzők valamelyike alapján azonosíthatók: eozinofília, légúti túlérzékenységi reakció és/vagy Th2-típusú immunválasz; fúziós proteinek; és kimérás proteinek vagy vegyi úton összekapcsolt proteinek, melyek különböző hősokk-fehérjék kombinációit, vagy hősokk-fehérjéknek más fehérjékkel, pl. egy antigénnel vagy allergénnel alkotott kombinációit tartalmazzák. Egy másik fogatosítási mód szerint, a jelen találmány szerinti eljárásban alkalmazható hősokk-fehérjék olyan aminosav szekvenciával rendelkeznek, mely a természetes előfordulású hősokk-fehérje aminosav szekvenciájával legalább kb. 70%-ban azonos, előnyösebb esetben kb. 80%-ban és még előnyösebb esetben kb. 90%-ban azonos.

A hősokk-fehérje (HSP) fogalma az allélikus variánsok által kódolt proteinekre is vonatkozhat; a variánsokba beleértjük a nukleinsav molekulák azon természetes előfordulású allélikus variánsait, amelyekről tudjuk, hogy hősokk-fehérjéket kódolnak, és amelyek hasonló, de nem azonos nukleinsav szekvenciával rendelkeznek, mint azok a nukleinsav szekvenciák, amelyek a természetes előfordulású vagy vad típusú hősokk-fehérjét kódolják. Az allélikus variáns egy olyan gén, mely a genomban ugyanazon a lokuszon fordul elő, mint a hősokk-fehérje gén, mely azonban pl. a mutáció vagy rekombináció miatti természetes variáció következtében hasonló, de nem azonos szekvenciával rendelkezik. Az allélikus variánsok tipikusan olyan proteinek kódolnak, melyek aktivitása hasonló annak a proteinnek az aktivitásához, mely proteint azon gén kódolja, amellyel a variánsokat összehasonlítjuk. Az allélikus variánsok a gén 5' vagy 3'

átfordítatlan (untranslated) régióiban (pl. a szabályozó régiókban) is tartalmazhatnak eltéréseket.

A jelen találmány vonatkozásában a „hősokk-fehérje beadása” jelenti azt, hogy az emlősnek a proteint közvetlenül, pl. az alábbiakban részletezésre kerülő protein beadási módok valamelyikével beadjuk; jelentheti továbbá azt, hogy az emlősnek egy, a hősokk-fehérjét kódoló nukleinsav molekulát adunk be, úgy, hogy a hősokk-fehérje az emlősben expresszálódik. A jelen találmánynak azt a fogatosítási módját, mely szerint az emlősnek egy, a hősokk-fehérjét kódoló nukleinsav molekulát adunk be, az alábbiakban részletesen ismertetjük.

A találmány értelmében a hősokk-fehérjét a gerincesek közé tartozó emlősök osztályának (Mammalia) bármely tagja (így pl. a főemlősök, rágcsálók, hásonállatok és házi kedvencek) kaphatja. A jelen találmány szerinti eljárás előnyösen egy olyan betegség kivédésére és/vagy kezelésére irányul, melyre emlősökben gyulladásos válaszreakcióval összefüggésben jelentkező eozinofília, légúti túlérzékenységi reakció és/vagy Th2-típusú válasz a jellemző. A hősokk-fehérje alkalmazásával megvédeni kívánt emlősök előnyös példái: az ember, rágcsáló, majom, birka, disznó, macska, kutya és ló. Még előnyösebb esetben a védeni kívánt emlős, az ember.

Az „emlős megvédése valamely betegségtől”, mely gyulladással jár, kifejezés a következőket jelentheti: csökkenteni annak veszélyét, hogy valamely gyulladásokeltő/közvetítő (nevezetesen olyan anyag vagy hatás, mely gyulladásos válaszreakciót képes okozni, így pl. metakolin, hisztamin, valamely allergén, leukotrién, sóoldat, hiperventilláció, edzés, széndioxid, adenzin, hideg levegő, antigén vagy bradikinin) hatására gyulladásos válaszreakció (vagyis: gyulladással járó válasz) alakuljon ki; csökkenti a betegség vagy a gyulladásos válaszreakció

előfordulási gyakoriságát és/vagy a betegség vagy a gyulladásos válaszreakció súlyosságát. A gyulladásos válaszreakció veszélyének csökkenése előnyösen olyan mértékű, hogy az emlősnek a továbbiakban nincs rossz közérzete és/vagy működési rendellenessége, ha gyulladáskeltő hatásának van kitéve. Az emlős megvédése jelentheti a vegyületnek azt a képességét, hogy ha beadták az emlősnek, akkor elejét veszi a betegség kitörésének és/vagy gyógyítja vagy enyhíti a betegség tüneteit, jeleit vagy okait. Konkrétabban: az emlős megvédése jelentheti azt, hogy a gyulladásos válaszreakciót úgy modulálja, hogy elnyom (pl. csökkent, gátol vagy blokkol) egy túlzott vagy káros gyulladásos válaszreakciót; és jelentheti egy jótékony hatású, protektív vagy ártalmatlan immunválasz előidézését. Ugyancsak konkrétabban: az emlős megvédése jelentheti a sejtes és/vagy humorális immunitás szabályozását (nevezetesen: a T-sejtek és/vagy az immunoglobulin aktivitás szabályozását, beleértve a Th1-típusú és/vagy Th2-típusú sejtes és/vagy humorális aktivitást). A „betegség” fogalmába tartozik az emlős normális egészségi állapotától való bármilyen eltérés, beleértve azt az állapotot, mikor a tünetek megvannak, valamint azokat az állapotokat, amikor az eltérés (pl. fertőzés, génmutáció, géndefektus, stb.) már megvan, de a tünetek még nem jelentkeztek.

Azok a betegségek, amelyekkel szemben a jelen találmány védőhatású, bármely eozinofiliával, légúti túlérzékenységi reakcióval és/vagy Th2-típusú immunválasszal jellemezhető betegség lehet, amelyekben ezek a jellemzők gyulladásos válaszreakcióval függnek össze. Ilyen betegségek pl. az allergiás légúti megbetegedések, a hipereozinofiliás szindróma, helminthikus parazitogén fertőzés, allergiás rhinitis, allergiás kötőhártya-gyulladás, dermatitis, ekcéma, kontakt dermatitis és étel allergia. Az egyik foganatosítási mód szerint azok a betegsé-



gek, amelyekkel szemben a találmány szerinti eljárás védőhatású lehet, az olyan légzőszervi megbetegedések, melyekre az eozinofiliás légúti gyulladás és/vagy a légúti túlérzékenységi válaszreakció a jellemző. Az ilyen légzőszervi megbetegedések közé tartoznak a fent említett allergiás légúti betegségek, melyek példái az allergiás asztma, az allergiás bronchopulmonális aspergillosis, az eozinofiliás tüdőgyulladás, allergiás bronchitis bronchiectasia, foglalkozási asztma (vagyis: asztma, zihálás, a mellkas összeszorulása és köhögés valamely munkahelyi szenzitizáló szer, pl. valamely allergén, irritáló anyag vagy haptén hatására), továbbá reaktív légúti megbetegedés (valamely szer egyszeri hatására kifejlődő asztma) és az intersticiális tüdő megbetegedés. Még előnyösebb esetben a légzőszervi megbetegedés, amellyel szemben a jelen találmány szerinti eljárás védőhatású lehet, pl. a következők valamelyike: allergiás asztma, intrinsic asztma, allergiás bronchopulmonális aspergillosis, eozinofiliás tüdőgyulladás, allergiás bronchitis bronchiectasia, foglalkozási asztma, reaktív légúti megbetegedés, intersticiális tüdő megbetegedés, hipereozinofiliás szindróma és parazitogén tüdő megbetegedés. Egy további foganatosítási mód szerint a betegség, amellyel szemben a jelen találmány szerinti eljárás védőhatású lehet, pl. egy allergénnel szembeni szenzitizációval összefüggő betegség lehet. Az ilyen betegségek példait a fentiekben már ismertettük. Egy előnyös foganatosítási mód szerint a jelen találmány szerinti eljárás emlősöknek asztmától, és főleg allergiás asztmától való megvédésére szolgál.

Mint a fentiekben már tárgyaltuk, a jelen találmány szerinti eljárás megvédi az emlőst az eozinofiliával, légúti túlérzékenységi válaszreakcióval és/vagy Th2-típusú immunválasszal jellemezhető betegségektől, mely jellemzők gyulladásos válaszreakcióval függnek össze. Bár az eozinofilia, a légúti túlzott reakció és a

Th2-típusú immunválasz minden egyes jellemzőjét az alábbiakban részletesen ismertetjük, azt már most világossá kívánjuk tenni, hogy a jelen találmány szerinti eljárás alkalmas emlősöknek olyan betegségektől való megvédésére, mely betegség ezen jellemzők bármelyikével, vagy ezek kombinációjával rendelkezik és ezek a jellemzők valamely gyulladásos válaszreakcióval függnek össze. Tehát, a jelen eljárással elért eredmények és/vagy a betegség további jellemzői, melyekkel szemben a jelen találmány szerinti eljárás hatásos, pl. olyan betegségekre vonatkoznak, amelyekre a fenti jellegzetességek bármelyike vagy ezek kombinációja a jellemző.

A jelen találmány egyik foganatosítási módja emlősöknek olyan betegség kialakulásától való megvédésére vonatkozik, melyre gyulladásos válaszreakcióval összefüggő eozinofília a jellemző. Ennek az eljárásnak az egyik lépésében hősokk-fehérjét adunk be az ilyen betegségben szenvedő emlősnek. Az „eozinofília” egy olyan klinikailag felismert állapot, mikor az eozinofiliás emlősben jelenlevő eozinofil sejtek száma megnő vagy megemelkedik a normális (vagyis az ilyen állapottól mentes) emlős eozinofil sejtszámához képest. A normális, vagyis eozinofiliával jellemezhető betegségben nem szenvedő emlősben az eozinofil sejtek tipikusan az emlősben jelen lévő fehér vérsejtek össz-számának kb. 0% - kb. 3%-át teszik ki. Az eozinofil vérsejtek számát a szakember számára ismert módszerekkel, főként biológiai festékek, pl. floxin B vagy Diff Quick segítségével mérhetjük.

A találmány szerinti eljárás értelmében ha eozinofiliával jellemezhető betegségben szenvedő emlősnek hősokk-fehérjét adunk be, ez előnyösen az eozinofília csökkenését eredményezi. A találmány szerinti hősokk-fehérje az eozinofil vérsejtek számát előnyösen kb. 0 és 470 sejt/mm^3 közötti; előnyösebben

kb. 0 és kb. 300 sejt/mm³ közötti, és még előnyösebb esetben kb. 0 és kb. 100 sejt/mm³ közötti értékre csökkenti. Egy előnyös fogatosítási mód szerint a jelen találmány szerinti eljárásban beadott hősokk-fehérje az emlősben az eozinofil vérsejtek számát a fehér vérsejtek össz-számának kb. 0 - kb. 3%-ára csökkenti.

A jelen találmány egy másik fogatosítási módja emlősöknek gyulladásos válaszreakcióval összefüggő, légúti túlérzékenységi válaszreakcióval jellemezhető megbetegedéstől való megvédésére szolgáló eljárásra vonatkozik. A „légúti túlérzékenységi válaszreakció” (airway hyperresonsiveness; AHR) a légutak egy abnormális reakcióját jelenti, melyben azok egy, a levegő-beáramlás korlátozottságát előidézni képes inger hatására túl könnyen és/vagy túl nagymértékben szűkülnek össze. Az AHR adódhat a légzőrendszer funkcionális elváltozásából, melyet gyulladás vagy a légutak módosulása (pl. kollagén-lerakódás miatt) okozhat. A levegő-beáramlás korlátozottsága a légutak beszűkülését jelenti, mely lehet irreverzibilis vagy reverzibilis. A levegő-beáramlás korlátozott voltát vagy a légúti túlérzékenységi válaszreakciót okozhatja kollagén-lerakódás, hörgőgörcs, a légúti simaizmok hipertrófiája, a légúti simaizmok kontrakciója, nyálka szekréció, celluláris lerakódás, hám-sérülés, változás a felhám permeábrilitásában, változás a simaizom funkcióban vagy érzékenységben, a tüdő parenchima rendellenességei, a simaizom funkció neurális szabályozásának rendellenességei (beleértve az adrenerg, kolinerg, non-adrenerg és non-kolinerg szabályozást), valamint légúti vagy légút környéki beszűrődéses megbetegedések.

Az AHR stressz-teszt alapján mérhető; ennek során az emlős légzőrendszeri funkcióját mérjük valamely provokáló ágensre (pl. ingerre) adott reakció esetén. Az AHR-t a respirációs funkcióban az alapvonalhoz képest beállt változásként értékeljük: a változást a provokáló ágens dózisa függvényében áb-

rázoljuk (a mérési módszert és az alkalmas emlős-modellt a példákban írjuk le). A respirációs funkciót pl. spirométeres mérés, pletizmográf, csúcsáramlási adatok, tüneti pont értékek, fizikai jelek (légzési sebesség), lihegés, edzés tolerancia, mentő jellegű gyógyszerelés (hörgőtágító) és a vér gáztartalma alapján mérhetjük.

Emberen spirométer alkalmazásával mérhetjük a provokáló szer, pl. metakolin vagy hisztamin hatására a légzési funkcióban beállt változást. Emberen a spirométeres vizsgálatot úgy végezzük, hogy az illetőt megkérjük, vegyen mély lélegzetet, majd a levegőt a lehető leghosszabban, legerősebben és leggyorsabban fújja be a levegőáramlást és térfogatot mérő berendezésbe. Az első másodpercben kilélegzett levegőt erőltetetten kilélegzett levegőtérfogatnak (forced expiratory volume; FEV₁), a kilélegzett össz-levegő mennyiségét erőltetett légzéskor mért vitálkapacitásnak (forced vital capacity; FVC) nevezik. Az elvárható; normális emberi FEV₁ és FVC adatok rendelkezésre állnak testsúly, testmagasság, nem és faj szerint standardizált formában. Egy, a betegségtől mentes egyén FEV₁ és FVC adatai a normális, elvárható értéknek legalább kb. a 80%-át teszik ki és a FEV₁/FVC arány legalább kb. 80%. Az értékeket mind a provokáló szer inhalálása előtt (ez mutatja az emlős nyugalmi állapotát), mind az követően (ez mutatja az emlős nagyobb tüdő-ellenállási állapotát) meghatároztuk. A kapott görbe helyzete jelzi a provokáló szerrel szemben fennálló légúti érzékenységet.

A provokáló szer növekvő dózisainak vagy koncentrációinak a tüdő- funkcióra gyakorolt hatását úgy határozhatjuk meg, hogy a provokáló szerrel kezelt emlősön mérjük az 1. másodpercben erőltetetten kilélegzett levegő térfogatát (FEV₁), valamint a FEV₁ értékek és az erőltetett légzéskor mért vitálkapacitás hányadosát (a FEV₁/FVC arányt). Ember esetében a provokáló szer (azaz a



metakolin vagy hisztamin) azon dózisa vagy koncentrációja, amely FEV_1 értékét 20%-kal csökkenti ($PD_{20} FEV_1$), egyben az AHR mértékének is jelzőszáma. A FEV_1 és FVC értékeket a szakember számára ismert módszerekkel határozzuk meg.

A légúti ellenállással (airway resistance; R_L) és dinamikus teljesítőképességgel (dynamic compliance; C_L), valamint a túlérzékenységi válaszreakcióval kapcsolatos tüdőfunkció adatokat úgy határozhatjuk meg, hogy mérjük a transzpulmonális nyomást, mint a légzőnyílás és a test-pletizmográf közti nyomáskülönbséget. A térfogatot a test-pletizmográfon mért kalibrált nyomásváltozás, az áramlás mértékét a térfogat szignál digitalizált különbsége adja meg. Az ellenállást (R_L) és teljesítőképességet (C_L) a szakember számára ismert módon (pl. a mozgási egyenletnek a legkisebb négyzetek módszerével történő megoldásával) kapjuk meg.

Az AHR értékek méréséhez sokféle provokáló ágenszt alkalmazhatunk. Alkalmask erre a célra a direkt és indirekt ingerek. Az előnyös provokáló ágensek példái a metakolin (Mch), hisztamin, valamely allergén, leukotrién, sóoldat, a hiperventilláció, az edzés, a kéndioxid, adenozin, propranolol, a hideg levegő, valamely antigén, a bradikinin, az acetil-kolin, valamely levegő által hordott szennyező (pl. szemcsék, nitrogén-monoxid, nitrogén-dioxid), a prosztaglandinok, az ózon és ezek keverékei. Provokáló szerként előnyösen metakolint alkalmazunk. A koncentráció-válaszreakció görbe alapján a metakolin előnyös koncentrációi kb. 0,001 - kb. 100 mg/ml között vannak. A metakolin előnyösebben alkalmazható koncentrációi a koncentráció-válaszreakció görbe alapján kb. 0,01 és kb. 50 mg/ml között vannak. A metakolin még előnyösebben alkalmazható koncentrációi a koncentráció-válaszreakció görbe alapján kb. 0,02 és kb. 25 mg/ml

között vannak. Ha provokáló szerként metakolint alkalmazunk, az ARH mértékét a metakolin azon provokatív koncentrációja határozza meg, mely ahhoz szükséges, hogy az emlős FEV_1 értékében 20%-os csökkenés következzen be (PC_{20} metakolin FEV_1). Így pl. ember esetében a szakirodalom szerinti standard kezelési módok alkalmazásakor, normális esetben a kezelési alany tipikusan PC_{20} metakolin $FEV_1 > 8$ mg/ml metakolin értéket ad. Ember esetében az ARH-t tehát a PC_{20} metakolin $FEV_1 < 8$ mg/ml metakolin értékben lehet meghatározni.

Azt, hogy egy gyógyszer mikor tekinthető hatásosnak az AHR kivédésében, azt az AHR-ben szenvedő, vagy arra hajlamos emlősben tipikusan duplázódó mennyiségekben mérjük. Így pl. egy gyógyszer hatékonysága emlősök AHR-től való megvédésében akkor szignifikáns, ha a gyógyszer beadása előtt az emlősben a PC_{20} metakolin FEV_1 értéke 1 mg/ml, a gyógyszer beadása után pedig 2 mg/ml. Hasonlóképpen, a gyógyszert hatásosnak ítéljük, ha a gyógyszer beadása előtt az emlősben a PC_{20} metakolin FEV_1 érték 2 mg/ml, a gyógyszer beadása után pedig 4 mg/ml metakolin.

A jelen találmány egyik fogatosítási módja értelmében a hősokk-fehérje csökkenti a metakolinnal szembeni reakciót emlősökben. A hősokk-fehérje beadása a hősokk-fehérjével kezelt emlős PC_{20} metakolin FEV_1 értékét kb. egy duplázó koncentrációval növeli a normális emlős PC_{20} metakolin FEV_1 értéke irányába. A „normális emlős” nem szenved rendellenes AHR-ben és nem hajlamos rá. A teszt-emlős rendellenes AHR-ben szenved vagy hajlamos erre.

Egy másik fogatosítási mód szerint a hősokk-fehérje emlősnek történő beadása az emlős PC_{20} metakolin FEV_1 értékén olyan értelemben javít, hogy a hősokk-fehérje beadása előtt mért PC_{20} metakolin FEV_1 érték, amikor az emlőst a

metakolin első koncentrációjával provokáljuk, ugyanakkora, mint a hősokk-fehérje beadása után mért érték, amikor az emlőst a metakolin első koncentrációjának a duplájával provokáljuk. A hősokk-fehérje előnyös beadandó mennyisége az a mennyiség, mely az emlős PC_{20} metakolin FEV_1 értékén úgy javít, hogy a hősokk-fehérje beadása előtt mért PC_{20} metakolin FEV_1 érték, amikor az emlőst kb. 0,01 mg/ml és kb. 8 mg/ml közötti koncentrációjú metakolinnal provokáljuk, ugyanakkora, mint a hősokk-fehérje beadása utáni PC_{20} metakolin érték, amikor az emlőst megduplázott koncentrációjú, vagyis kb. 0,02 mg/ml és kb. 16 mg/ml közötti koncentrációjú metakolinnal provokáljuk.

A jelen találmány szerint a légzési funkciót többféle statikus teszttel vizsgálhatjuk; ennek során az emlős légzési funkcióját a provokáló szer nélkül mérjük. Ilyen statikus tesztek pl. a spirométerrel vagy pletizmográfal végzett vizsgálatok, az áramlási csúcsértékek, a tüneti pontszámok, a fizikai jelek (légzési sebesség), lihegés, edzés tolerancia, mentő jellegű gyógyszerelés (pl. hörgőtágítók) és a vér gáztartalma. A tüdőfunkció statikus tesztben pl. a teljes tüdőkapacitás (total lung capacity; TLC), a mellkasi gáztérfogat (thoracic gas volume: TgV), a funkcionális maradék kapacitás (functional residual capacity: FRC), a maradék térfogat (residual volume: RV), és a fajlagos vezetőképesség (specific conductance: SGL) - mely a tüdőtérfogatra utal - alapján értékelhető; mérhetjük továbbá a tüdő diffúziós kapacitását szénmonoxid vonatkozásában (diffusing capacity of the lung for carbon monoxide: DLCO), az artériás vérben lévő gázokat, beleértve a pH-t, a P_{O_2} és P_{CO_2} adatokat a gázcsere vonatkozásában. A levegő-beáramlás korlátozottságát mind az FEV_1 , mind az FEV_1/FVC érték alapján mérhetjük. Ha a humán adatot spirométerrel mérjük, az adott egyén FEV_1 értékét összehasonlíthatjuk az elvárható FEV_1 értékkel. Az elvárható FEV_1 értéknek standard

Azt, hogy egy gyógyszer mikor tekinthető védőhatásúnak egy olyan emlős
estében, mely korlátozott levegő-beáramlástól szenved, vagy erre hajlamos, a
gyógyszer beadása előtt és után mért FEV_1 és/vagy FEV_1/FVC arány %-os javu-
lása alapján határozhatjuk meg. Az egyik fogatosítási mód szerint, a jelen eljá-
rásban a beadott hősokk-fehérje az emlősön a korlátozott levegő-beáramlást úgy
csökkenti, hogy az emlős FEV_1/FVC értéke legalább kb. 80% legyen. Egy másik
fogatosítási mód szerint a hősokk-fehérje beadása az emlős FEV_1 értékét az
emlős elvárható FEV_1 értékének előnyösen kb. 5 - kb. 100%-ával, előnyösebben
kb. 6 - kb. 100%-ával, ennél is előnyösebben kb. 7 - kb. 100%-ával, és még elő-
nyösebben kb. 8 - kb. 100%-ával (vagy kb. 200 ml-rel) javítja.

Megjegyezni kívánjuk, hogy a levegő-beáramlás akadályozottságának diagnosztizálásához nem humán emlős (pl. egér) esetében a légúti ellenállás (R_L) értékét ugyanúgy felhasználhatjuk, mint az ember esetében a FEV_1 értéket és/vagy az FEV_1/FVC arányt. A jelen találmány egyik foganatosítási módja szerint, a hősokk-fehérje beadása a levegő-beáramlás korlátozottságát úgy csökkenti, hogy az emlős R_L értéke legalább kb. 10%-kal, előnyösebben, legalább kb.

20%-kal, ennél is előnyösebben legalább kb. 30%-kal és még előnyösebben legalább kb. 40%-kal csökken.

Az, hogy a statikus teszt a stressz-tesztben használt provokáló szer beadása előtt vagy után is elvégezhető, szintén a jelen találmány oltalmi körébe tartozik.

Egy másik fogatosítási mód szerint, a jelen találmány szerinti eljárásban beadott hősokk-fehérje a levegő-beáramlás korlátozottságát olyan értelemben csökkenti az emlősben, hogy az emlősön este, a lefekvés előtt mért, és reggel a felkeléskor mért FEV₁ vagy PEF értékek közötti eltérés kevesebb, mint kb. 75%, előnyösen kevesebb, mint kb. 45%, előnyösebben kevesebb, mint kb. 15%, és még előnyösebben kevesebb, mint kb. 8%.

A jelen találmány egy még további fogatosítási módja emlősöknek Th2-típusú immunválasszal jellemezhető gyulladásos megbetegedéstől való megvédésre szolgáló eljárásra vonatkozik. Az eljárás során az ilyen betegségben szenvedő emlősnek hősokk-fehérjét adunk be. A jelen találmány értelmében valamely Th2-típusú immunválasszal (vagy alternatív megjelöléssel: Th2 immunválasszal) jellemezhető betegség az, amelynek során a helper T-limfocitáknak a szakirodalomból Th2-típusú T-limfocákként ismert alcsoportja dominánsan aktiválódik a Th1-típusú T-limfociták (vagy Th1 limfociták) aktiválódásához képest. A jelen találmány szerint a Th2-típusú T-limfociták azzal jellemezhetők, hogy egy vagy több olyan citokint termelnek, melyek Th2-típusú citokinként ismertek. A Th2-típusú citokinek közé a következőket soroljuk: interleukin-4 (IL-4), interleukin-5 (IL-5), interleukin-6 (IL-6), interleukin-9 (IL-9), interleukin-10 (IL-10), interleukin-13, (IL-13) vagy interleukin-15 (IL-15). Ezzel szemben a Th1-típusú limfociták által termelt citokinek közé pl. az IL-2 és az IFN- γ tartozik. Alternatív lehetőség a Th2-

típusú immunválasz jellemzésére, hogy az némelykor dominánsan bizonyos antitest izotípusok termelődésével, pl. IgG1 (melynek a humán ekvivalense közelítőleg az IgG4) és IgE termelődésével jellemezhető, míg a Th1-típusú immunválasz némelykor egy IgG2a vagy IgG3 antitest izotípus (melynek a humán ekvivalense közelítőleg az IgG1, IgG2, vagy IgG3) termelődésével jellemezhető.

A jelen találmány szerinti eljárásban a Th2-típusú válasszal jellemezhető betegségben szenvedő emlősnek hősokk-fehérjét beadva azt érzük el, hogy az emlős immunválasza a Th2-típusú választól egy dominánsabban Th1-típusú válasz felé (irányába) módosul (modulálódik). A jelen találmány szerinti eljárásban a hősokk-fehérje beadása előnyösen csökkenti (vagy elnyomja) a T-limfociták Th2-típusú citokin (pl. IL-4 és IL-5) termelését. Ezenkívül, vagy alternatív esetben a jelen találmány szerinti eljárásban a hősokk-fehérje beadása növeli (vagy indukálja) a T-limfociták Th1-típusú citokin (pl. az IFN- γ) termelését. Ezenkívül, a jelen találmány szerinti eljárásban a hősokk-fehérje beadása némelykor csökkentheti a Th2-típusú antitest izotípusok termelődését (pl. IgG1 és IgE) és/vagy növelheti a Th1-típusú antitest izotípusok termelődését (pl. IgG2a vagy IgG3).

Az egyik fogatosítási mód szerint a fenti betegségben szenvedő emlősnek beadott hősokk-fehérje az emlős szérumában az IgG1 szintet (melynek a humán izotípus ekvivalense közelítőleg az IgG4) kb. 0 és kb. 100 nemzetközi egység/ml közötti értékre, előnyösen kb. 0 és kb. 50 IE/ml közötti értékre, előnyösebben kb. 0 és kb. 25 IE/ml közti értékre és még előnyösebben kb. 0 és kb. 20 IE/ml közötti értékre csökkenti. Az emlős szérumában a IgG1 koncentrációt a szakember számára ismert módszerekkel mérhetjük. Nevezetesen, az emlős szérumában az IgG1 koncentrációt, vagy az emlős B-sejtjei által in vitro termelt IgG1

koncentrációját az IgG1-hez specifikusan kötődő antitestek segítségével, ELISA-tesztel vagy radioimmunoassay alkalmazásával mérhetjük.

Egy másik foganatosítási mód szerint a fenti betegségben szenvedő emlősnek beadott hősokk-fehérje az emlős szérumában az IgG2a szintet (melynek közelítő humán izotípus ekvivalense az IgG1, IgG2 vagy IgG3) előnyösen kb. 0 és kb. 100 IE/ml közötti, előnyösebben kb. 10 és kb. 50 IE/ml közötti, ennél is előnyösebben kb. 15 és kb. 25 IE/ml közötti, és még előnyösebben kb. 20 IE/ml értékre növelheti.

Mint fentebb már tárgyaltuk, a jelen találmánynak ez egy olyan foganatosítási módja, amely szerint a Th2-típusú immunválasz összefügghet a betegség más, a fentiekben már leírt jellemzőivel, amelyekkel szemben a jelen találmány szerinti eljárás védőhatású (pl. eozinofília és/vagy légúti túlérzékenységi válaszreakció). Így pl. az eozinofília összefügg az IL-5 citokin termelődésével, a légúti túlérzékenységi válaszreakció pedig az IL-4 citokin termelődésével függhet össze. Az egyik foganatosítási mód szerint, az emlősöknek eozinofiliával, légúti túlérzékenységi reakcióval és/vagy Th2-típusú immunválasszal jellemezhető betegségtől való megvédésére szolgáló eljárásban ez a betegség gyulladásos megbetegedéssel, továbbá fokozott citokin termelődéssel is összefügghet, mely citokin a következők valamelyike lehet: interleukin-4 (IL-4), interleukin-5 (IL-5), interleukin-6 (IL-6), interleukin-9 (IL-9), interleukin-10 (IL-10), interleukin-13, (IL-13) vagy interleukin-15 (IL-15).

A jelen találmány értelmében a hősokk-fehérje beadására vonatkozó elfogadható utasításnak mind a beadás módját, mind az emlősnek beadandó hősokk-fehérje mennyiségét tartalmaznia kell, beleértve a dózis nagyságát, a dózisok számát és a dózis beadási gyakoriságát. Az ilyen utasítást a szakember el tudja

készíteni. A beadás módjának példái az orális, nazális, topikális, inhalált, transzdermális, rektális és parenterális módok. A parenterális utak előnyös példái a szubkután, intradermális, intravénás, intramuszkuláris és intraperitoneális beadási módok. A topikális bejuttatás előnyös példái az aeroszol inhalálása (azaz : spray), a nazális bejuttatás, vagy a HSP-nek egy felületről helyileg az emlős bőrére juttatása. Egy előnyös fogantatási mód szerint, a jelen találmány szerinti eljárásban az alkalmazott hősokk-fehérjét nazális vagy inhalációs úton adjuk be. Egy, a hősokk-fehérjét kódoló nukleinsav molekula előnyös beadási módjait az alábbiakban részletezzük.

Mint a fentiekben megtárgyaltuk, a jelen találmány szerinti eljárásban az emlősnek beadott hősokk-fehérje egy vagy több hatást eredményezhet, melynek példái az eozinofília csökkentése (pl. légúti eozinofiliás gyulladás), a légúti túlérzékenységi válaszreakció csökkentése, IFN- γ termelődés indukálása a T-sejtekben és/vagy a T-sejtes IL-5 és/vagy IL-4 termelés szuppresszálása. A jelen találmány szerinti eljárás értelmében az emlősnek beadandó hősokk-fehérje hatásos mennyisége az a mennyiség, mely képes a légúti túlérzékenységi válaszreakció (AHR), az eozinofília csökkentésére, amely csökkenti a levegő-beáramlás korlátozottságát és/vagy a tüneteket (pl. kapkodó légzés, zihálás, nehézlégzés, mozgás korlátozottság vagy éjszakai felébredések), amely a T-sejtekben IFN- γ termelődést indukál és/vagy szuppresszálja a T-sejtek IL-4 és/vagy IL-5 termelését, anélkül, hogy toxikus volna az emlősre. Az emlősre nézve toxikus mennyiség alatt bármely olyan mennyiséget értünk, mely az emlős felépítésében vagy működésében (funkciójában) kért tesz (vagyis: mérgező).

Az emlősnek beadandó hősokk-fehérje alkalmas egyszeri dózisa az a dózis, melyet megfelelő időn át egyszer vagy többször beadva, az képes az emlőst az olyan betegségtől megvédeni, mely eozinofiliával, légúti túlérzékenységi válaszreakcióval és/vagy Th2-típusú immunválasszal jellemezhető, mely gyulladásos válaszreakcióval van összefüggésben. Konkrétabban, a hősokk-fehérje alkalmas egyszeri dózisa az a dózis, mely az AHR-t a provokáló szer egy duplázó dóziséval javítja, vagy az emlős statikus respirációs funkcióját javítja. Alternatív esetben alkalmas egyszeri hősokk-fehérje dózisként azt a dózist tekintjük, mely az emlős eozinofil sejtszámát a fentiekben leírt szintre csökkenti, fokozza a Th1-típusú citokinek (pl. az IFN- γ) termelődését és/vagy gátolja a Th2-típusú citokinek (pl. IL-4 és IL-5) termelődését.

A hősokk-fehérje előnyös egyszeri dózisa kb. $0,1 \mu\text{g} \times \text{kg}^{-1}$ és kb. $10 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$ közötti az emlős testsúlyára számítva. A hősokk-fehérje előnyösebb egyszeri dózisa kb. $1 \mu\text{g} \times \text{kg}^{-1}$ és kb. $10 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$ közötti az emlős testsúlyára számítva. A hősokk-fehérje még előnyösebb egyszeri dózisa kb. $1 \mu\text{g} \times \text{kg}^{-1}$ és kb. $5 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$ közötti az emlős testsúlyára számítva. A hősokk-fehérje különösen előnyös egyszeri dózisa kb. $1 \mu\text{g} \times \text{kg}^{-1}$ és kb. $1 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$ közötti az emlős testsúlyára számítva. Egy másik fogatosítási mód esetében a hősokk-protein különösen előnyös egyszeri dózisa, ha t. i. a hősokk-fehérjét aeroszol formájában visszük be, kb. $0,1 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$ és kb. $5 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$ közötti az emlős testsúlyára számítva. A hősokk-fehérje egy további különösen előnyös dózisa, ha t. i. a hősokk-fehérjét parenterálisan juttatjuk be, kb. $0,1 \mu\text{g} \times \text{kg}^{-1}$ és kb. $10 \mu\text{g} \times \text{kg}^{-1}$ közötti az emlős testsúlyára számítva.

Egy másik fogatosítási mód értelmében a találmány szerinti hősokk-fehérjét egy olyan vegyülettel egyidejűleg, vagy egymást követően adjuk be, mely vegyület fokozza a hősokk-fehérje azon képességét, amellyel az emlőst az eozinofiliával, légúti túlérzékenységi válaszreakcióval és/vagy Th2-típusú immunválasszal jellemezhető, gyulladásos reakcióval összefüggő betegségtől megvédi. A jelen találmány vonatkozik továbbá egy olyan készítményre is, mely hősokk-fehérjét és legalább egy ilyen vegyületet tartalmaz, emlősöknek gyulladással járó betegségtől való megvédésére. Az olyan alkalmas vegyületek példái, melyek a hősokk-fehérjével egyidejűleg vagy egymást követően adhatók be, pl. olyan vegyületek, melyek képesek az IgG1 vagy IgE termelés szabályozására (vagy elnyomják az interleukin-4 indukálta IgE szintézist), fokozzák az interferon-gamma termelését, szabályozzák az NK sejtek proliferációját és aktivációját, szabályozzák a limfokin által aktivált killer sejteket (LA-K), szabályozzák a T helper sejtek aktivitását, szabályozzák a masztociták degranulálódását, védik a szenzor idegvégződéseket, szabályozzák az eozinofil és/vagy blaszt sejtek aktivitását, kivédik a simaizmok kontrakcióját vagy relaxáltatják ezeket az izmokat, csökkentik a mikrovaskuláris permeabilitást vagy modulálják a Th1 és/vagy Th2 alcsoportba tartozó sejtek differenciálódását. A hősokk-fehérjével szimultán vagy egymást követően beadható vegyületek előnyös képviselői közé pl. a gyulladásgátló szerek bármelyikét sorolhatjuk, de a lehetőségek nem korlátozódnak ezekre. A jelen találmány értelmében a gyulladásgátló szer bármely olyan vegyület lehet, melyről a szakirodalomból ismert hogy van gyulladásgátló hatása, lehet továbbá bármely olyan vegyület is, mely bizonyos körülmények között és/vagy hősokk-fehérjével együtt tud gyulladásgátló hatást kifejteni. Azon előnyös gyulladásgátló szerek példái, melyek valamely hősokk-fehérjével egyidejűleg vagy egymást követően

adhatók be pl. valamely antigén, allergén, haptén, gyulladást keltő citokin antagonistája (pl. anti-citokin antitestek, oldható citokin receptorok), gyulladást keltő citokinek receptor-antagonistái (pl. anticitokin receptor antitestek), anti-CD23, anti-IgE, leukotrién szintézis inhibitorok, leukotrién receptor antagonisták, glükokortikoszteroidok, szteroidok kémiai származékai, anti-ciklooxygenáz hatású szerek, anti-kolinerg hatású anyagok, β -adrenerg agonisták, metil-xantinok, antihisztaminok, kromonok, zileuton, anti-CD4 reagensek, anti-IL-5 reagensek, felületaktív anyagok, anti-tromboxán reagensek, anti-serotonin reagensek, ketotiphen, citoxin, ciklosporin, metotrexát, makrolid antibiotikumok, heparin, kis molekulatömegű heparin vagy ezek keverékei.

Az emlősnek beadandó hősokk-fehérje és/vagy a jelen találmány szerinti készítmény más komponenseket, így pl. valamely gyógyászatilag elfogadható excipienst is tartalmazhat. A jelen találmány szerinti készítményeket olyan excipiensben adhatjuk be, amelyet a megvédeni kívánt emlős tolerálni képes. Az ilyen excipiensek példái a víz, a sóoldat, a foszfáttal pufferolt oldatok, a Ringer-oldat, a dextróz-oldat, a Hank-oldat, a fiziológiailag kiegyenlített sóoldatot, tartalmazó polietilén-glikol, és más vizes, fiziológiailag kiegyenlített oldatok. Nem vizes vivőanyagokat így pl. nem illékony olajokat, szezámolajat, etil-oleátot vagy triglicerideket is alkalmazhatunk. A készítmény más, hasznos formája a pl. a viszkozitást növelő szert, pl. karboxi-metil-cellulózt, szorbitot vagy dextrant tartalmazó szuszpenzió. Az excipiensek kis mennyiségben adalék-anyagokat, pl. az izotóniás állapotot és a kémiai stabilitást elősegítő anyagokat vagy puffereket is tartalmazhatnak. A pufferek példái pl. a foszfát puffer, bikarbonát puffer és a trisz puffer, a tartósító szerek példái a timerozal, a m- vagy o-krezol, a formalin és a benzilalkohol. A standard készítmények lehetnek folyékony injekciós oldatok vagy

szilárd anyagok, melyeket megfelelő folyadékkal injektálható oldattá vagy szuszpenzióvá lehet alakítani. Nem folyékony készítmény esetén az excipiens tartalmazhat dextrózt, humán szérum-albumint, tartósítószereket, stb. s ehhez a beadás előtt vizet vagy sóoldatot adhatunk. A hősokk-proteineket kódoló nukleinsav molekulák beadásánál használható gyógyászatilag elfogadható excipiensek példáit az alábbiakban részletezzük.

A jelen találmány egyik foganatosítási módja szerint a hősokk-fehérjét vagy a találmány szerinti készítményt szabályozott hatóanyag kibocsátású készítmény formára is hozhatjuk, mely képes arra, hogy az emlősbe a hősokk-proteint vagy a jelen találmány szerinti készítményt lassan adja le. Az alkalmas szabályozott hatóanyag leadású vivőanyagok példái a biológiailag összeférhető polimerek, más polimer mátrixok, kapszulák, mikrokapszulák, mikrorészecskék, bólusz preparátumok, ozmotikus pumpák, diffúziós eszközök, liposzómák, liposzférikus részecskék száraz porok és transzdermális bejuttató rendszerek. A jelen találmány szerinti szabályozott hatóanyag leadású készítmény további példái az olyan folyadékok, melyek az emlősnek történő beadás után in situ géllé vagy szilárd anyaggá alakulnak. A szabályozott hatóanyag leadású készítmények előnyös képviselői biológiailag lebonthatók.

A jelen találmány szerinti szabályozott hatóanyag leadású készítmények a hősokk-proteint vagy a jelen találmány szerinti készítményt előnyösen olyan konstans sebességgel adják le az emlős vérébe, hogy ott a hősokk-proteinből vagy a találmány szerinti készítményből terápiás dózis szint alakuljon ki a gyulladásnak bizonyos időn át (mely néhány naptól hónapokig terjedhet, a hősokk-fehérje toxicitási paramétereitől függően) történő kivédésére. A találmány szerinti szabályozott hatóanyag leadású készítmény előnyösen legalább kb. 6 órán át,

előnyösebben legalább kb. 24 órán át, és még előnyösebben legalább kb. 7 napon át képes a védőhatást biztosítani.

A jelen találmány egy másik fogatosítási módja, eljárás kezelés előírására gyulladásos válaszreakcióval járó betegséggel összefüggő légúti túlérzékenységi válaszreakció és/vagy a levegő-beáramlás korlátozottsága esetére, mely eljárásra jellemző, hogy (a) az emlősnek hősokk-fehérjét adunk be; (b) mérjük, hogy provokáló ágens hatására az emlős tüdőfunkciója hogyan változik, hogy megállapíthassuk, hogy a hősokk-fehérje modulálhatja-e a légúti túlérzékenységi válaszreakcióit és/vagy a levegő beáramlás korlátozottságát; és (c) a tüdőfunkcióban észlelt változás alapján előírunk egy olyan farmakológiai gyógymódot, mely hatásosan csökkenti a gyulladást.

A tüdőfunkcióban beállt változást a hősokk-fehérje beadása előtt és után mért statikus respirációs funkció alapján észleljük. A jelen találmány értelmében a hősokk-fehérjét olyan emlősnek adjuk, melyről tudjuk, hogy gyulladással járó légzőszervi betegsége van. A provokáló ágens hatására bekövetkező tüdőfunkció változást többféle, a szakember számára ismert módszerrel mérhetjük. A provokáló ágens lehet közvetlen és közvetett inger és bármely a fentiekben említett provokáló szer. Nevezetesen, a tüdőfunkció változást mérhetjük a FEV_1 , a FEV_1/FVC , a PC_{20} metakolin FEV_1 , a post-enhanced h (Penh) érték alapján, továbbá a vezetőképesség, a dinamikus teljesítőképesség, a tüdő ellenállás (R_L) a légúti nyomás idő-index (APTI) és/vagy a provokáló ágenssel kezelt recipiens áramlási csúcsértékei alapján. A tüdőfunkció változásainak mérésére szolgáló egyéb módszerek pl. a légúti ellenállás, a dinamikus teljesítőképesség, a tüdőterfogat, az áramlási csúcsértékek, a tüneti pontszámok, a fizikai jelek (légzési sebesség), a lihegés, edzés-tolerancia, mentő jellegű gyógyszerezés

(hörgőtágítók) és a vérben lévő gázok meghatározása. Az emlős gyulladásos betegségének csillapítására alkalmas hatásos farmakológiai gyógymódot úgy alakíthatjuk ki, hogy meghatározzuk, hogy a hősokk-fehérje beadása hatással van-e, és milyen mértékű hatással van az emlős tüdőfunkciójára. Ha a hősokk-fehérje beadása következtében változás következik be a tüdőfunkcióban, akkor az emlős kezelhető hősokk-proteinnel. A tüdőfunkcióban beállt változás mértékétől függően kiegészítő vegyületeket adhatunk be az emlősnek a kezelés eredményességének elősegítésére. Ha a hősokk-fehérje beadásának hatására a tüdőfunkcióban nem következik be változás vagy ha az igen kis mértékű, akkor az adott emlőst a hősokk-fehérje valamely alternatívájával kell kezelni. A légzőszervi megbetegedés kezelésére vonatkozó előírásra szolgáló eljárásban a beteg egyéb jellemzőit, pl. a légzőszervi betegség kórlefolyását, fertőző anyag jelenlétét, a beteg szokásait (pl. dohányzás, munkahelyi és lakókönyezetét, allergiáját, az életveszélyes respirációs eseményeket, a betegség súlyosságát, a betegség időtartamát (vagyis akut vagy krónikus) és a korábbi reagálást más gyógyszerekre és/vagy gyógykezelésre, is értékelhetjük.

A jelen találmány egy másik fogatosítási módja emlősöknek olyan betegségtől való megvédésére szolgáló eljárásra vonatkozik, mely betegség egy vagy több jellemzővel azonosítható a következők közül választva: eozinofília, légúti túlérzékenységi válaszreakció és Th2-típusú immunválasz, mely jellemzők gyulladásos válaszreakcióval függnek össze. Ezen eljárás egyik lépésében hősokk-fehérjét kódoló nukleinsav molekulát adunk be az ilyen betegségben szenvedő emlősnek. A hősokk-fehérjét kódoló ilyen nukleinsav molekula ezután annak az emlősnek a gazdasejtjében expresszálódik, melybe az izolált nukleinsavat bejuttattuk. Az expresszált hősokk-protein ezután a bejuttatás helyén ugyan-

úgy funkcionál, mint azt a fentiekben a jelen eljárásban hasznosítható hősokk-fehérjéről már leírtuk (vagyis: megvédi az emlőst az eozinofiliával, légúti túlérzékenységi reakcióval és/vagy Th2 immunválasszal jellemezhető betegségtől, mely jellemzők gyulladásos válaszreakcióval függnek össze).

A jelen találmány értelmében a nukleinsav molekula lehet DNS, RNS, vagy akár a DNS, akár az RNS valamely származéka. A hősokk-fehérjét kódoló nukleinsav molekulát előállíthatjuk ezek természetes forrásából, akár mint teljes (komplett) gént, akár mint ennek egy olyan darabját, mely képes arra, hogy az emlőst megvédje az olyan betegségektől, mely a következő jellemzők valamelyikével azonosítható: eozinofilia, légúti túlérzékenységi válaszreakció és/vagy Th2-típusú immunválasz, ha az ilyen fehérjét és/vagy az ilyen fehérjét kódoló nukleinsav molekulát beadjuk az emlősnek. A nukleinsav molekulát rekombináns DNS technikával (pl. polimeráz láncreakciós (PCR) felszaporítás, klónozás) vagy kémiai szintézis útján is előállíthatjuk. A nukleinsav molekula lehet természetes nukleinsav molekula, vagy ennek homológja, beleértve pl. a természetes allélikus variánsokat és a módosított nukleinsav molekulákat, amelyekbe nukleotidokat inszertáltak, vagy amikből ilye(neke)t töröltek, ilyet szubsztituáltak és/vagy invertáltak, oly módon, hogy ezek a módosítások lényegében nem zavarják meg a nukleinsav molekulának azt a képességét, hogy a jelen találmány szerinti eljárásban hasznosítható hősokk-fehérjét kódoljon. Az egyik fogatosítási mód szerint a jelen találmány szerinti eljárásban hasznosítható hősokk-fehérjét kódoló nukleinsav molekula nukleinsav szekvenciája legalább kb. 70%-ban, előnyösebben legalább kb. 80%-ban és még előnyösebben legalább 90%-ban azonos a természetes előfordulású hősokk-fehérje nukleinsav szekvenciájával. Az izolált, vagy biológiailag tiszta nukleinsav molekula egy olyan nukleinsav molekula, melyet

természetes környezetéből nyertek ki. Az „izolált” és „biológiai tisztta”, mint olyan, nem feltétlenül tükrözi, hogy a nukleinsav molekulát milyen mértékben tisztították.

Nukleinsav molekula homológokat számos, a szakember számára ismert módszerrel állíthatunk elő (lásd pl. Sambrook és munkatársai, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Labs. Press, 1989). A nukleinsav molekulák többféle módszerrel, így pl. klasszikus mutagenézis technikával és rekombináns DNS technikával módosíthatók; ilyen módszerek példái a helyszínen kiváltott mutagenézis, a nukleinsav molekula kémiai kezelése, mely után a nukleinsav molekula mutációt indukál, nukleinsav fragmens kivágása restikációs enzimmel, nukleinsav fragmensek összeillesztése ligázzal, polimeráz láncreakció (PCR) amplifikáció és/vagy valamely nukleinsav szekvencia választott régiójának mutagenézise, oligonukleotid keverékek szintézise és a keverékekben lévő csoportok ligálása útján nukleinsav molekula-keverék „felépítése”, és ezek kombinációi. A módosított nukleinsav keverékéből a nukleinsav homológokat a nukleinsav által kódolt protein funkciójának (pl. itt a hősokk-fehérje aktivitásnak) a szkrinelése alapján szelektáljuk. A hősokk-fehérje aktivitás szkrinelésére alkalmas módszerek a szakember számára ismertek.

Bár a „nukleinsav molekula” kifejezés elsősorban fizikailag a nukleinsav molekulára, a „nukleinsav szekvencia” kifejezés pedig elsősorban a nukleinsav molekulában lévő nukleotidok sorrendjére vonatkozik, a két kifejezés egymással felcserélhető az olyan nukleinsav molekula vagy az olyan nukleinsav szekvencia vonatkozásában, amelyek képesek hősokk-fehérjék kódolására. Továbbá, a „rekombináns molekula” kifejezés elsősorban olyan nukleinsav molekulára vonatkozik, amely egy transzkripció szabályozó szekvenciához operatív módon kap-

csolódik, de felcserélhető a „nukleinsav molekula” kifejezéssel, mely az emlősnek beadott nukleinsav molekulára vonatkozik.

Mint a fentiekben leírtuk, a jelen találmány szerinti eljárásban hasznosítható hősokk-fehérjét kódoló nukleinsav molekula operatív módon egy vagy több transzkripció szabályozó szekvenciához kapcsolt lehet, s így alakul ki egy rekombináns molekula. Az „operatív módon kapcsolt” (vagy így kapcsolódó) kifejezés azt jelenti, hogy a nukleinsav molekulát úgy kapcsoljuk egy transzkripció szabályozó szekvenciához, hogy a molekula képes expresszálni valamely gazdaszövetbe transzfektáltan (pontosabban: transzformáltan, transzdukáltan vagy transzfektáltan). A transzkripció szabályozó szekvenciák, azok melyek a transzkripció során az iniciációt, az elongációt és a lánczárást szabályozzák. A transzkripció szabályozó szekvenciák közül különösen fontosak azok, amelyek a transzkripció iniciációját szabályozzák, ilyenek pl. a promóter, enhancer, operátor és represszor szekvenciák. Az alkalmas transzkripció szekvenciák közé sorolható minden olyan transzkripció szekvencia, amely hősokk-fehérjek expressziójára alkalmas rekombinációs sejtben működni tud és/vagy amely alkalmas arra, hogy a találmány szerinti eljárásban emlősnek beadják. A szakember számos transzkripció szabályozó szekvenciát ismer. A transzkripció szabályozó szekvenciák közül azok az előnyösek, amelyek emlős-, baktérium- vagy rovar-sejtekben, előnyösen emlős-sejtekben funkcionálnak. Az előnyösebb transzkripció szabályozó szekvenciák példái a majomvírus-40 (SV-40), a β -aktin, a retrovírus eredetű hosszú ismétlődő záró-szekvencia (retroviral long terminal repeat; LTR), a Rous-szarkóma vírus (RSV), a citomegalovírus (CMV), tac, lac, trp, trc, oxi-pro, omp/lpp, rrnb, lambda bakteriofág (λ) (pl.: λP_L és λP_R és az ilyen

promotert tartalmazó fúziós termékek), T7 bakteriofág, T7lac, T3 bakteriofág, SP6 bakteriofág, SP01 bakteriofág, metallotionein, a párosodási faktor, a *Pichia* alkohol oxidáz, alphavírus, szubgenom promóterek (pl. Sindbis vírus szubgenom promóterek) baculovírus, *Heliothis zea* rovar vírus, vaccinia-vírus és más poxvírusok, herpesz-vírus és az adenovírus transzkripciósszekvenciák, valamint más olyan szekvenciák, amelyek képesek a génexpresszió eukarióta-sejtekben való szabályzására.

A további alkalmas transzkripciósszabályozó szekvenciák példái a szövet-specifikus promóterek és serkentők (pl. T-sejt specifikus serkentők és promóterek). A jelen találmány szerinti transzkripciósszekvenciák közé sorolhatók még a természetben előforduló transzkripciósszabályozó szekvenciák, melyek természetes úton kapcsolódtak össze egy olyan génnel, mely a jelen találmány szerinti eljárásban hasznosítható hősokk-fehérjéket kódolja.

A jelen találmányban alkalmazható rekombináns molekulák (mely DNS vagy RNS lehet) további szabályozó szekvenciákat, így pl. translációsszabályozó szekvenciákat, replikációs origót vagy más, a rekombináns sejttel kompatibilis szabályozó szekvenciákat tartalmazhatnak. Az egyik fogatosítási mód szerint a jelen találmány szerinti rekombináns molekula szekréciós szignált (vagyis egy szignál szegmens nukleinsav szekvenciát) is tartalmazhat, mely arról gondoskodik, hogy az expresszált hősokk-fehérje szekréciója a proteint termelő sejtől megtörténjen. Az alkalmas szignál szegmensek példái: (1) valamely bakteriális szignál szegmens, főként hősokk-fehérje szignál szegmens, vagy (2) bármely olyan szignál szegmens, mely képes a hősokk-fehérje sejtől való szekrécióját irányítani. Az előnyös szignál szegmensek közé tartozik pl. az olyan szignál

szegmens, mely a fentiekben említett hősokk-fehérjék bármelyikével természetes úton összekapcsolódott.

A kódolt termék (vagyis: a hősokk-fehérje) előállításához a jelen találmány szerinti egy vagy több rekombináns molekulát használhatjuk. Az egyik fogatosítási mód szerint valamely kódolt terméket úgy állítunk elő, hogy a jelen találmány szerinti nukleinsav molekulát az előállítandó protein előállítása szempontjából hatékony körülmények között expresszáljuk. A kódolt protein előállításának előnyös módja, hogy a gazdasejtet egy vagy több olyan rekombináns molekulával transzfektáljuk, mely(ek)nek a nukleinsav szekvenciája a hősokk-fehérjét kódolja, s így rekombináns sejtet hozunk létre. Transzfekcióra alkalmas sejt alatt azt értjük, hogy ez bármilyen sejt lehet, ha azon a transzfekció elvégezhető. Gazdasejt lehet olyan sejt, amelyen transzfekciót még nem végeztek, és lehet olyan sejt, melyet már legalább egy nukleinsav molekulával transzformáltak. A jelen találmányban hasznosítható gazdasejt bármely, hősokk-fehérje termelésre képes sejt lehet, beleértve a baktérium-, gomba-, emlős- és rovar-sejteket, melyek közül az emlős-sejt az előnyös. Az előnyösebb gazdasejtek példái az emlős limfociták, izom-sejtek, hematopoetikus prekurzor sejtek, masztociták, természetes killer sejtek, makrofágok, monociták, epiteliális sejtek, endoteliális sejtek, dendrit sejtek, mesenchyma sejtek, eozinofil sejtek, tüdő-sejtek és keratinociták.

A jelen találmány értelmében a gazdasejt transzfekcióját végezhetjük in vivo (vagyis: a nukleinsav molekulának az emlősbe való bejuttatása útján), ex vivo (az emlősön kívül, de abból a célból, hogy újra bejuttassuk az emlősbe, pl. úgy, hogy az emlősből eltávolított sejtbe szövettenyészetben juttatjuk be a nukleinsav molekulát, majd a sejtet visszajuttatjuk az emlősbe), vagy in vitro (vagyis: az emlősön kívül, szövettenyészetben, a rekombináns hősokk-fehérje termelés cél-

jából). A nukleinsavat transzfekció céljából bármely olyan módszerrel bejuttathatjuk a gazdasejtbe, mellyel a nukleinsav molekula a sejtbe inszertálható. A transzfekció módszereinek példái a transzfekció, az elektroporáció, a mikroinjekció, a lipofekció, az adszorpció és a protoplaszt fúzió. Gazdasejtek transzfekciójának előnyös módjai in vivo pl. a lipofekció és az adszorpció. A jelen találmány szerinti rekombináns sejt hősokk-fehérjét kódoló nukleinsav molekulával transzfektált gazdasejtet tartalmaz. A szakember számára nyilvánvaló, hogy a rekombináns DNS technika alkalmazásakor a transzfektált nukleinsav molekulák expresszióját pl. a gazdasejtben lévő nukleinsav molekulák kópia-számának, a kérdéses nukleinsav molekulák transzkripció hatékonyságának, a kapott átírt szekvenciák transzlációs hatékonyságának és a transzlációt követő módosítások hatékonyságának manipulálásával lehet javítani. Azoknak a rekombináns módszereknek a példái, amelyekkel a hősokk-fehérjét kódoló nukleinsav molekulák expresszióját fokozhatjuk, pl. a nukleinsav molekulák operatív módon nagy kópia-számú plazmidokhoz történő kapcsolása, a nukleinsav molekula egy vagy több gazdasejt kromoszómába történő integrálása, vektor stabilitási szekvenciák hozzáadása plazmidokhoz, a transzkripció szabályozó szignálok (pl. promóterek, operátorok és serkentők) szubsztitúciója vagy módosítása, a transzlációs szabályozó szignálok (pl. riboszóma kötőhelyek, Shine-Dalgarno szekvenciák) szubsztitúciója vagy módosítása, a nukleinsav molekulák módosítása olyan értelemben, hogy ezek megfeleljenek a gazdasejt kodon-használatának és azon szekvenciák törlése, amelyek a transzkriptumot destabilizálják. Valamely expresszált rekombináns hősokk-fehérje aktivitását az ilyen proteint kódoló nukleinsav molekulák fragmentálása, módosítása vagy származékainak kialakítása útján javíthatjuk.



A jelen találmány egyik fogantatási módja szerint a hősokk-fehérjét kódoló nukleinsavat valamely gyógyászatilag elfogadható excipienssel együtt adhatjuk be. A gyógyászatilag elfogadható excipiensek példái a vizes, fiziológiailag kiegyenlített oldatok, valamely mesterséges lipid-tartalmú szubsztrát, természetes lipid-tartalmú szubsztrát, valamely olaj, észter, glikol, vírus, fém-részecske vagy kationos molekula. A hősokk-fehérjét kódoló nukleinsav molekula beadására különösen előnyösen alkalmazható excipiensek példái a liposzómák, micellák, sejtek és sejt-membránok.

A jelen találmány szerinti eljárásban beadandó rekombináns nukleinsav molekulák lehetnek: (a) a jelen találmány szerinti eljárásban alkalmazható a célba juttatásban szerepet nem játszó vivőanyagban levő rekombináns molekulák (pl. mint „csupasz” DNS molekulák, mint azt pl. Wolff és munkatársai ismertették; 1990, Science 247, 1465-1468); és (b) a jelen találmány szerinti rekombináns molekulák a jelen találmány szerinti szállító vivőanyagokkal komplex kapcsolatban. Helyi beadásra alkalmas szállító vivőanyagok pl. a liposzómák. Helyi beadásra szánt szállító vivőanyagok továbbá az olyan ligandok, amelyek a vivőanyagot egy adott helyre célba juttatják (melyeket itt írunk le részletesen). A hősokk-fehérjét kódoló nukleinsav molekulát előnyösen intradermális injekcióban, intramuszkuláris injekcióban, intravénás injekcióban, szubkután injekcióban vagy ex vivo eljárással adjuk be.

Az egyik fogantatási mód szerint a jelen találmány szerinti eljárásban alkalmazható rekombináns nukleinsav molekulát közvetlenül a beteg izomsejtjeibe injektáljuk, ami hosszú időn át tartó (pl. hetektől hónapokig tartó) expressziót eredményez az adott rekombináns molekula estében. Az ilyen rekombináns mo-

lekula előnyösen „csupasz DNS” formában van és a betegbe az izomsejtekbe adott közvetlen injekcióval juttatjuk be.

A célba juttatásra képes gyógyászatilag alkalmas elfogadható excipienst „szállító vivőanyagnak”-nak nevezzük. A szállító vivőanyagok a találmány szerinti készítményt, beleértve a hősokk-fehérjét és/vagy a hősokk-proteint kódoló nukleinsav molekulát, képesek a cél-helyre vinni az emlősben. A „cél-hely” (target site) az emlős testében az a terület, ahova a gyógyászati készítményt el kívánjuk juttatni. A cél-hely pl. egy tüdő-sejt, egy antigént adó sejt vagy limfocita lehet, melyet közvetlenül injekció vagy más átadási mód (pl. liposzómák vagy más szállító vivőanyag alkalmazásával) útján vesszünk célba. A szállító vivőanyagok példái a mesterséges és természetes lipid-tartalmú szubsztrátok. A természetes lipid-tartalmú szállító vivőanyagok példái a sejtek és sejt-membránok. A mesterséges lipid-tartalmú szállító vivőanyagok a liposzómák és a micellák. Valamely jelen találmány szerinti szállító vivőanyag módosításával elérhetjük, hogy az az emlősben egy adott helyet vegyen célba, s ezáltal a nukleinsav molekulát erre a helyre juttassa és itt tegye felhasználhatóvá. Az erre alkalmas módosítások pl. a szállító vivőanyag lipid-részének kémia összetételét érintő változtatások és/vagy a vivőanyagba egy olyan vegyület bejuttatása, mely képes arra, hogy a szállító vivőanyagokat specifikusan az előnyös cél-helyre, pl. az előnyös sejt-típusba juttassa. A specifikus célba juttatás azt jelenti, hogy előidézzük, hogy a szállító vivőanyag egy adott sejthez kötődjön a vivőanyagban lévő vegyület és egy, a sejt felületén elhelyezkedő molekula közötti kölcsönhatás folytán. Alkalmas célba juttató vegyületek azok a ligandok, amelyek szelektíven (vagyis specifikusan) tudnak egy adott helyen lévő másik molekulához kötődni. Az ilyen ligandok példái az antitestek, antigének, receptorok és receptor ligandok. Pl. ha tüdősejt felületén talál-

ható antigénre specifikus antitestet egy liposzóma szállító vivőanyag külső felületére juttatunk, az a szállító vivőanyagot a tüdősejthez fogja eljuttatni. Ha a szállító vivőanyag lipid-részének kémiai összetételét manipuláljuk, ez megváltoztatja a szállító vivőanyag extracelluláris vagy intracelluláris cél-választását. Pl. a liposzóma lipid-részéhez olyan vegyi anyagot adhatunk, amely a liposzóma lipid kettősrétegének (bilayer) töltését úgy változtatja meg, hogy a liposzóma csak egy adott töltési jellemzőkkel rendelkező sejtekkel fuzionál.

A jelen találmány értelmében az előnyös szállító vivőanyag valamely liposzóma. Egy liposzóma kellő hosszúságú ideig stabil marad az emlős szervezetében ahhoz, hogy a jelen találmány szerinti nukleinsav molekulát az emlős szervezetének előnyös helyére szállítsa. A jelen találmány szerinti liposzóma az emlősben a beadást követően előnyösen legalább kb. 30 percig, előnyösebben legalább kb. 11 óráig, és még előnyösebben legalább kb. 24 órán át stabil.

A jelen találmány szerinti liposzóma olyan lipid-összetételt tartalmaz, mely képes a jelen találmány szerinti nukleinsav molekulát az emlős szervezetében egy adott, vagy választott helyre eljuttatni. A liposzómában lévő lipid-összetétel képes az emlős bármely szervéhez, előnyösen a tüdejéhez, lépéhez, nyirokcsomóihoz és bőréhez, még előnyösebben az emlős tüdejéhez eljuttatni az anyagot.

A jelen találmány szerinti liposzóma lipid-összetétele olyan, hogy a cél-sejt plazmamembránjával fuzionálni tud, hogy a nukleinsav molekulát a sejtbe juttathassa. A jelen találmány szerinti liposzóma transzfekciós hatékonysága előnyösen kb. 0,5 µg DNS per 16 nanomol (nmol) liposzóma kb. 10^6 sejthez eljuttatva; előnyösebben 10 µg DNS per 16 nanomol (nmol) liposzóma kb. 10^6 sejthez eljuttatva; és még előnyösebben 2,0 µg DNS per 16 nanomol (nmol) liposzóma kb.



10^6 sejthez eljuttatva. A találmány szerinti előnyös liposzóma átmérője kb. 100 és 500 nm közötti, előnyösebb esetben kb. 150 és 450 nm közötti és még előnyösebb esetben kb. 200 és 400 nm közötti.

A jelen találmányban történő alkalmazásra bármely liposzóma megfelel. A jelen találmány szerint előnyösen azok a liposzómák alkalmazhatók, melyek a szakember számára ismert gén-szállítási eljárásokban standard módon használatosak. Előnyösebb azoknak a liposzómáknak az alkalmazása, amelyek polikationos lipid-összetétellel rendelkeznek és/vagy azok a liposzómák, melyek koleszterin váza polietilén-glikolhoz kapcsolódik.

A liposzóma és a találmány szerinti nukleinsav molekula között a komplex kapcsolatot a szakirodalomból ismert standard módszerekkel, pl. a 2. példában leírt módszerekkel, hozhatjuk létre. A jelen találmány szerinti nukleinsav molekulát alkalmas koncentrációban adjuk a liposzómához, mely koncentrációban a sejthez szállított nukleinsav molekula mennyiség elegendő ahhoz, hogy a sejt elegendő szuperantigént és/vagy citokin proteint termeljen az effektor sejt immunításának kívánt módon végbemenő szabályozásához. A találmány szerinti nukleinsav molekulából előnyösen kb. 01, μg - kb. 10 μg -ot kombinálunk kb. 8 nmol liposzómával, előnyösebben 05, μg - kb. 5 μg -ot kombinálunk kb. 8 nmol liposzómával, és még előnyösebben kb. 1 μg nukleinsav molekulát kombinálunk kb. 8 nmol liposzómával.

Egy másik előnyös szállító vivőanyag valamely rekombináns vírusrészecske vakcina. A jelen találmányban alkalmazható rekombináns vírusrészecske vakcina a jelen találmányban alkalmazható rekombináns nukleinsav molekulát olyan virális bevonatba csomagoltan tartalmazza, mely lehetővé teszi, hogy a DNS be-

hatoljon a sejtbe és ott expresszálódjon. Különbféle rekombináns vírusrészecskéket, így pl. alfavírus, poxvírus, adenovírus, arenavírus, herpeszvírus és retrovírus alapú részecskéket alkalmazhatunk.

A találmányt a következő példákkal szemléltetjük, anélkül hogy igényünket a példákra korlátoznánk.

1. Példa

A következő példa azt szemlélteti, hogy egér-modellen, melyen alumínium-hidroxidban beadott ovalbuminnal végzett rövid ideig tartó szenzitizálást követően légúti túlérzékenységi válaszreakció alakult ki, a mycobacterium eredetű hősokk-fehérje-65 (HSP) fokozta a T-sejt proliferációval járó reakciót.

A betegség állatokon nehezen modellezhető, akár egy hipotézis bizonyíttóságát, akár humán kísérletek elkezdésének megalapozottságát kívánjuk eldönteni. Az egerekben sok olyan fehérje van, mely több mint 90%-os homológiát mutat a megfelelő humán proteinekkel. A következő kísérleteket a jelen bejelentés feltalálói antigénnel mozgósított immunrendszerű rágcsálón folytatták le, melyet immun (IgE) válasz, Th2-típusú válaszreakciótól való függés és eozinofil reakció jellemez. A modellre a kifejezett és fokozódó jellegű légúti túlérzékenységi válaszreakció a jellemző.

Azzal, hogy krónikus aeroantigén behatásra ilyen sok szempontnak megfelelő rágcsáló-szervezet jött létre, mely kapcsolatba hozható a kifejlődött eozinofiliával és a kifejezett, makacs és progrediáló légúti túlérzékenységi válaszreakcióval, páratlan lehetőség adódott, hogy potenciális gyógyászati készítményeket a légzőszervi gyulladás és/vagy az eozinofiliával és Th2-típusú immunválasszal összefüggő gyulladás megelőzésére vagy kezelésére való alkalmasság szempontjából megvizsgáljunk. Az itt leírt egér-modellre a szignifikáns mértékű

eozinofília és az ezt követően kifejlődő légúti fibrózis és kollagén lerakódás a jellemző. A jelen bejelentés feltalálói ezt az egér-modellt alkalmazták annak kimutatására, hogy a mycobacterium-eredetű hősokk-fehérje-65 (HSP-65) a szenzitizált egérben megszünteti a légúti túlérzékenységi reakciót és az eozinofiliát.

8-10 hetes nőstény BALB/c egereket (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) patogén-mentes környezetben ovalbumin (OA)-mentes diétán tartottunk. A következő példákban leírt kísérleteket kor és nem szerint szétválogatott 8-12 hetes egerek csoportjain végeztük.

Azt, hogy a mycobacterium eredetű HSP-65 elősegíti-e az antigén szenzitizációra adott immunválaszt, a mycobacterium eredetű HSP-65-nek ovalbuminnal szenzitizált egerek T-sejtes válaszreakcióira gyakorolt hatása alapján vizsgáltuk in vitro.

Ebben a kísérletben az egereknek 20 µg ovalbumint (OA; V. minőségi fokozat, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) és 20 mg alumínium-hidroxidot (injekciós minőségű Alum; Pierce, Rockford, IL) tartalmazó 100 µl PBS-t (foszfáttal pufferolt sóoldat), vagy önmagában PBS-t adtunk be intraperitoneális (ip) injekcióban. Rögtön az OA injekció beadása után az egerek vagy 100 µg *M. leprae* hősokk-fehérje-65-öt (mycobacterium eredetű HSP-65) tartalmazó 100 µl PBS-t (melyet Dr. Kathleen Lukacs adott, National Heart & Lung Institute, London), vagy önmagában PBS-t kaptak intervénáson (i.v.). 7 nappal később az egereket megöltük, lépüket eltávolítottuk és steril PBS-be tettük. A lépből egyes (single) sejteket tartalmazó szuszpenziót készítettünk és az egymagú sejteket sűrűséggradiens-centrifugálással tisztítottuk. A sejteket 2×10^6 /ml koncentráció-

ban 96 lyukú lemezen (melynek mélyedései alul lekerekítettek) háromszoros parallelben vagy csak táptalajjal [táptalaj összetétel: hővel inaktivált borjúembrió szérumot tartalmazó RPMI 1640 (10%); L-glutamin (2 mM); 2 merkapto-etanol (5 mM); HEPES puffer (15 mM); penicillin (100 E/ml); és sztreptomycin (100 µg/ml); minden komponens a GIBCO/BRL-től származik], vagy 100 µg/ml ovalbuminnal, vagy forbol-12,13-dibutirát (10 nM) és ionomicin (0,5 µM) kombinációjával (PI) 48 órán át inkubáljuk. A sejtproliferáció mértékét a sejtek ³H-timidin felvételének mérésével valószínűsítjük. A sejtmentes felülúszót elkülönítjük és a citokin ELISA-teszt lefolytatásig -20°C hőmérsékleten tartjuk.

Az egymagvú sejtek felülúszójában a sejtek által kiválasztott citokinek szintjét ELISA-teszttel határozzuk meg. Röviden: 96-lyukú lemezeket (Immulon) primer anti-citokin kötő antitesttel (1 µg/ml) vonunk be és egy éjszakán át 4°C-on tartjuk. A tisztított patkány anti-egér IL-4, IL-5, és IFN-γ a Pharmingentől (San Diego, CA) származott. A lemezeket háromszor PBS/Tween 20 (Fisher) eleggyel mossuk és egy éjszakán át PBS/10% FCS eleggyel blokkoljuk. Mosást követően a lemez mélyedésekbe 100 µl, a sejtenyészet felülúszóból nyert mintát teszünk. Sorozat-hígítással (hígítási faktor: 0,33) standard mintákat készítünk. A lemezeket egy éjszakán át 4°C-on inkubáljuk, ezután mossuk és biotinnal konjugált anti-citokin antitesteket adunk 1 µg/ml koncentrációban a lemezmélyedésekhez. A lemezeket egy éjszakán át inkubáljuk, ezután 6 X mossuk, majd avidin-peroxidáz komplexet (Sigma, St. Louis, MO) és szubsztrátot adunk hozzá és a lemezeket szobahőmérsékleten inkubáljuk. A kialakult zöld színt 410 nm-nél spektrofotometráljuk (Biorad 2550, Japán). A citokin mennyiségét minden lemezen standard görbe alapján számoljuk ki. A kimutathatósági határ IL-4, és IL-5

esetében 5 pg/ml, IFN γ esetében 3 pg/ml. Standardként rekombináns egér IL-4-et (Pharmingen), IL-5-öt (Pharmingen) és rekombináns patkány IFN γ -t (Genetech, San Francisco, CA) alkalmaztunk.

Az antitest szintet a következőképpen határoztuk meg: ELISA lemezeket (Dynatech, Chantilly, VA) ovalbuminnal (20 μ g/ml; nátrium-hidrogén-karbonát puffer, pH 9) vagy poliklonális kecske anti-egér IgE-vel (3 μ g/ml; The Binding Site Ltd., San Diego, CA) vontunk be, és a lemezeket egy éjszakán át 4°C-on inkubáltuk. A lemezeket 0,2%-os zselatin pufferrel (pH 8,2) 2 órán át 37°C hőmérsékleten blokkoltuk. Az OA-specifikus IgE és IgG tartalmú standardok a feltalálók laboratóriumában, Oshiba és munkatársai által a J. Clin. Invest (97: 1398-1408, 1996) folyóiratban leírt módon készültek, a cikk tartalmát a jelen leírás részének tekintjük. Az ELISA-módszerrel kapott adatokat Microplate Manager Software program for the Macintosh (Biorad Labo, Richmond, VA) segítségével értékeltük.

A mellékelt ábrák mindegyikén az adatok átlagértéke $\pm$ SEM van feltüntetve. A csoportok közti szignifikáns variációt nem-paraméteres variancia analízissel (Kruskal-Wallis módszer) határoztuk meg. Ha szignifikáns variációt találtunk, akkor az egyes csoportok közti különbségeket Mann-Whitney U-teszt alkalmazásával elemeztük. Többszörös összehasonlítás esetén Bonferroni-féle korrekciót alkalmaztunk. A $p < 0,05$ értéket tekintettük szignifikánsnak. A változók közti korrelációt regressziós analízissel állapítottuk meg. Az adatokat MINITAB standard statisztikai csomag (Minitab Inc., State College, PA, USA) segítségével elemeztük.

Az 1. ábra azt mutatja, hogy a szenzitizált egerekben, mycobacterium eredetű HSP-65-tel történő immunizálás hatására a csak táptalajt vagy ovalbumint tartalmazó tenyészetekben a splenociták proliferációs válaszreakciója szignifikánsan fokozódott ($p < 0,05$; $n=6$). A mycobakteriális HSP-65-tel kezelt egerek esetében mind a nem specifikus, mind az ovalbumin-specifikus válaszreakciók fokozódtak. A mycobakteriális HSP-65-tel kezelt egerektől származó táptalajok felülírásában az IL-4, IL-5 és IFN γ -szintek valamint az immunglobulin szintek is megemelkedtek, a PBS-sel kezelt egerekében viszont nem (ezt nem tüntettük fel). Összefoglalva: az adatok azt mutatják, hogy az ovalbuminos szenzitizálás után 7 nappal a mycobakteriális HSP-65-tel immunizált egerekben felerősödtek az ovalbumin-függő immunfolyamatok, a csak PBS-sel immunizáltakban viszont nem.

2. Példa

A következő példa azt mutatja, hogy allergiás szenzitizálásra alkalmas egér-modellen az aeroszol formájában beadott, szuboptimális szenzitizálásra alkalmas mennyiségű ovalbumin bejuttatását követően a mycobacterium-eredetű HSP-65 fokozta a T-sejtes proliferációval járó válaszreakciót.

Minthogy OA-val történő ip. szenzitizálást követően a mycobactériális HSP-65-tel immunizált egereken a T-sejtes válaszreakció felerősödött (1. példa), felmerül a kérdés, hogy a mycobakteriális HSP-65 olyan körülmények között is fokozza-e a válaszreakciót, amikor normális esetben nem mutatkozik antigén-specifikus T-sejtes válaszreakció (vagyis: ha az ovalbuminos szenzitizálás mértéke szuboptimális). Ezen túlmenően a következő kísérletet úgy terveztük meg,

hogy azt is tesztelhessük, hogy a rövid ideig tartó mycobacteriális HSP-65 kezelés hogyan befolyásolja a légúti reakciókat [a hörgő alveolusok öblítéskor (BAL; bronchial alveolar lavage) kapott minta sejt-összetétele, valamint metakolin hatására fellépő légúti reakciók].

Az egerek az 1., 2., 3., és 6. napon OA aeroszol (1%) kezelést és az 1. és 6. napon 100 µg mycobacteriális HSP-65-t vagy PBS-t kaptak i.v. (szuboptimális OA kezelés). Megjegyzendő, hogy az optimálisnak tekintett egér-modellre előírt kezelési utasítás mind az immunizáció, mind az antigén (OA) kezelésében megköveteli a válaszreakció észlelését. A 7. napon a metakolin (MCh) hatására bekövetkező légúti reakciókat mértük, a hörgő alveolusok öblítéskor (BAL) kapott mintákat sejt-tartalomra vizsgálatuk, a lépeket és a peribronchiális nyirokcsomókat (PBLN; peribronchial lymph nodes) eltávolítottuk és ezeket proliferációs reakció szempontjából tanulmányoztuk.

A bronchiális válasz mértékét a légutakon át beadott aeroszolos metakolin hatására a légúti funkcióban beállt változás alapján mérjük egy egerekre és patkányokra már leírt módszer egy módoszatával (lásd: Haczku és munkatársai, 1995, Immunology, 95: 598-603; és Martin és munkatársai: 1988, J. Appl. Physiol. 64: 2318-2323; mindkét publikáció teljes tartalmát a jelen leírás részének tekintjük). Röviden, az egereket intraperitoneális injekcióban beadott pentobarbitál-nátriummal (70-90 mg/kg) anesztetizáltuk, 18 G saválló acélcsövet használtunk légcső-kanülként, melyet egy lyukon át vezettünk be az egér elhelyezésére szolgáló plexiüveg kamrába. A légcsőbe jutott csövet 4-utas csővezetékekkel kötöttük össze, melynek két nyílását a ventillátor (683. modell, Harvard Apparatus, South Natick, MA) szívó oldalára, kettőt pedig a ventillátor fúvó oldalára kötöttük. 160 lélegzetvétel per perces légcsere mellett a légzési térfogat

0,15 ml, a kilégzés végpontján mért 2-4 vízoszlop cm-es pozitív nyomással. A plexiüveg-kamra 1 l-es, réz-szövedéssel töltött üvegpalackban folytatódott a térfogat-szignál stabilizálása céljából.

A transzpulmonális nyomást mint P_{AO} értéket mértük a pletizmográfon belüli nyomással összehasonlításban, melyhez differenciál nyomás-átalakítót (Validyne, MP-45-1-871 modell; Validyne Engineering Corp. Northridge, CA) használtunk. A tüdőterfogatban bekövetkezett változást mint a pletizmográfkamrában detektált nyomásban egy referencia dobozban fennálló nyomáshoz képest bekövetkezett változást mértük egy második differenciál nyomás-átalakító segítségével. A két nyomás-átalakítót és erősítőt elektronikusan szinkronba hoztuk, hogy a fáziseltolódás 1 és 30 Hz között 5° -nál kisebb legyen, majd az analóg jelet digitális jellé alakítottuk 16 bites analóg-digitális jelátalakítóval (a National Instruments Corp. NB-MIO-16x18 modellje; Austin, TX) 600 bit/sec/csatorna sebességgel. A digitalizált jeleket Macintosh Quadra 800 számítógépbe tápláltuk (Apple Computer Inc. M1206 modellje; Cupertino, CA) és az adatokat LabVIEW számítógépes program (National Instruments Corp., Austin, Texas) alkalmazásával analizáltuk. Az áramlás mértékét a térfogat szignál differenciálásával határoztuk meg; a teljesítőképességet a térfogatváltozás per nyomásváltozás hányadosból számoltuk a belégzési fázis és kilégzési fázis zero áramlási pontján. Az átlagos teljesítőképességet mint a belégzési és kilégzési teljesítőképesség számtani középértékét számoltuk ki minden egyes lélegzetvételnél. A LabVIEW számítógépes program a nyomás, áramlás, térfogat és átlagos teljesítőképesség adatok felhasználásával folyamatosan kiszámolta a tüdőellenállás (R_L) és dinamikus teljesítőképesség (C_{dyn}) értékét Amdur és munkatársai módszerével [Am. J. Physiol., 12, 364-368, (1958)]. A lélegzetvételen-

ként kapott R_L , teljesítőképesség, vezetőképesség és specifikus teljesítőképesség eredményeket rendeztük és a maximális válaszreakciónak megfelelő, legalább 10-20 lélegzetvétel átlagát minden dózis esetében kiszámoltuk és ezeket az értékeket adtuk meg. Megjegyzendő, hogy az egéren mért R_L érték ugyanúgy felhasználható a levegő-beáramlás korlátozottságának diagnosztizálására, mint a FEV_1 és/vagy FEV_1/FVC arány az ember esetében.

Az aeroszol formára hozott bronchokonstriktív szereket Bypass-csővön keresztül ultrahangos porlasztó segítségével adtuk be; a porlasztó a ventillátor kifúvó nyílása és a 4-utas csatlakozócső közé van beszerelve. Az aeroszolt 10 másodpercig 0,5 ml-es légzéstérfogattal adjuk be. Egy inhaláltatott PBS-dózis beadása után kapott R_L értékeket tekintjük alapvonal-értéknek. 3 perccel a sóoldat beadása után kezdjük a metakolin növekvő koncentrációinak inhaláltatását (10 lélegzet vétel) 0,4 mg/ml induló koncentrációval. A növekvő koncentrációkat 5-7 perces szünetek közbeiktatásával adjuk. A belégzési térfogat kétszeresének megfelelő hiperbefúvást alkalmazunk az egyes metakolin koncentrációk között, melyet úgy végzünk, hogy a ventillátor kifúvó nyílását manuálisan lezárjuk, hogy a tüdő esetleges tökéletlen feltöltődése ne forduljon elő és hogy a provokáló ágens használata előtt konstans térfogatot tartsunk fenn. Az aeroszolos provokációt követő 20 sec és 3 perc közti időben az R_L és C_{dyn} adatokat folyamatosan gyűjtjük és a maximális R_L és C_{dyn} értékekkel fejezzük ki az egér légúti funkciójában beállt változásokat.

A tüdőfunkció paramétereinek megmérése után 0,9%-os (súly/térfogat%) steril nátrium-klorid 1 ml-es részleteivel szobahőmérsékleten a tüdőt átöblítjük a légcső-kanülhöz csatlakoztatott polietilén fecskendőn keresztül. Az öblítő folyadékot centrifugáljuk (500 X g, 10 percig, 4°C-on) és a sejtpelletet 0,5 ml RPMI sző-

vet-tenyésztő táptalajban újra szuszpendáljuk. Minden egyes BAL mintából kapott sejtmentes felülúszót -20°C -on tartunk a citokinin elemzéséig (ELISA-teszt; az 1. példában leírt módon).

A PBLN és Splenocita proliferációs vizsgálatot az 1. példában leírt módon végezzük. A 2. ábrán látható, hogy a Mycobacterium eredetű HSP-65 még szuboptimális ovalbuminos szenzitizálást követően is szignifikáns mértékben fokozza a T-sejtes proliferációs válaszreakciót mind a splenocitákban (2A ábra), mind a peribronchiális nyirokcsomó (PBLN) sejtekben (2B. ábra) és különösen a PBLN helyi megcsapolásával kapott szövetekből származó sejtekben ($p < 0,05$; ANOVA). A BAL-ban nem mutatkozott celluláris változás, noha metakolin beadás után nőtt a tüdőellenállás (R_L) a Mycobacterium eredetű HSP-65-tel kezelt csoportban (nincs feltüntetve).

Ezek az adatok azt mutatják, hogy a mycobacteriális HSP-65 még az optimálisnál kisebb mértékű ovalbuminos szenzitizálás után is fokozza az antigén-specifikus immunválaszokat. Ezenkívül a Mycobacteriális HSP-65 a metakolinnal kiváltott légúti reakciót is befolyásolja, ha 24 órával a tüdőfunkció méréseket megelőzően adjuk be.

3. Példa

Ez a példa azt szemlélteti, hogy a légúti túlérzékenységi válaszreakció tesztelésére alkalmas egér-modellen alumínium-hidroxidos ovalbuminnal végzett optimális szenzitizálást és provokációt követően a Mycobacterium eredetű HSP-65 fokozza a T-sejtes proliferációs válaszreakciót.

A légúti túlérzékenységi válaszreakció tesztelésére és az allergiás szenzitizálásra itt alkalmazott egér-modellen bizonyítást nyert, hogy a szisztémás

szenzitizálás és a helyi légúti provokáció a légutak eozinofiliás gyulladásával összefüggő légúti túlérzékenységi válaszreakciót (AHR) eredményez, melyek a humán asztma kardinális velejárói (lásd pl. Bentley és munkatársai, 1992, Am. Rev. Respir. Dis. 146: 500-506; Houston és munkatársai, 1953, Thorax 8: 207-213; vagy Dunhill, 1960. J. Clin. Pathol. 13: 27-33; ezeknek a publikációknak a tartalmát a jelen leírás részének tekintjük). A Mycobacterium eredetű HSP-65 kezelésnek a patológiás légúti elváltozásokra kifejtett hatását a következőképpen vizsgáltuk: az egereket 100 µl PBS-ben (foszfáttal pufferolt sóoldat) i.p. beadott 20 µg ovalbumin (V. minőségű, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) és 20 mg alumínium-hidroxid (Inject Alum; Pierce. Rockford, IL) keverékével, vagy önmagában PBS-sel szenzitizáltuk az 1. és 14. napon. Az egerek ezután a 24., 25. és 26. napon 20 percen át 1%-os OA/PBS oldattal aeroszolos kezelést kaptak. Az egereket 48 óra elteltével megöltük és elvégeztük a vizsgálatokat; erre az időpontra valószínűsítettük az eozinofiliás beszűrődés és légúti válaszreakció maximumát. Az OA-val szenzitizált és provokált egerekből származó egymagvú lépsejtek tisztítását, tenyésztését és az OA hatására jelentkező proliferációs válaszreakciót az 1. példában leírt módon végeztük/vizsgáltuk. A 3. ábrán látható, hogy az OA-val szenzitizált és provokált egerek (melyeket csak PBS-sel immunizáltunk) egymagvú sejtjei szignifikáns proliferációval reagáltak az OA-ra (lásd 3. ábra, PBS-csoport). Látható továbbá, hogy az OA-val szenzitizált és provokált, majd mycobacteriális HSP-65-tel kezelt egerek egymagvú sejtjeinek proliferációja szignifikánsan fokozódott mind az OA jelenlétében, mind anélkül, egyedül a táptalaj jelenlétében.



Ezek az eredmények azt jelzik, hogy a mycobacterialis HSP-65-tel kezelt egerek egymagvú sejtjei in vivo aktiválódnak, és in vitro mind antigén-specifikus, mind nem-specifikus proliferációs reakciót mutatnak.

4. Példa

A következő példa azt szemlélteti, hogy a mycobacteriális HSP-65 a Th1-típusú citokinek és antitest izotípusok termelődését fokozza, a Th2-típusú citokinek termelődését pedig csökkenti a légúti túlérzékenységi válaszreakció tesztelésére alkalmas egérben optimális szenzitizálást és provokációt (ovalbumin alumínium-hidroxidban) követően.

Az allergiás asztma magas IgE szintekkel, eozinofiliás légúti fertőzéssel és légúti túlérzékenységi válaszreakcióval jellemezhető. A T-sejtek kulcsfontosságú szerepet játszanak a betegségben, mert az antigén felismerése után nagy mennyiségben képesek a citokinek egy alcsoportjának, a szakirodalomban Th2-típusú citokineknek nevezett alcsoportnak a termelésére. A Th2 citokinek közül az IL-4 és IgE termelésének indukálásában játszik fontos szerepet, az IL-5 pedig alapvető fontosságú a szöveti eozinofilia kialakulásában. Míg a Th1-típusú citokinek termelődése a T-sejtes aktiváció normális velejárója, addig a Th2 citokinek szintetizálásához speciális feltételek teljesülése szükséges, melyeknek a jellege és lényege azonban ismeretlen. Anélkül, hogy valamely elmélethez kívánnánk kötni a találmányt, a jelen bejelentés feltalálói úgy vélik, hogy az allergiás gyulladás Th2 és Th1-típusú citokinek termelődési arányában beállt patológiás egyensúlyvesztére vezethető vissza; úgy vélik továbbá, hogy a közönséges környezeti antigénekkel szembeni ilyen reakciók valamely szabályozó mechanizmus elégtelen működésének tulajdoníthatók, mely mechanizmus normális körülmények között



az ilyen reakciókat elnyomná. A most leírt, a légúti túlérzékenységi reakció tanulmányozására leírt rágcsló modell ideálisnak bizonyult annak eldöntésére, hogy hősokk-fehérje beadásával modulálható-e az ebben a modellben észlelt dominánsan Th2-típusú immunválasz.

A 3. példában leírt, mycobacteriális HSP-65-tel és PBS-sel kezelt egérből származó egymagvú lépsejteket 48 órán át tenyésztjük. A tenyészet felülúszóját elkülönítjük és a citokin kibocsátást az 1. példában leírt ELISA-tesztel vizsgáljuk. A 4. ábrán látható, hogy a mycobacteriális HSP-65-tel kezelt egerekből származó splenociták szignifikánsan megnövekedett mennyiségben termelnek IFN γ -t (4A. ábra) forbol-észter/ionomicin (pi) kombinációval stimulált kultúrában (az ovalbuminnal stimulált tenyészetben viszont nem) a PSB-sel kezelt egerektől származó sejtekhez képest ($P < 0,05$; $n=6$). Ugyanakkor a mycobacteriális HSP-65-tel kezelt egerekből származó splenociták IL-4 (4B. ábra) és IL-5 (4C. ábra) termelése mind a Pi-kombinációival, mind az ovalbuminnal stimulált kultúrában csökkent a PBS-sel kezelt egerekéhez képest, mely arra utal, hogy a mycobacteriális HSP-65 tel történő kezelésnek moduláló hatása lehet a T-sejtes citokin termelésére in vitro.

Az immunglobulin termelés valószínűsítése céljából a 3. példában leírt módon kezelt egerekből egymagvú lépsejteket izoláltunk és a sejteket 14 napon át ovalbuminnak az 5. ábra X-tengelyén feltüntetett változó koncentráció jelenlétében tenyésztettük. A felülúszókat elkülönítettük és abban az OA-specifikus immunglobin kibocsátást az 1. példában leírt módon ELISA-tesztel vizsgáltuk. Az 5. ábrán látható, hogy a mycobacteriális HSP-65-tel kezelt egerekből származó sejtekben szignifikánsan fokozódott az OA-specifikus IgG2a termelődés (5A. áb-

ra) a PBS-sel kezelt egerekéhez képest ($p < 0,05$; $n=6$). Az OA-specifikus IgG1 (5B. ábra) és IgE (5C. ábra) in vitro termelődése a mycobacteriális HSP-65-tel kezelt egerekben enyhe csökkenést mutat a PBS-sel kezelt egerekhez képest, de ezek az eredmények nem meggyőzőek.

Ezek az eredmények azt mutatják, hogy egerek mycobacteriális HSP-65-tel történő immunizálása modulálja a T-sejtek és B-sejtek működését, és ezen túlmenően a mycobacteriális HSP-65 a gyulladásos válaszreakciót a Th2-től a Th1-típusú immunválasz irányába modulálhatja.

5. Példa

A következő példa azt szemlélteti, hogy a légúti túlérzékenységi reakció tesztelésére alkalmas egér modellen a mycobacteriális HSP-65 megszünteti az ovalbuminos szenzitizálással és provokációval kiváltott eozinofiliás légúti gyulladást.

A légutak allergiás szenzitizálása súlyos gyulladással jár, melyben az eozinofil sejtek jelenléte a domináns. A mycobacteriális HSP-65-nek az allergiás szenzitizálást követően kialakuló eozinofiliás légúti gyulladásra kifejtett hatását tisztázandó, a BAL celluláris összetételét határoztuk meg, minden egyes, a 3. példában leírt egér-csoportban. A bronchiális alveolusok mosását az utolsó OA aeroszolos provokáció után 48 órával végeztük a 2. példában leírt módon. A BAL sejteket RPMI tápoldatban újra szuszpendáltuk és hemocitometerrel megszámoltuk. A differenciál sejtszámokat eitospin preparátumok segítségével (Haczku és munkatársai a fentiekben megadott cikke alapján) határoztuk meg. A sejtek standard morfológiai besorolás alapján makrofágok, eozinofilek, neutrofilek és limfociták voltak és 400 x-os nagyításban legalább 300 sejtet számoltunk meg. A

%-os megoszlást és az egyes sejttípusba tartozó sejtek abszolút számát ezután kiszámoltuk.

A 6. ábrán látható, hogy az ovalbuminnal szenzitizált és provokált, majd PBS-sel kezelt egerekben (normál kontroll a légúti túlérzékenységi reakció vizsgálatnál) szignifikáns légúti gyulladás fejlődött ki (fekete sávok; $n=8$). A BAL-ban lévő összes sejteknek közelítőleg 60%-a eozinofil, de a neutrofilek száma is szignifikánsan megnőtt. A kezeletlen egerek esetében (fehér sávok; $n=8$), melyek 3 napos aeroszolos OA kezelést kaptak, a BAL-minták nem tartalmaztak eozinofil sejteket. Meglepő módon a mycobacteriális HSP-65-tel kezelt állatokban nem mutattunk ki eozinofiliát (sraffozott sávok; $n=8$) és sejt megoszlásuk lényegében azonos volt a kontroll, kezeletlen egerekével. A PBS-sel kezelt és a HPS-65-tel kezelt állatok BAL-sejt összetétele közötti különbség mind az eozinofilek számát ($p < 0,001$), mind a neutrofilek számát illetően ($p < 0,001$) szignifikáns.

Az eredmények azt mutatják, hogy a mycobacteriális HSP-65 megszünteti az ovalbuminos szenzitizálást és provokációt követően kialakult eozinofiles légúti gyulladást.

6. Példa

A következő példa azt szemlélteti, hogy a mycobakteriális HSP-65 a légúti túlérzékenység tesztelésére alkalmas egér modellen az ovalbuminos szenzitizálással és provokációval, majd metakolinos kezeléssel kiváltott légúti túlérzékenységi válaszreakciót megszünteti.

Ebben a kísérletben a bronchiális válaszreakciót a légutakon át bevitt aeroszolos metakolinnal provokált légúti funkció-változás mértékével becsültük meg. Az egereket a 3. példában leírt módon mycobacteriális HSP-65-tel vagy PBS-sel



kezeltük, az utolsó antigénes kezelés után 48 órával elaltattuk és a 2. példában leírt kanülös és ventilátoros elrendezéssel végeztük a kísérletet. A nem kezelt egerek a mérések elvégzése előtt 48 órával 3 napig sprayt kaptak. Ezután szintén a 2. példában leírt módon mértük a transzpumonális nyomást, a tüdőterfogatot és a beáramlási adatokat, a tüdőellenállást (R_L) pedig számítógéppel folyamatosan kiszámoltuk.

A 7. ábrán látható, hogy az ovalbuminnal szenzitizált és provokált majd PBS-sel i.p. kezelt egerekben (normál kontroll légúti túlérzékenységi válaszreakció mérésénél) a metakolinos provokáció válaszreakciójaként a tüdőellenállás (R_L) szignifikánsan megnőtt (háromszögek) a kezeletlen egerekéhez (körök) képest. Az ovalbuminnal szenzitizált és provokált, majd mycobacteriális HSP-65-tel kezelt egerek normális metakolin válaszreakciót adtak (négyyszögek), mely majdnem azonos a kezeletlen egerekével, és szignifikánsan kisebb ($P < 0,001$), mint a PBS-sel kezelt egerek reakciója, mely azt jelzi, hogy a mycobacteriális HSP-65-tel végzett kezelés OA-val szenzitizált és provokált egerekben megszünteti a légúti túlérzékenységi reakciót.

Összefoglalva: A fent leírt kísérletek során szenzitizált és mycobacteriális HSP-65-tel kezelt egerekből származó egymagvú sejtek in vitro tenyészetben vizsgáltuk az ovalbumin-specifikus válaszreakciókat. Az in vivo légúti reakciót Metakolinos kezelést (MCh) követően kialakult tüdőellenállás alapján mértük. Ugyancsak vizsgáltuk a légúti gyulladást és a tüdőszövetekben fennálló eozinofiliát. A mycobacteriális HSP-65-tel kezelt egerekben az OA-specifikus T-sejtes proliferáció szignifikánsan fokozódott, és a lépsejt-tenyészetek felülúszóiban az $IFN\gamma$ és Ig2a szint szignifikánsan megemelkedett. Meglepő módon az OA-

val szenzitizált és provokált egerekben kialakult szignifikáns légúti eozinofília és fokozott mértékű metakolin válaszreakció azokban az egerekben megszűnt, amelyek in vivo mycobacteriális HSP-65-öt is kaptak.

Bár a jelen találmány többféle fogantatosítási módját írtuk le részletesen, nyilvánvaló, hogy a szakemberben további módok és adaptációk merülhetnek fel. Leszögezzük azonban, hogy az ilyen módok és adaptációk a jelen találmány oltalmi körébe tartoznak a következő igénypontok értelmében.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Hősokk-fehérjék alkalmazása olyan gyógyszerek gyártására, mely gyógyszerek valamely emlősnek gyulladásos válaszreakcióval összefüggésben jelentkező eozinofiliás megbetegedéstől való megvédésére szolgálnak.

2. Eljárás emlősnek gyulladásos válaszreakcióval összefüggő, eozinofiliával jellemezhető betegségtől való megvédésére, mely eljárásban az ilyen betegségben szenvedő emlősnek hősokk-fehérjét adunk be.

3. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás, vagy a 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a betegség fokozott mértékű interleukin-4 (IL-4), interleukin-5 (IL-5), interleukin-6 (IL-6), interleukin-9 (IL-9), interleukin-10 (IL-10), interleukin-13 (IL-13) vagy interleukin-15 (IL-15) termelődéssel függ össze.

4. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás, vagy a 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a kérdéses betegségek allergiás légúti megbetegedések, hiper-eozinofiliás szindróma, helmintikus parazitogén fertőzés, allergiás rhinitis, allergiás kötőhártya-gyulladás, dermatitis, ekcéma, kontakt dermatitis, és étel allergia.

5. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás, vagy a 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a kérdéses betegség valamely légzőszervi betegség, melyre az eozinofiliás légúti gyulladás és a légúti túlérzékenységi válaszreakció a jellemző.

6. Az 5. igénypont szerinti alkalmazás, vagy eljárás, azzal jellemezve, hogy a kérdéses betegség allergiás asztma, intrinzik asztma, allergiás bronchopulmonális aspergillosis, eozinofiliás tüdőgyulladás, allergiás bronchitis, bronchiectasia, foglalkozási asztma, reaktív légúti megbetegedési szindróma,

intersticiális tüdő megbetegedés, hipereozinofiliás szindróma vagy parazitogén tüdő megbetegedés.

7. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás vagy a 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a betegség egy allergénnel szembeni szenzitizáltsággal függ össze.

8. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás vagy a 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a betegség allergiás asztma.

9. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás vagy a 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a hősokk-fehérje a HSP-60 családba, a HSP-70 családba, a HSP-90 családba vagy a HSP-27 családba sorolható hősokk-protein.

10. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás vagy a 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a hősokk-fehérje a HSP-60 családba, a HSP-70 családba vagy a HSP-27 családba sorolható hősokk-protein.

11. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás vagy a 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a hősokk-fehérje a HSP-90 családba vagy a HSP-27 családba sorolható hősokk-protein.

12. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás vagy a 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a hősokk-fehérje bakteriális eredetű hősokk-fehérje vagy emlős-eredetű hősokk-fehérje.

13. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás vagy a 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a hősokk-fehérje mycobacterium-eredetű hősokk-protein.

14. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás vagy a 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a hősokk-fehérje mycobacterium-eredetű hősokk-protein-65 (HSP-65).

15. A 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a hősokk-fehérjét a következő beadási módok közül választott legalább egy beadási móddal adjuk be: orális, nazális, topikális, inhalációs, transzdermális, rektális és parenterális beadási mód.

16. A 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a hősokk-fehérjét inhalációs vagy nazális úton adjuk be.

17. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás vagy a 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a hősokk-fehérje csökkenti az emlős eozinofiliás betegségét.

18. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás vagy a 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a hősokk-fehérje az eozinofil vérsejtek számát kb. 0 és kb. 300 sejt/mm³ közötti értékre csökkenti az emlősben.

19. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás vagy a 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a hősokk-fehérje az eozinofil vérsejtek számát kb. 0 és kb. 100 sejt/mm³ közötti értékre csökkenti az emlősben.

20. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás vagy a 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a hősokk-fehérje az eozinofil vérsejtek számát az emlős össz fehérvérsejt számának kb. 0% és kb. 3%-a közötti %-os értékre csökkenti.

21. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás vagy a 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a hősokk-fehérje az emlős T-lifocitáit γ -interferon (IFN- γ) termelésre készíti.

22. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás vagy a 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a hősokk-fehérje az emlős T-limfocitáinak interleukin-4 (IL-4) és interleukin-5 (IL-5) termelését szuppresszálja.

23. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás vagy a 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a hősokk-fehérje csökkenti az emlős légúti metakolin válaszütemakcióját.

24. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás vagy a 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a hősokk-fehérje az emlősben a levegő-beáramlás korlátozottságát olyan mértékben csökkenti, hogy az emlős FEV₁/FVC értéke legalább 80%-os.

25. A 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a hősokk-fehérje az emlős PC₂₀ metakolin FEV₁ értékének olyan mértékű javulását eredményezi, hogy a hősokk-fehérje beadása előtt mért PC₂₀ metakolin FEV₁ érték, amikor az emlőst a metakolin első koncentrációjával provokáljuk, ugyanakkora, mint a hősokk-fehérje beadása után mért PC₂₀ metakolin FEV₁ érték, amikor az emlőst a metakolin első koncentrációjának a duplájával provokáljuk.

26. A 25. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy metakolin első koncentrációja kb. 0,01 mg/ml és kb. 8 mg/ml közötti.

27. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás vagy a 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a hősokk-fehérje az emlős FEV₁ értékét az emlős elvárható FEV₁ értékének kb. 5 - kb. 100%-ával javítja.

28. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás vagy a 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a hősokk-fehérje az emlősben a levegő-beáramlás korlátozottságát úgy javítja, hogy az emlős R_L értékét legalább kb. 20%-kal csökkenti.

29. A 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a hősokk-fehérjét kb. 0,1 µg/kg és kb. 10 mg/kg közötti mennyiségben adjuk be az emlős kg test-súlyára számítva.

30. A 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a hősokk-fehérjét kb. 1 $\mu\text{g/kg}$ és kb. 1 mg/kg közötti mennyiségben adjuk be az emlős kg testsúlyára számítva.

31. A 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy abban az esetben, ha a hősokk-fehérjét aeroszolban adjuk be, a beadott hősokk-fehérje mennyisége kb. 0,1 mg/kg és kb. 5 mg/kg közötti az emlős kg testsúlyára számítva.

32. A 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy abban az esetben, ha a hősokk-fehérjét parenterálisan adjuk be, a beadott hősokk-fehérje mennyisége kb. 0,1 $\mu\text{g/kg}$ és kb. 10 $\mu\text{g/kg}$ közötti az emlős kg testsúlyára számítva.

33. A 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a hősokk-fehérjét gyógyászatilag elfogadható excipientsben adjuk be.

34. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás vagy a 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a kérdéses emlős egy ember.

35. Készítmény emlősnek gyulladásos válaszreakcióval összefüggő, eozinofiliával jellemezhető betegség kialakulásától való megvédésére, mely készítmény hősokk-fehérjét és valamely gyulladásgátlót tartalmaz.

36. A 35. igénypont szerinti készítmény, melyben a gyulladásgátló valamely antigén, allergén, haptén, valamely gyulladás-keltő cikokin antagonistája, gyulladás-keltő citokinek receptor antagonistája, anti-CD23, anti-IgE, leukotrién szintézis inhibitorok, leukotrién receptor antagonisták, glükokortikoszteroidok, szteroidok kémiai származékai, anti-ciklooxygenáz hatású szerek, anti-kolinerg hatású anyagok, β -adrenerg agonisták, metil-xantinok, antihisztaminok, kromonok, zileuton, anti-CD4 reagensek, anti-IL-5 reagensek, felületaktív anyagok, anti-tromboxán

reagensek, anti-serotonin reagensek, ketotiphen, citoxin, ciklosporin, metotrexát, makrolid antibiotikumok, heparin, kis molekulatömegű heparin vagy ezek keverékei.

37. **A** 35. igénypont szerinti készítmény, mely gyógyászatilag elfogadható excipienst tartalmaz.

38. **A** 35. igénypont szerinti készítmény, mely gyógyászatilag elfogadható excipiensként biokompatibilis polimereket, más polimer mátrixokat, kapszulákat, mikrokapszulákat, bólusz preparátumokat, ozmotikus pumpákat, diffúziós eszközöket, liposzómákat, liposzférikus vagy transzdermális beviteli rendszereket tartalmaz.

39. **A** 35. igénypont szerinti készítmény, mely hősokk-fehérjeként a HSP-60 családba, a HSP-90 családba vagy a HSP-27 családba sorolható hősokk-fehérjét tartalmaz.

40. **A** 35. igénypont szerinti készítmény, mely hősokk-fehérjeként *Mycobacterium* eredetű hősokk-proteint tartalmaz.

41. **A** 35. igénypont szerinti készítmény, mely hősokk-fehérjeként *Mycobacterium* eredetű hősokk-fehérjre-65-öt (HSP-65) tartalmaz.

42. Hősokk-fehérjék alkalmazása olyan gyógyszerek előállítására, mely gyógyszerek valamely emlősnek gyulladásos válaszreakcióval összefüggésben jelentkező, légúti túlérzékenységi válaszreakcióval jellemezhető megbetegedéstől való megvédésére szolgálnak.

43. Eljárás emlősnek gyulladásos válaszreakcióval összefüggő, légúti túlérzékenységi válaszreakcióval jellemezhető betegségtől való megvédésére, mely eljárásban az ilyen betegségben szenvedő emlősnek hősokk-fehérjét adunk be.

44. Hősokk-fehérjék alkalmazása olyan gyógyszerek előállítására, mely gyógyszerek valamely emlősnek Th2-típusú immunválasszal jellemezhető gyulladásos betegségtől való megvédésére szolgálnak.

45. Eljárás emlősnek Th2-típusú immunválasszal jellemezhető betegségtől való megvédésre, mely eljárásban az ilyen betegségben szenvedő emlősnek hősokk-fehérjét adunk be.

46. Hősokk-fehérjét kódoló nukleinsav molekula alkalmazása valamely emlősnek eozinofiliával, légúti túlérzékenységi válaszreakcióval vagy Th-2-típusú immunválasszal jellemezhető betegségtől való megvédésére, mely jellemzők gyulladásos válaszreakcióval függenek össze.

47. Eljárás emlősnek a következő jellemzők valamelyikivel azonosítható betegségtől való megvédésére: eozinofília, légúti túlérzékenységi válaszreakció vagy Th2-típusú immunválasz, mely jellemzők gyulladásos válaszreakcióval függenek össze, mely eljárásban a ilyen betegségben szenvedő emlősnek hősokk-fehérjét kódoló nukleinsav molekulát adunk be.

48. A 46. igénypont szerinti alkalmazás vagy a 47. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a nukleinsav molekula operatív módon egy, a transzkripciót szabályozó szekvenciához van kapcsolva.

49. A 47. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a nukleinsav molekulát egy gyógyászatilag elfogadható excipienssel adjuk be, a következők közül választva: vizes fiziológiailag kiegyensúlyozott oldat, mesterséges lipid-tartalmú szubsztrát, természetes lipid-tartalmú szubsztrát, valamely olaj, észter, glikol, vírus, fém-részecske vagy kationos molekula.

50. A 47. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a gyógyászatilag elfogadható excipiens: liposzóma, micella, sejt vagy sejtmembrán.

51. A 47. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a nukleinsav molekulát a következő beadási módok valamelyikével adjuk be: intradermális injekció, intramuszkuláris injekció, intravénás injekció, szubkután injekció vagy ex vivo beadásmód.

52. Eljárás kezelés előírására gyulladásos válaszreakcióval járó betegségekkel összefüggő légúti túlérzékenységi reakció vagy levegő-beáramlás korlátozottsága esetére, melyre jellemző, hogy

(a) az emlősnek hősokk-fehérjét adunk be;

(b) mérjük az emlősben, hogyan változott a tüdőfunkció provokáló ágens hatására, hogy megállapítsuk, modulálja-e a hősokk-fehérje a légúti túlérzékenységi reakciót vagy a korlátozott levegő-beáramlást; és

(c) előírunk egy hősokk-fehérje beadási farmakológiai gyógymódot az emlősnek mely a mért tüdőfunkció változás alapján hatásosan csökkenti a gyulladást.

53. Az 52. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a betegségre a légúti eozinofília a jellemző.

54. Az 52. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a provokáló ágens közvetlen vagy közvetett inger.

55. Az 52. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a provokáló ágens valamely allergén, metakolin, hisztamin, leukotrién, sóoldat, hiperventilláció, edzés, kéndioxid, adenozin, propranolol, hideg levegő, antigén, brandikinin, acetil-kolin, prosztaglandin, ózon, környezeti légszennyezés vagy ezek keverékei.

56. Az 52. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a mérési lépésben a következő adatok valamelyikét mérjük: FEV_1 , FEV_1/FVC , PC_{20} metakolin FEV_1 , post-enhanced h (Penh), nyomás idő-index (APTI) vagy az áramlási csúcsérték.

(7. ábra)

A meghatalmazott


Somlai Mária
szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. & K. Nemzetközi
Szabadalmi Iroda tagja
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.
Telefon: 34-24-950, Fax: 34-24-323

21+ 7 add
28 add

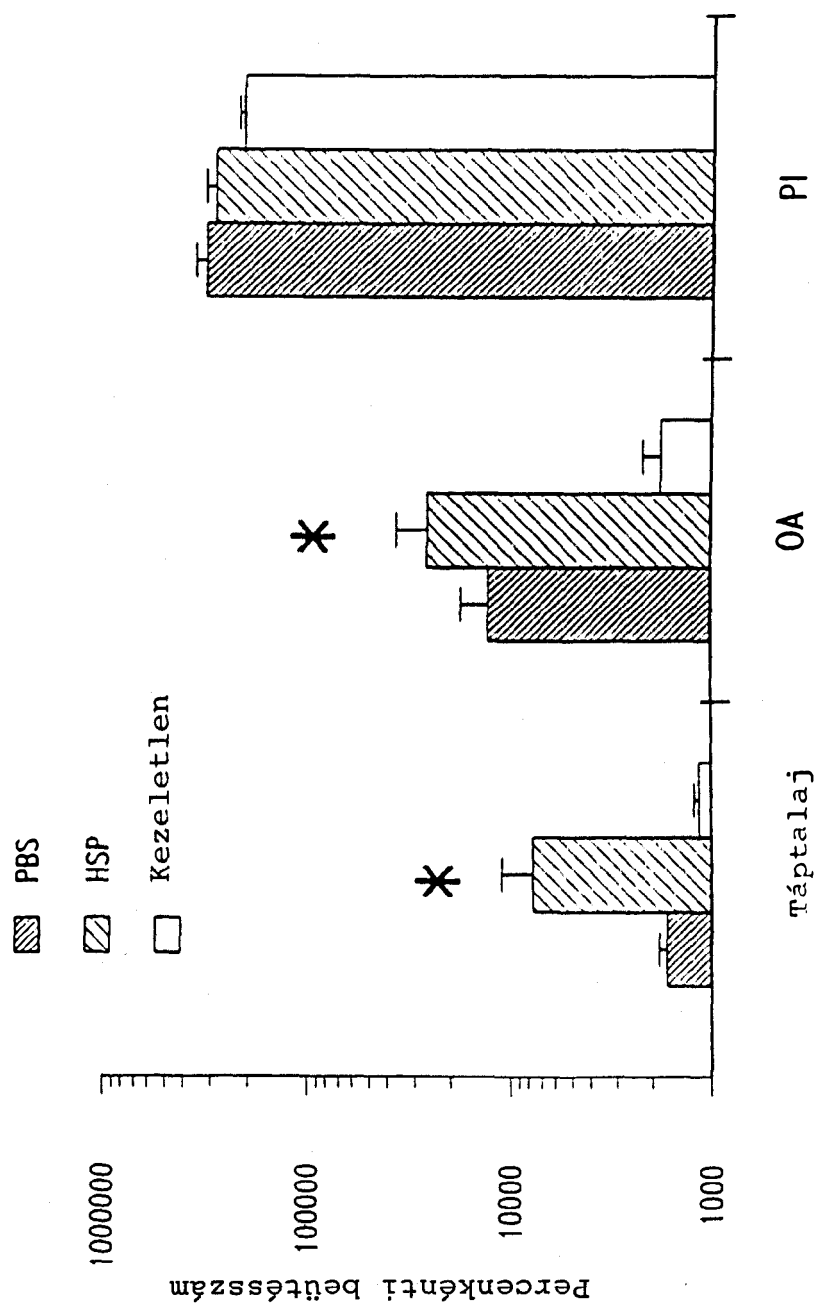
ak (T)

2001. 02. 26.

PO 1002-4

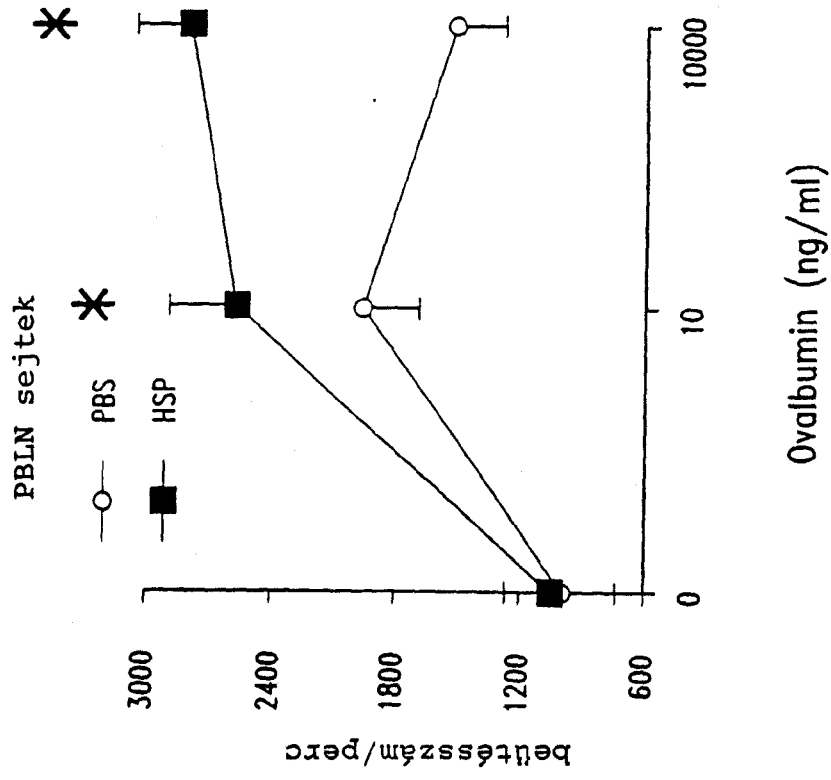
1/7

6739

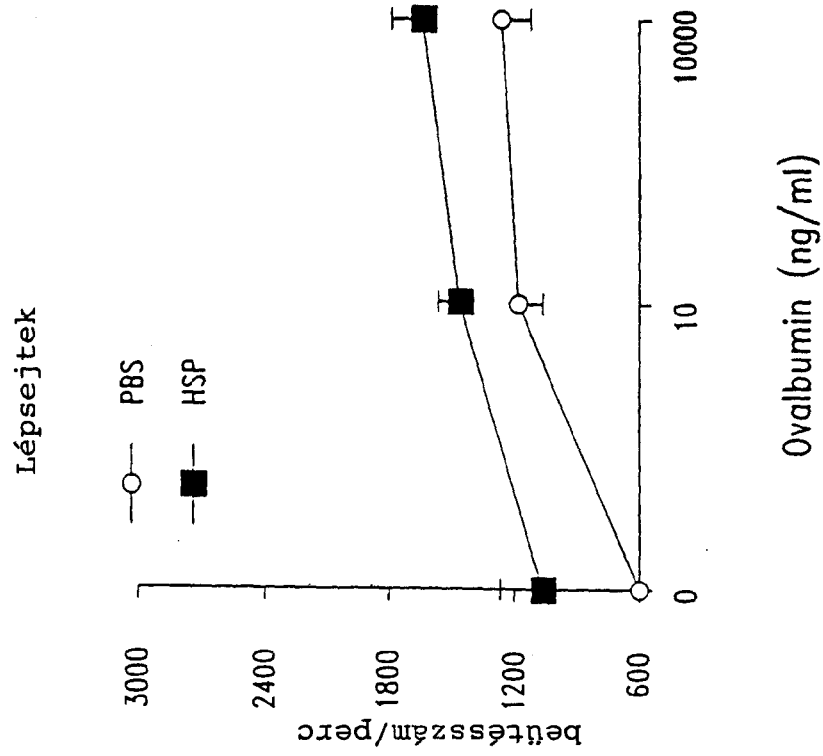


1. Ábra

2/7



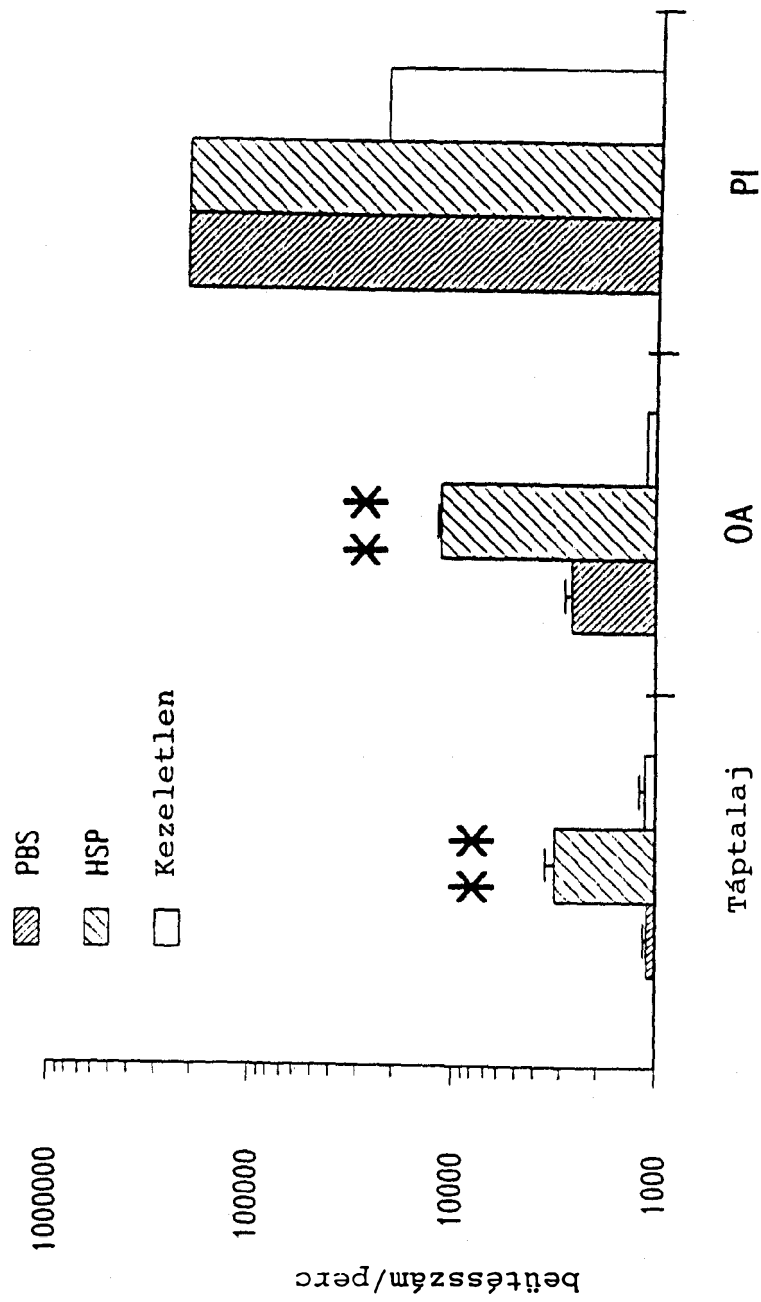
2B. Ábra



2A. Ábra

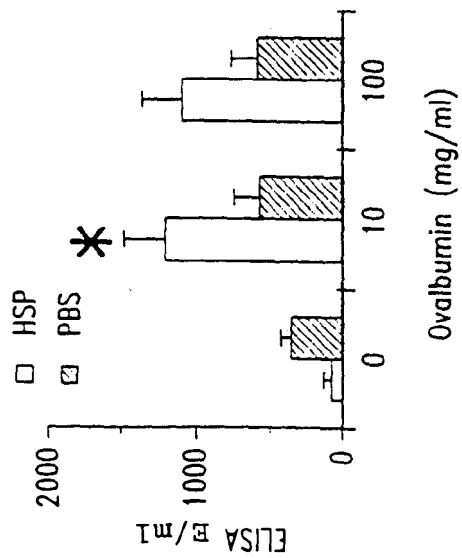
Ovalbumin (ng/ml)

Ovalbumin (ng/ml)



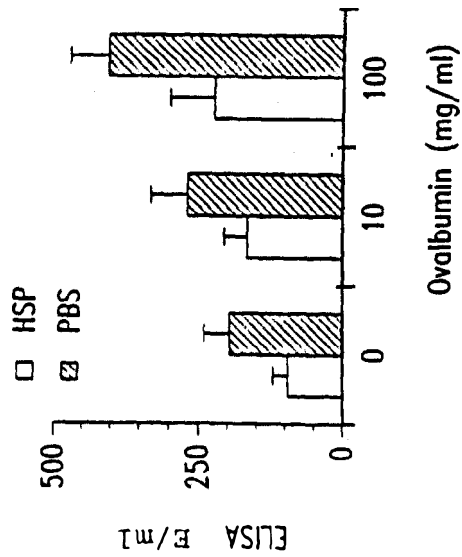
3. Ábra

IgG2a



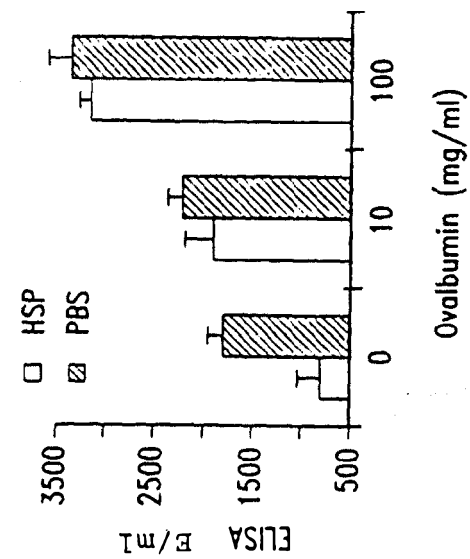
5A. Ábra

IgG1



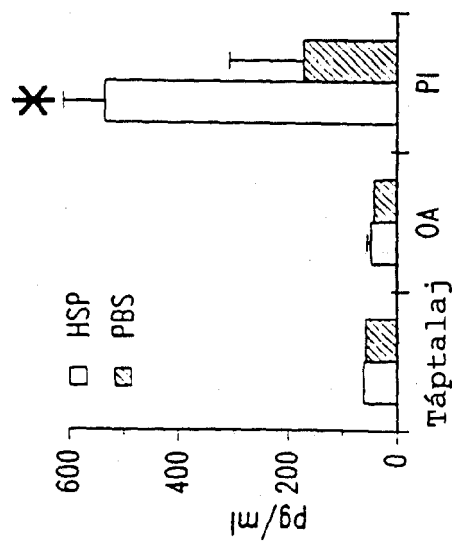
5B. Ábra

IgE



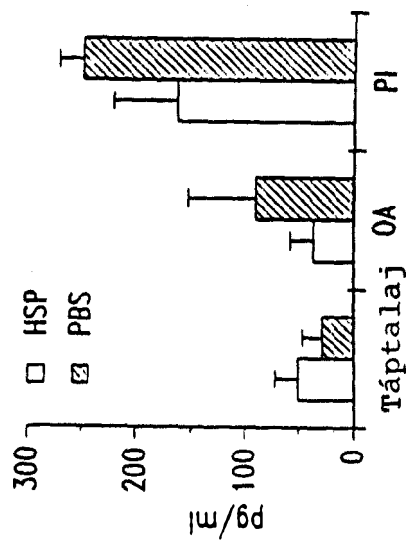
5C. Ábra

IFN- γ



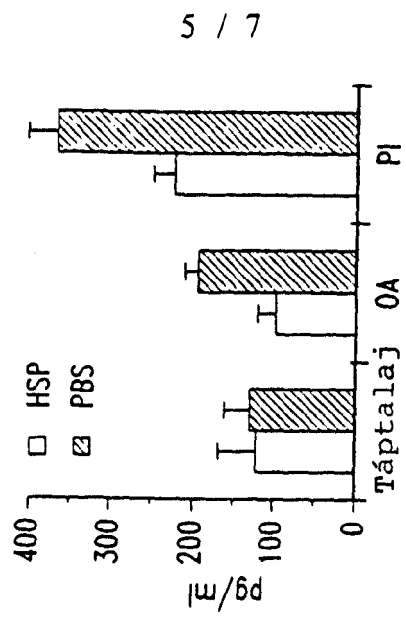
4A. Ábra

IL-4

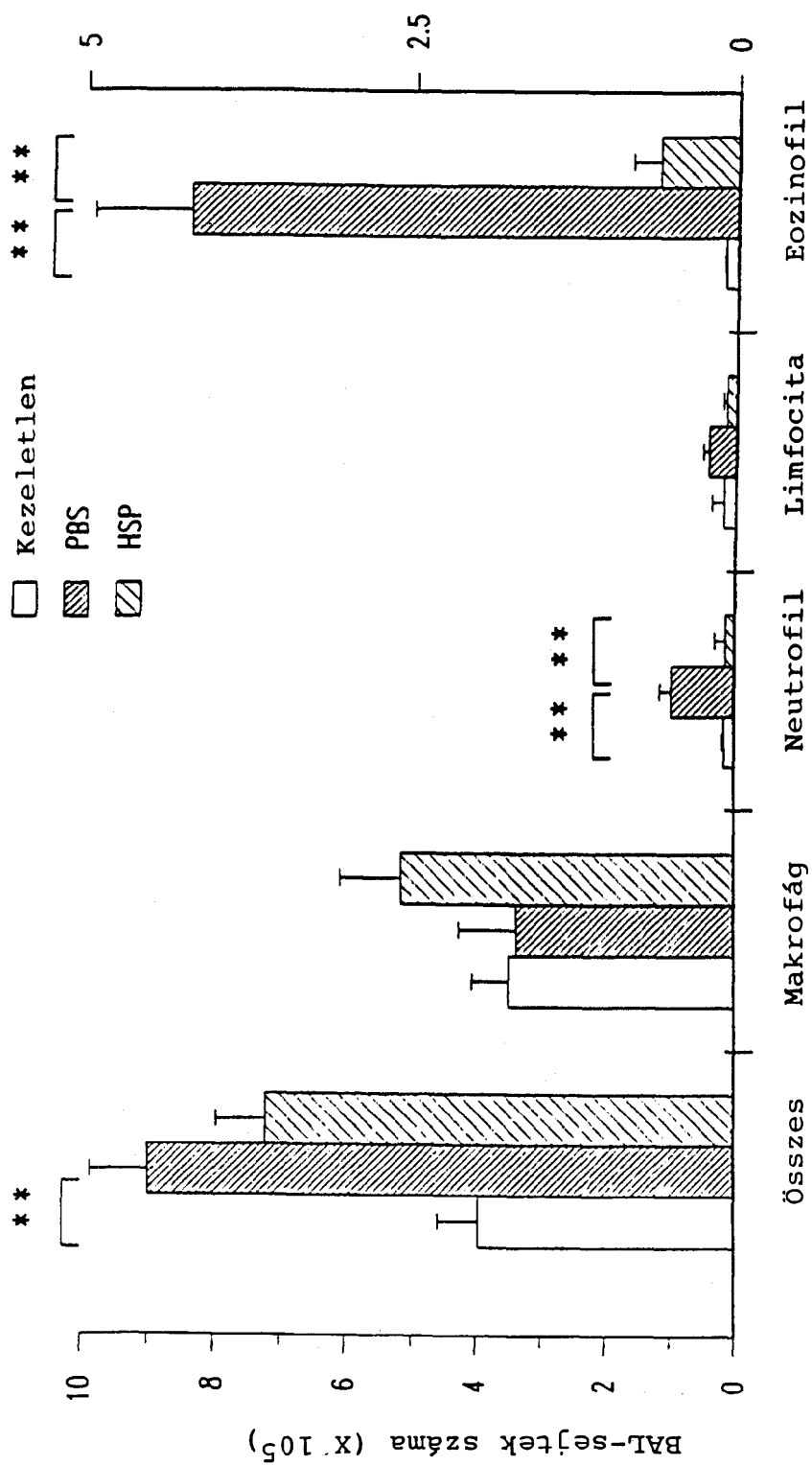


4B. Ábra

IL-5

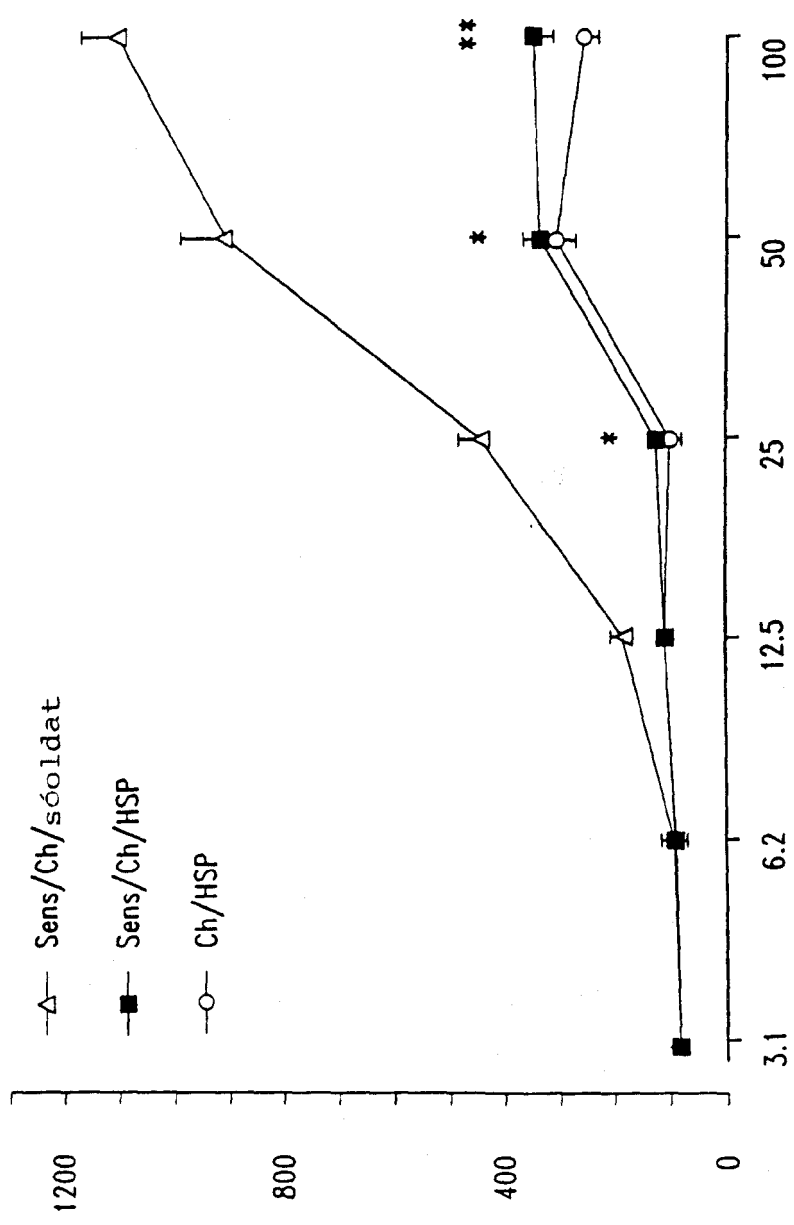


4C. Ábra



6. Ábra

R_L (%-os változás az alapvonal-értékhez képest)



MCh (mg/ml)

7. Ábra

Sens= szenzibilizált
Ch= challenged (provokált)