



H U 0 0 0 2 2 6 7 6 8 B 1

(19) **HU****MAGYAR KÖZTÁRSASÁG**
Magyar Szabadalmi Hivatal(11) Lajstromszám: **226 768**(13) **B1**

SZABADALMI LEÍRÁS

(21) A bejelentés ügyszáma: **P 00 00812**(22) A bejelentés napja: **1998. 04. 03.**(51) Int. Cl.: **C07K 14/47** (2006.01)**A61K 38/17** (2006.01)**A61P 25/00** (2006.01)(40) A közzététel napja: **2000. 09. 28.**(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlöny és Védjegyértéktobben: **2009. 09. 28.**

(86) A nemzetközi (PCT) bejelentési szám:

PCT/CA 98/00290(87) A nemzetközi közzétételi szám: **WO 9845327**

(30) Elsőbbségi adatok:

2,201,841 **1997. 04. 04.** **CA**

(72) Feltalálók:

Warren, Kenneth G., Edmonton, Alberta (CA);**Catz, Ingrid, Edmonton, Alberta (CA)**

(73) Jogosult:

The Governors of the University of Alberta,
Edmonton, Alberta (CA)

(74) Képvisező:

Somlai Mária, S. B. G. & K. Budapesti**Nemzetközi Szabadalmi Iroda, Budapest**

(54)

**Myelin bázikus fehérje peptidfragmentumai, az azokat tartalmazó
gyógyszerkészítmények és felhasználásuk a sclerosis multiplex kezelésére**

(57) Kivonat

A találmány tárgya az

Asp-Glu-Asn-Pro-Val-Val-His-Phe-Phe-Lys-Asn-Ile-
Val-Thr-Pro-Arg-Thr képletű peptid alkalmazása HLA-DR2 haplotípust hordozó páciensek esetében sclerosis
multiplex kezelésére szolgáló gyógyszerkészítmény
előállítására.**HU 226 768 B1**

A leírás terjedelme 38 oldal (ezen belül 20 lap ábra)

A találmány tárgya egy kiválasztott polipeptid felhasználása a myelin bázikus fehérje elleni antitestek immunregulációjában. A találmány tárgya közelebbről polipeptidként az MBP82–98 peptid alkalmazása a sclerosis multiplex kezelésére szolgáló gyógyszerkészítmény előállítására.

A sclerosis multiplex (MS) az emberi központi idegrendszer (CNS) gyulladásal járó multifokális demielinációs betegsége (a velőshüvely elvesztése az idegrendszer különböző helyein). Az MS jellemző tünete a vér-agy gáton (BBB) belül megnövekedett IgG-szintézis. Ennek leírása megtalálható az alábbi szakirodalmi helyen: Tourtelotte, W. W. [J Neurol Sci 10:279–304, (1970)]; Link, H. and Tibbling, G. [Scand J Clin Lab Invest 37:397–401 (1977)]; Tourtelotte, W. W. and Ma, B. [Neurology 28:76–83, (1978)]; Walsh, J. M. and Tourtelotte, W. W., In: Hallpike, J. F., Adams, C. W. M. and Tourtelotte, W. W., eds. [Multiple sclerosis. Baltimore. Williams & Wilkins, (1982) 275–358]; és Warren, K. G., and Catz, I. [Aim Neurol 17:475–480 (1985)].

Schumacher, G. A., Beebe, G., Kibler R. E., és munkatársai [Ann NY Acad Sci 15:266–272 (1965)] kimutatták, hogy klinikailag azonosított aktív vagy inaktív MS-pácienseknél a vér-agy gáton belül általában megnövekszik az IgG-szintézis. A CNS IgG nagy részének specifitása ismeretlen. Egy kis része vírusellenes aktivitást vagy agyi antigénnel, nukleinsavakkal, eritrocitákkal vagy simaizom-antigénnel szembeni reakciót mutat, és lehet, hogy a nem specifikus rész a B-sejtek poliklonális aktiválását reprezentálja [Tourtelotte, W. W., and Ma, B. [Neurology 28:76–83 (1978)]]. Az utóbbi tíz évben számottevő kutatások folytak a speciális myelinfehérjék elleni antitestekkel kapcsolatban.

Azt követően, hogy Dasgupta, M. K., Catz, I., Warren, K. G. és munkatársai [Can J Neurol Sci 10:239–243 (1983)] kimutatták a vérkeringésben jelen lévő, antigénkomponensként myelin bázikus fehérjét (MBP) tartalmazó immunkomplexeket, Warren, K. G. és Catz, I. [Ann Neurol 20:20–25 (1986)] megfigyelték, hogy az MS aktív formáit mutató pácienseknél az MBP elleni antitestek titer megnövekszik a gerincfolyadékban (cerebrospinal fluid, CSF). A sclerosis multiplexre klinikailag jellemzők a betegség aktív fázisai – például akut relapszusok (visszaesések) vagy krónikus progresszió – és a klinikai enyhülés fázisai. Az aktív MS az intratekálisan (gerincvelőburokban) termelt anti-MBP szintjének növekedésével jár [Warren, K. G. and Catz, I. [Ann Neurol 20:20–25, (1986)]; és Catz, I. and Warren, K. G. [Can J Neurol Sci 13:21–24 (1986)]]. Az akut visszaesések folyamán ezek az antitestek főleg szabad (F) formában, a betegség lappangó progressziója idején pedig túlnyomórészt kötött (B) formában fordulnak elő [Warren, K. G. és Catz, I. [Ann Neurol 20:20–25 (1986)]]. Az akut visszaesések folyamán a CSF anti-MBP titer összefüggésben áll a betegség aktivitásával [Warren, K. G. és Catz, I. [Ann Neurol 21:183–187 (1987)]]. Az anti-MBP-szintek a látóideggyulladás első rohamában szenvedő pácienseknél és az olyan páciensek többségében is magasak, akik az

MS első rohamán estek át [Warren, K. G., Catz, I., és Bauer, C. [Ann Neurol 23:297–299 (1988)]; valamint Warren, K. G. és Catz, I., [J Neurol Sci 91:143–151 (1989)].

Warren, K. G. és Catz, I. [J Neurol Sci 91:143–151 (1989)]; és [J Neurol Sci 88:185–194 (1988)] hosszú időn át végezték a CSF anti-MBP-szintek kinetikai vizsgálatát olyan betegeken, akik egy akut súlyosbodást követő enyhülési fázisba léptek be. A vizsgálatok az F anti-MBP titer fokozatos csökkenését és a B frakciók ezzel összemérhető fokozatos emelkedését mutatták. Az enyhülési fázisban az is előfordul, hogy a CSF anti-MBP kimutathatatlanul válik, ami arra utal, hogy az MS inaktív fázisaiban anti-MBP-neutralizáció (közömbösítés) megy végbe. Ezzel szemben a krónikus-progresszív MS-ben, amit az jellemez, hogy a megemelkedett anti-MBP-szint hosszú időn át fennmarad, az anti-MBP-neutralizáció gátolt [Warren, K. G. és Catz, I. [J Neurol Sci 88:185–194 (1988)]]. Warren, K. G. és Catz, I. [J Neurol Sci 96:19–27 (1990)] a közelmúltban egy myelin bázikus fehérje elleni antitest kaszkádát ismertetett, amelyet MS-páciensek gerincfolyadékából tisztítással kinyert IgG-frakcióban azonosítottak, és anti-MBP-t, az anti-MBP-t közömbösítő antitesteket és az anti-MBP neutralizációját gátló antitesteket tartalmaz.

Korábbi kutatásaink kimutatták, hogy a B-sejtes autoimmunitás szempontjából az MS-nek legalább két különböző formája van: a betegek többségében a myelin bázikus fehérje elleni autoantitestek (anti-MBP), egy kisebb részükben pedig proteolipid fehérje elleni autoantitestek (anti-PLP) találhatók [Warren, K. G. et al. [Ann, Neurol. 35, 280–289 (1994)]]. Az anti-MBP képződésével járó MS-ben az akut visszaesés idején a szabad (F) és kötött (B) anti-MBP aránya magas (1-nél nagyobb), míg a krónikus progresszió fázisában az F/B anti-MBP-arány 1 vagy kisebb, és az enyhülési fázisban lévő pácienseknél a B anti-MBP titer néha enyhén emelkedett [Warren, K. G. and Catz, I., J. Neurol. Sci. 88, 185–194, (1989)].

Allegretta és munkatársai [Science, 247, 718–721 (1990)] kimutatták, hogy MS-páciensekben a proliferatív T-sejtek egy része az MBP felé irányul, Richert és munkatársai [J. Neuroimmun 23, 55–66 (1989)] pedig azt, hogy a humán T-sejtek több epitópot (antigén-determinánst) is felismernek a molekulán. Altman és munkatársai [Eur. J. Immun. 17, 1635–1640 (1987)] szerint úgy látszik, hogy az MBP képes bizonyos T-sejteket aktiválni antigénprezentáló sejtek közreműködése nélkül. Valószínű, hogy az MBP kisméretű peptidjeit a T-sejtek intracelluláris feldolgozás nélkül is felismerik, egyszerűen annak alapján, hogy ezek a prezentáló sejtek felületén meg tudják kötni a II. osztályú fő hisztokompatibilitási antigéneket.

Minthogy a kísérleti allergiás encephalomyelitis (agyvelő- és gerincvelő-gyulladás, EAE) – az MS egyik elfogadott állati modellje – előidézhető oly módon, hogy az arra érzékeny rágcsálókat Freund-féle komplett adjuvánnal készített MBP-vel vagy PLP-vel beoltjuk, Fritz, R. B. és munkatársai [J. Immunol. 130, 1024–1026 (1983)], valamint Trotter, J. L. és munkatár-

sai [J. Neurol. Sci. 79, 173–188 (1987)] szerint lehet, hogy az MS demielizáció valamilyen autoimmun mechanizmussal megy végbe. A B-sejt autoantitestek szempontjából Warren, K. G. és munkatársai [Ann. Neurol. 35, 280–289 (1994)] a kóros folyamatok által megcélzott MBP epitópot a tri-Prolil szekvencia (–99–100–101 aminosav) közelében, a 80. és 100. aminosav közötti területen lokalizálták. Ez a B-sejt-epitóp átfedi azt az immunodomináns epitópot, amely az MS által okozott agyi sérülésekben található, MBP-re reagáló T-sejteket köti meg [Oksenberg, J. R. et al., Nature, 362, 68–70 (1993)].

Korábbi vizsgálatok azt mutatták, hogy az MBP az anti-MBP-t közömbösíti. Ennek ellenére az eddigi kísérletek, amelyekben az MS-t heterológ MBP intramuszkuláris vagy szubkután beadásával próbálták kezelni, nem voltak sikeresek [Campbell, B., Vogel, R. J., Fisher, E. and Lorenz, R. [Arch Neurol 29:10–15 (1973)]; Gonsette, R. E., Delmotte, P. and Demonty, L., [J Neurol 216:27–31 (1977)]; valamint Romine, J. S. and Salk, J., In: Hallpike, J. F., Adams, C. W. M. and Tourtelotte, W. W., eds. [Multiple sclerosis. Baltimore, Williams & Wilkins, (1982): 621–630]]. Natív MBP alkalmazásakor kétféle probléma merül fel. Egyrészt a fehérjét emberi agy-mintákból készítik, így fennáll az a potenciális veszély, hogy a mintában neurovírusok vannak jelen. Másrészt: bár az oldható MBP rendszerint nem immunogén, lehet, hogy megváltozott immunrendszerű embereknek beadva antigénként ké-

pes működni, és MBP elleni antitestek termelését idézi elő.

Ezért a találmány megvalósításában azt vizsgáltuk, hogy az MS-betegek gerincfolyadékából tisztítással kinyert anti-MBP közömbösíthető-e humán MBP (h-MBP) kiválasztott oldható peptidjeivel. E célból a h-MBP teljes hosszát lefedő oldható szintetikus peptideket használtunk, hogy meghatározzuk a h-MBP azon lehetséges epitóptartományát, amely az ilyen betegekben kapott anti-MBP-t közömbösít. A kiválasztott oldható peptidok, amelyek az anti-MBP-t közömbösítik, hatásosabban alkalmazhatók MS kezelésére, mint a teljes molekula. Ezeket az oldható peptideket szintetikusan állítjuk elő, így nem áll fenn az a veszély, hogy neurovírusokat tartalmaznak. Továbbá kis méretük folytán az ilyen peptidok nem hathatnak immunogénként. Ha tehát az MS kezelésére válogatott peptideket alkalmazunk, akkor elkerülhetők a natív fehérje használatával járó problémák.

A találmány szerinti peptidokkal *in vivo* vizsgálatokat is végeztünk annak meghatározására, hogy milyen mértékben hatásosak az MS anti-MBP megkötésében vagy termelésének modulálásában.

A találmány szerinti megoldásban vizsgált peptidok szekvenciájukat tekintve lényegében homológok a humán myelin bázikus fehérje aminosavszekvenciájának egy részével. Ezek a peptidok alkalmasak arra, hogy az anti-MBP termelését közömbösítsék vagy modulálják.

Ilyen peptidok például a következők:

MBP75–95

Lys Ser His Gly Arg Thr Glu Asp Glu Asn Pro Val Val His Phe Phe Lys Asn Ile Val Thr

MBP64–78

Ala Arg Thr Ala His Tyr Gly Ser Leu Pro Gln Lys Ser His Gly

MBP61–75

His His Pro Ala Arg Thr Ala His Tyr Gly Ser Leu Pro Gln Lys

MBP69–83

Tyr Gly Ser Leu Pro Gln Lys Ser His Gly Arg Thr Gln Asp Glu

MBP80–97

Thr Gln Asp Glu Asn Pro Val Val His Phe Phe Lys Asn Ile Val Thr Pro Arg

MBP91–106

Lys Asn Ile Val Thr Pro Arg Thr Pro Pro Pro Ser Gln Gly Lys Gly

MBP84–93

Asn Pro Val Val His Phe Phe Lys Asn Ile

MBP85–94

Pro Val Val His Phe Phe Lys Asn Ile Val

MBP86–95

Val Val His Phe Phe Lys Asn Ile Val Thr

MBP87–96

Val His Phe Phe Lys Asn Ile Val Thr Pro

MBP82–98

Asp Glu Asn Pro Val Val His Phe Phe Lys Asn Ile Val Thr Pro Arg Thr

A találmány tárgya hatóanyagként a myelin bázikus fehérje peptidfragmentum MBP82–98 peptid alkalmazása sclerosis multiplex kezelésére szolgáló gyógyszerkészítmény előállítására. Közelebbről, a találmány tárgya a hatóanyagként valamilyen gyógyszeratíllag alkalmazható hordozóanyag mellett az Asp-Glu-Asn-Pro-Val-Val-His-Phe-Phe-Lys-Asn-Ile-Val-Thr-Pro-Arg-Thr

képletű MBP82–98 peptid alkalmazása HLA-DR2 haplotípust hordozó páciensek esetében sclerosis multiplex kezelésére szolgáló gyógyszerkészítmény előállítására. A találmány szerinti alkalmazás HLA-DR2 haplotípusként DRB1*1501 vagy DRB1*15021 haplotípust hordozó páciensek kezelésére szolgáló gyógyszerkészítmény előállítására vonatkozik, ahol intravénás, int-

ratekális vagy e két módszer kombinálása szerinti beadásra szolgáló gyógyszerkészítményt állítunk elő.

A találmány szerinti alkalmazásban a gyógyszerkészítmény intravénás beadás esetén egységdózisonként 1 mg/testtömeg-kg és 10 mg/testtömeg-kg közötti peptidet tartalmaz, míg intratekális beadás esetén ez a mennyiség egységdózisonként 1 mg/testtömeg-kg és 100 mg/testtömeg-kg közötti.

A találmány szerinti alkalmazás előnyösen krónikus progresszív sclerosis multiplex kezelésére szolgáló gyógyszerkészítmény előállítására vonatkozik.

A találmányt a továbbiakban a mellékelt rajzok segítségével ismertetjük, amelyek rövid leírása a következő:

Az 1. ábra 18 szintetikus peptid (kis számok) lokalizációját mutatja az eredeti humán MBP-molekulához viszonyítva. A peptideket az MBP-molekula megfelelő régiója mellett elhelyezett függőleges szakaszok jelzik. A nagy számok a humán MBP aminosavait jelölik.

A 2. ábrán 10 különböző sclerosis multiplexes páciensből összegyűjtött és tisztított anti-MBP-nek humán MBP-vel és MBP-peptidekkel felvett inhibíciós görbéi láthatók.

A 3. ábra egy sclerosis multiplexes páciensből izolált anti-MBP közömbösítését mutatja humán MBP-vel, valamint MBP80–97, MBP91–106 és MBP75–95 peptiddel.

4. ábra: CSF anti-MBP titerek hosszú időn át végzett monitorozása egy krónikus progresszív MS-ben szenvedő betegnél:

1983 és 1993 között 11 év alatt 26-szor vettünk mintát; az F (szabad) és B (kötött) anti-MBP-szintek állandóan magas értéken maradtak, cpm=beütés/perc

$$\text{radioaktivitási egység} = \frac{\text{minta cpm} - \text{vakpróba cpm}}{\text{összes cpm} - \text{vakpróba cpm}}$$

üres körök: a CSF immunkomplexek savas hidrolízise után meghatározott B (kötött) anti-MBP

kitöltött körök: F (szabad) anti-MBP

5. ábra: Kontrollbetegek: CSF anti-MBP-szintek két időbeli összehasonlító mérésben („idő-kontroll”, 1F56 – 5A. ábrák, illetve 3M66 – 5B. ábrák) és két „idő-sóoldat-kontroll” mérésben (4M45 – 5C. ábrák, illetve 5M59 – 5D. ábrák). A CSF-ből az első két órában 30 percenként, majd 24 óra múlva vettünk mintát. Az F és B anti-MBP mind négy betegnél megmaradt a magas kiindulási szinten. A jelölések azonosak a 4. ábrán alkalmazottakkal.

6. ábra: Páciensek közötti összehasonlító peptidvizsgálatok: CSF anti-MBP-szintek egy négy páciensből álló csoportnál (10F38 – 6A. ábrák; 13F43 – 6C. ábrák; 5M59 – 6D. ábrák; illetve 3M66 – 6G. ábrák), akik összehasonlító anyagként növekvő mennyiségű (1, 2,5, 5, illetve 10 mg)

MBP35–58 nem kötő szintetikus peptidet kaptak, és egy párhuzamos, 4 másik MS-páciensből álló csoportnál (6F53 – 6B. ábrák; 8M41 – 6D. ábrák; 4M45 – 6F. ábrák; illetve 1F56 – 6H. ábrák), akik növekvő mennyiségű (1, 2,5, 5, illetve 10 mg) MBP75–95 anti-MBP-kötő szintetikus peptidet kaptak. A CSF anti-MBP dóziszfüggően kötődik az MBP75–95 peptidhez, az MBP35–58 peptiddel pedig nem reagál. A kötött anti-MBP szintje lényegében változatlan maradt.

7. ábra: Összehasonlító peptidvizsgálatok az egyes pácienseknél: Amikor MS-pácienseken „időkontroll” vizsgálatot (1F56 – 7C. ábrák, illetve 3M66 – 7D. ábrák) vagy „idő-sóoldat-kontroll” vizsgálatot (5M59 – 7A. ábrák, illetve 4M45 – 7B. ábrák) végeztünk, továbbá amikor az MBP35–58 összehasonlító nem kötő peptidet kapták (5M59 és 3M66), CSF F és B anti-MBP-szintjeik változatlanok maradtak. Ezzel szemben amikor ugyanezek a (4M45, 1F56, illetve 3M66 jelű) páciensek később 5–10 mg MBP75–95 anti-MBP-kötő peptidet kaptak, akkor F anti-MBP-szintjük 7 napig terjedő időszakra kimutathatatlanul vált, majd a 10. és 21. nap között visszatért a kiindulási értékhez.

8. ábra: Ismételt intratekális szintetikus peptid injekciók: egy krónikus progresszív MS-ben szenvedő páciens hetenként egy, összesen tíz 10 mg-os MBP75–95 injekciót kapott közvetlenül a CSF-be. Minden injekció előtt (körök) és 30 perccel utána (négyzetek) mértük az F és B anti-MBP-titert. Az F anti-MBP (kitöltött körök és négyzetek) a tízhetes időszakra kimutathatatlanul vált, míg a B antitestek szintje (üres körök és négyzetek) lényegében változatlan maradt.

9. ábra: Szintetikus peptid intravénás beadása: CSF anti-MBP-szintek 500 mg MBP75–95 egyszeri intravénás beadását követően: az injekció után 10, 16 és 30 nap múlva mind az F, mind pedig B anti-MBP-szint jelentősen csökkent. Jelölések: mint a 4. ábrán.

10. ábra: Az MS anti-MBP-t megkötő MBP építóp további finomítása 41 deka-peptiddel, amelyek lefedik a 61. és 110. aminosav közötti szakaszt.

Magyarázat:

- a sávok jelzik az inhibíció %-os értékét=100 – radioaktivitási egységek
- pozitív összehasonlítóként MBP-t és MBP75–95 peptidet alkalmaztunk, ezek mind az F, mind a B antitesteket teljes mértékben (100%) inhibiálták
- negatív összehasonlítóként MBP51–60 és MBP111–120 peptidet alkalmaztunk, ezek az F

- és B anti-MBP-t jelentéktelen (0–10%) mértékben inhibiálták
- az MBP84–93, MBP85–94, MBP86–95 és MBP87–96 jelű decapeptidek, amelyek mind az F, mind a B antitesteket maximálisan (90–100%-ban) inhibiálták, erősen kötődnek az MBP építőp-hoz
 - szaggatott vonal: az inhibíciós vizsgálat 95%-os megbízhatósági határa
- A 11A. ábrán a CSF szabad (F – ●) és a kötött (B – O) anti-MBP szintje látható egy féloldali látóideg-gyulladásban szenvedő páciensnél, aki két 50 mg-os intratekális pMBP86–95 injekciót (it #1 és it #2) kapott, közöttük 4 hét telt el; d=nap, w=hét.
- A 11B. ábrán a CSF szabad (F – ●) és a kötött (B – O) anti-MBP szintje látható egy komplett látóideg-gyulladásban szenvedő páciensnél, aki a súlyosbodás első hetében több 50 mg-os intratekális pMBP82–98 injekciót (it #1, it #2, it #3, it #4 és it #5) kapott.
- A 11C. ábrán a CSF szabad (F – ●) és a kötött (B – O) anti-MBP szintje látható egy pseudoathetosisban szenvedő páciensnél, aki naponta, összesen öt alkalommal kapott 50 mg-os intratekális pMBP82–98 injekciót (it #1, it #2, it #3, it #4 és it #5).
- A 11D. ábrán a CSF szabad (F – ●) és a kötött (B – O) anti-MBP szintje látható egy súlyosbodó/progresszív MS-ben szenvedő páciensnél, aki a visszaesés első hetében 2-3 naponként, összesen négy alkalommal 50 mg-os intratekális pMBP86–95 injekciót (it #1, it #2, it #3 és it #4), majd amikor a betegség ismét a progresszív fázisba lépett, egy 400 mg-os intravénás pMBP86–95 injekciót (IV) kapott.
- A 12. ábrán a CSF szabad és kötött anti-MBP szintje látható egy poliszimptomás relapsusban szenvedő páciensnél, aki összesen hét 50 mg-os intratekális pMBP86–95 injekciót kapott. A 2. injekció után 30 perc elteltével nem kaptunk CSF-mintát, csak 24 óra múlva. Jelölések: mint a 11. ábrán.
- A 13. ábrán a CSF szabad és a kötött anti-MBP szintje látható egy súlyosbodó/progresszív MS-ben szenvedő páciensnél, aki intratekális (it #1, it #2 és it #3) és intravénás pMBP86–95 injekciókat (IV#1 és IV#2) is kapott. Az it #2 injekció előtt és után nem kaptunk CSF-mintát. Jelölések: mint a 11. ábrán.
- A 14. ábrán a CSF szabad és a kötött anti-MBP szintje látható egy súlyosbodó/progresszív MS-ben szenvedő páciensnél, aki intravénás (IV #1, IV #2 és IV #3) és intratekális (it #1–it #9) pMBP86–95 és pMBP82–98 injekciókat kapott. Jelölések: mint a 11. ábrán.

A 15. ábrán látható kísérlet a visszaesések megelőzésére irányult egy súlyosbodó/progresszív MS-ben szenvedő páciensnél, aki két 400 mg-os intravénás injekciót (IV #1 és IV #2, pMPR86–95, illetve pMBP82–98) kapott. Az első súlyosbodás idején, 3 hónappal az IV #1 beadása után nem kaptunk CSF-mintát. A visszaesések természetes gyakoriságát felül nyílak jelzik, amelyek a rohamnak megfelelő hónapot mutatják. A bekeretezett terület mutatja a vizsgálati időszakot. Jelölések: mint a 11. ábrán.

A 16. ábrán látható kísérlet a visszaesések megelőzésére irányult egy súlyosbodó/progresszív MS-ben szenvedő páciensnél, aki két intratekális (it #1 és it #2) és egy intravénás pMPR86–95 injekciót (IV) kapott. A ■ jel nagy dózisú intravénás metilprednisolont jelent. A visszaesések természetes gyakoriságát felül nyílak jelzik, amelyek a rohamnak megfelelő hónapot mutatják. A bekeretezett terület mutatja a vizsgálati időszakot. Jelölések: mint a 11. ábrán.

A 17. ábra MBP-specifikus autoantitestek intratekális és intravénás beadásának hatását mutatja egy krónikus progresszív MS-páciens gerincfolyadékában; a 17A. ábrán látható kísérletben a pMBP75–95-öt (2,5 mg 5 ml nátrium-klorid-oldatban) közvetlenül a CSF-be injektáltuk, és az MBP-specifikus autoantitesteket szilárd fázisú radioimmunvizsgálattal mértük különböző (az injekció beadását követő 0,5 óra és 7 nap közötti) időpontokban. A peptidinjekció a szabad anti-MBP-t (kitöltött körök) átmenetileg közömbösítette, a kötött anti-MBP-re (üres körök) viszont nem hatott. Az injekció után 1 és 2 órával az autoantitesteket nem lehetett kimutatni, mennyiségük az injekciótól számított 12. és 24. óra között kezdett visszatérni a kiindulási értékhez. Hasonló eredményeket tapasztaltunk hét másik krónikus progresszív MS-páciensnél. 17B. ábra: 13 hónappal a 17A. ábrán szereplő intratekális peptidinjekció után 500 mg pMBP75–95-öt adtunk be intravénásan (50 ml nátrium-klorid-oldatban), majd 3 hónapon át mértük az MBP-specifikus autoantitesteket a CSF-ben (középtérték ±szórás).

A 18. ábra összegezve mutatja a CSF anti-MBP-szinteket 13 krónikus progresszív MS-páciensnél, akik közül ketten pMBP75–95-öt, a többiek pedig pMBP86–95-öt kaptak egy 5-6 mg/testtömeg-kg intravénás injekció alakjában (IV #1, 256–500 mg normál nátrium-klorid-oldatban), majd mértük a sza-

bad és kötött anti-MBP-szinteket (kitöltött, illetve üres körök). Az IV #1 utáni 1. és 4. hónap között az autoantitesszintek alacsonyok vagy kimutathatatlanok voltak, azután kezdtek visszatérni a kiindulási értékhez. Az IV #1 utáni 6. és 10. hónap között minden páciens kapott egy második, ugyanolyan dózisu intravénás pMBP82–98 injekciót (IV #2).

Az alábbiakban részletesen ismertetjük a találmányt.

A találmány szerinti megoldásban vizsgált kiválasztott peptidok szekvenciájuk szempontjából lényegében homológok a humán myelin bázikus fehérje aminosavszekvenciájának egy részével. A „lényegében homológ” kifejezés azt jelenti, hogy a humán myelin bázikus fehérje és a peptidok aminosavszekvenciája között lehet némi eltérés, feltéve, hogy a peptidok ezzel az eltéréssel együtt megfelelnek a tervezett felhasználási célnak, vagyis csökkentik a humán myelin bázikus fehérje elleni antitestek (anti-MBP) termelését. A leírásban megadott kitanítás alapján az átlagosan művelt szakember kísérleti úton könnyen meghatározhatja, hogy a kiválasztott peptidokban melyek azok a szekvenciaeltérések, amelyek a peptidok funkcióját nem befolyásolják.

A találmánnyal kapcsolatos további munkánk során egy 41 decapeptidból álló sorozattal végzett kompetitív inhibíciós vizsgálatok alapján finomítottuk, és a 86. és 95. aminosav közötti területen lokalizáltuk az MBP-nek az MS anti-MBP-t megkötő epitópját. A B anti-MBP legnagyobb mértékű (95% vagy nagyobb) inhibíciója alapján megállapítottuk, hogy az MS anti-MBP-t megkötő MBP-epitóp a 86. és 95. aminosav között található. A hatásos decapeptidok legkisebb közös régiója a 87. és 93. aminosav közötti szakasz.

A találmány szerinti alkalmazásban vizsgált vegyületek a polipeptidok szintetizálására általánosan elfogadott módszerek szerint állíthatók elő. A „peptid” kifejezés a rekombináns DNS-technikával előállított peptidokat is magában foglalja. A találmány oltalmi körébe tartozik azon DNS-szekvencia meghatározása is, amely a találmány szerinti választott peptidok szekvenciájának ismeretében a választott aminosavszekvenciát kódolja. A megfelelő DNS-szekvencia a DNS-szek-

venciák szintézisének hagyományos, ismert módszereivel állítható elő. Az ily módon előállított DNS-szekvenciákat azután alkalmas hordozókba klónozzhatjuk, és felhasználhatjuk a megfelelő gazdasejtek transzformálására, hogy azok a rekombináns peptidet termeljék. Mindezek hagyományos, az átlagosan művelt szakember által jól ismert eljárások.

A találmány szerinti alkalmazásban vizsgált peptidok szekvenciájukat tekintve lényegében homológok a humán myelin bázikus fehérje aminosavszekvenciájának egy részével. Ez azt jelenti, hogy a peptidok tetszőleges hosszúságúak lehetnek, azzal a feltétellel, hogy hosszúságuk elegendő a humán myelin bázikus fehérje elleni antitestek termelésének csökkentéséhez, de nem olyan hosszúak, hogy előidéznék a korábbi kísérletek során tapasztalt problémákat, mikor MBP-peptideket *in vivo* alkalmaztak sclerosis multiplex kezelésére. A találmány szerint vizsgált peptidok legalább 10 aminosav hosszúságúak lehetnek. A találmány egyik példájában a peptidok hossza körülbelül 10 és körülbelül 25 aminosav közötti. Ha a találmány szerinti megoldásban a peptidokat egy fúziós fehérje részeként alkalmazzuk, akkor a peptid teljes hossza sokkal nagyobb lehet.

Megállapítottuk, hogy a h-MBP aminosavszekvenciájának lényegében megfelelő kiválasztott peptidok az anti-MBP termelését hatásosan csökkentik. Ezek a peptidok a h-MBP aminosavszekvenciájában a körülbelül 61. és körülbelül 106. aminosav közötti szakasznak felelnek meg. Az egyik példában a peptidok – amelyeket a szabad anti-MBP közömbösítésére használunk – a h-MBP aminosavszekvenciájában a 75. és körülbelül 106. aminosav közötti szakasznak felelnek meg. Egy másik példában, amelyben a peptidokat az F anti-MBP közömbösítésére vagy az F és B anti-MBP szintézisének csökkentésére használjuk, ezek a h-MBP aminosavszekvenciájában a körülbelül 82. és körülbelül 99. aminosav közötti szakasznak felelnek meg. Tehát a peptidokat úgy választjuk, hogy az alábbi 1. azonosító számú szekvenciából kiválasztunk egy összefüggő, 10 és 25 közötti számú aminosavból álló szakaszt, azzal a feltétellel, hogy az így kapott szekvencia a myelin bázikus fehérje elleni antitesteket közömbösíti vagy termelésüket modulálja:

Szekvenciaazonosító szám: 1.

61

His His Pro Ala Arg Thr Ala His Tyr Gly Ser Leu Pro Gln Lys Ser His Gly Arg Thr Gln Asp Glu Asn Pro Val Val His Phe Phe Lys Asn Ile Val Thr Pro Arg Thr Pro Pro Ser Gln Gly Lys Gly

106

Ilyen peptidok az alábbiak:

MBP61–75

His His Pro Ala Arg Thr Ala His Tyr Gly Ser Leu Pro Gln Lys

MBP64–78

Ala Arg Thr Ala His Tyr Gly Ser Leu Pro Gln Lys Ser His Gly

MBP69–83

Tyr Gly Ser Leu Pro Gln Lys Ser His Gly Arg Thr Gln Asp Glu

MBP75–95

Lys Ser His Gly Arg Thr Glu Asp Glu Asn Pro Val Val His Phe Phe Lys Asn Ile Val Thr

MBP80–97

Thr Gln Asp Glu Asn Pro Val Val His Phe Phe Lys Asn Ile Val Thr Pro Arg

MBP91–106

Lys Asn Ile Val Thr Pro Arg Thr Pro Pro Pro Ser Gln Gly Lys Gly

A találmány egyik megvalósításában a peptidek R_1 -Val-His-Phe-Phe-Lys-Asn-Ile- R_2 általános képletű vegyületek és sóik – a képletben R_1 és R_2 jelentése egymástól függetlenül hidrogénatom, hidroxicsopót, egy aminosav- vagy polipeptidmaradék, azzal a feltétellel, hogy R_1 és R_2 közül nem lehet mind-

kettő egyidejűleg hidrogénatom vagy hidroxicsopót. A peptid tartalmazhat szubsztitúciókat, deléciókat vagy addíciókat, feltéve, hogy az anti-MBP termelését közömbösítő vagy moduláló hatását megtartja.

10 A találmány szerinti alkalmazásban használható peptidek például a következők:

MBP84–93

Asn Pro Val Val His Phe Phe Lys Asn Ile

MBP85–94

Pro Val Val His Phe Phe Lys Asn Ile Val

MBP86–95

Val Val His Phe Phe Lys Asn Ile Val Thr

MBP87–96

Val His Phe Phe Lys Asn Ile Val Thr Pro

MBP82–98

Asp Glu Asn Pro Val Val His Phe; Phe Lys Asn Ile Val Thr Pro Arg Thr

Az MBP82–98 peptidnek jobb az oldhatósága, mint a találmány szerinti többi peptidnek, mert 5 további hidrofíli aminosav van benne. Ezért ez a peptid a többihez képest előnyösen alkalmazható.

Jelenleg is folyik az anti-MBP lehetséges szerepének kutatása az MS patogenezisében. Először Panitch és munkatársai {Panitch, H. S., Hooper, C. S., and Johnson, K. P., [Arch Neurol 37:206–209, (1980)]} – akik szilárd fázisú radioimmunvizsgálatot alkalmaztak tengerimalac MBP-vel – írták le az anti-MBP-titerek megemelkedését aktív MS-ben szenvedő betegeknél. Az MS akut súlyosbodási fázisában lévő pácienseknél a főleg szabad formában jelen lévő anti-MBP szintje rendszerint magas, míg a klinikai enyhülés fázisában az anti-MBP-szint egyes pácienseknél ki sem mutatható. Az akut visszaesésből az enyhülésbe való átmenet időszakában a szabad anti-MBP titere heteken vagy hónapokon át fokozatosan csökken, az antitest kötött frakcióinak mennyisége viszont a kiindulási értékhez képest növekszik. Más, enyhülési fázisban lévő pácienseknél a szabad és kötött anti-MBP titerek alacsonyok, és az F/B arány 1-nél kisebb, ami arra utal, hogy az anti-MBP-hez egy vagy több, az anti-MBP-t neutralizáló antitest kötődik. Egyes esetekben a betegség aktív fázisaiban sem volt kimutatható az anti-MBP olyan pácienseknél, akik az MS klinikai kritériumainak megfelelnek, vagy akiknél az MS neuropatológiailag bizonyított. Lehet, hogy az ilyen páciensekben más myelinfémérjék elleni antitestek vannak jelen. Az, hogy nincs egy specifikus antitestre vonatkozó elképzelés, nem zárja ki azt, hogy az MS-páciensek többségénél az anti-MBP jelentős szerepet játszik a demielizáció mechanizmusában.

Nemrégiben egy MBP antitestet találtunk az MS-páciensek gerincfolyadékából tisztítással kinyert IgG-frakcióban {Warren, K. G. and Catz, I. [J Neurol Sci 96:19–27 (1990)]}. Aktív betegeknél MBP elleni pri-

25 mer antitestek találhatók szabad és kötött formában: az akut súlyosbodási fázisban az F/B arány 1-nél nagyobb, a krónikus progresszió fázisában pedig 1-nél kisebb {Warren, K. G. and Catz, I., [Ann Neurol 209:20–25 (1986)]; Catz, I. and Warren, K. G., [Can J Neurol Sci 13:21–24 (1986)]; valamint Warren, K. G. and Catz, I., Ann Neurol 21:183–187 (1987)]}. A szekunder antitestek, amelyek az anti-MBP-t közömbösítik, akkor jelennek meg, mikor a betegség inaktív válik. A terciér antitestek, amelyek az anti-MBP közömbösítését gátolják, akkor vannak jelen, ha a betegség krónikusan progresszív, és nem válik inaktívvá. Az a tény, hogy az MS különböző fázisaihoz egy MBP antitest-kaszád tartozik, azt mutatja, hogy ennek fontos szerepe lehet a betegség természetes kórtörténetében.

Bár az MBP elleni antitestek kimutathatók az aktív MS-páciensek gerincfolyadékában, közvetlen szerepük a demielizáció patogenezisében még bizonyításra szor- 40
ul. Az, hogy az MBP elleni antitestek részt vesznek az MS mechanizmusában, legjobban az *in vivo* down-regulációs hatásuk alapján bizonyítható, kiválasztott peptidek beadásával és a betegség klinikai lefolyásának monitorozásával. Ha az anti-MBP az egyetlen olyan antitest, amely az MS-ben végbemenő demielizációval kapcsolatban áll, akkor lehet, hogy ez a folyamat blokkolható olyan kiválasztott MBP-peptidek intratekális és/vagy intravénás beadásával, amelyek *in situ* csök- 50
kentik az anti-MBP szintjét (down-reguláció), és fokozzák az MBP-vel szembeni toleranciát. Az MS-ben végbemenő demielizációban más humán myelinfémérjék is szerepet játszhatnak, így olyan peptidek alkalmazása is a találmány oltalmi körébe tartozik a megfelelő anti- 55
testek szintjének csökkentésére, amelyek lényegében szekvenciahomológok ezen egyéb myelinfémérjék aminosavszekvenciájának egy részével. A korábbi kísérletek, amelyekben az MS-t heterológ MBP intramuszkuláris vagy szubkután beadásával próbálták kezelni, 60

nem voltak teljesen sikeresek {Campbell, B., Vogel, R. J., Fisher, E. and Lorenz, R. [Arch Neurol 29:10–15 (1973)]; Gonsette, R. E., Delmotte, P. and Demonty, L., [J Neurol 216:27–31 (1977)]; valamint Romine, J. S. and Salk, J., In: Hallpike, J. F., Adams, C. W. M. and Tourtelotte, W. W., eds. [Multiple sclerosis. Baltimore, Williams & Wilkins, (1982): 621–630]}, viszont a találmány szerinti, az anti-MBP termelését közömbösítő vagy csökkentő MBP-peptidek intratekális és/vagy intravénás beadása kedvezőbb eredményeket hozott.

Az MS állapotmodellje, a kísérleti allergiás encephalomyelitis (EAE) egy T-sejt-mediált demielizációs betegség. Gaur, A. és munkatársai [Science 258, 1491–1494 (1992)] szerint az EAE-ben javulás érhető el, ha a beteg egereket szintetikus MBP-peptidekkel beoltják. Critchfield, J. M. és munkatársai [Science 263, 1139–1143 (1994)] leírják, hogy egerekben MBP-peptidek nagy dózisa hatására az autoreaktív T-sejtek eltűntek, és megszűntek az EAE klinikai és patológiai jelei. Cheu, W. és munkatársai [Science. 265, 1237–1240, 1194] szerint az MBP még orálisan beadva is modulálja az EAE-t azáltal, hogy perifériás toleranciát (csökkent válaszkészséget) idéz elő. Az MS-betegek myelinroncsolódásában szerepet játszó T-sejtek, B-sejtek és makrofágok modulálásához adott esetben egy olyan kombinációt kell intravénásan vagy intratekálisan beadni, amely myelinantigéneket vagy ezen antigének szintetikus peptidjeit tartalmazza.

A találmány tárgya tehát hatóanyagként az MBP82–89 peptid alkalmazása sclerosis multiplex kezelésére szolgáló gyógyszerkészítmény előállítására, a peptidet egy gyógyszerkészítmény elfogadható hordozóanyaggal összekeverve. A gyógyszerkészítmény elfogadható hordozóanyagok a szakmában ismertek, ilyen például a normál sóoldat (0,9%-os nátrium-klorid-injekció).

A találmány szerinti alkalmazásban a peptidek az embereknek a sclerosis multiplex kezelésére vagy enyhítésére adhatók be. MS kezelése esetén a terápiás dózis intravénásan körülbelül 1,0 és körülbelül 10,0 mg/testtömeg-kg közé eshet, intratekálisan pedig a teljes dózis körülbelül 1 és körülbelül 100 mg közötti lehet. Az egyik példában a peptidet intravénásan, intratekálisan vagy kombináltan adjuk be. A peptidek beadhatók egyszeri vagy kívánt esetben több egymás utáni dózisban.

A találmány megvalósítása során azt tapasztaltuk, hogy az intravénás beadás mind a szabad, mind a kötött anti-MBP-t csökkenti, míg az intratekális beadás csak a szabad anti-MBP közömbösítésében vagy modulálásában hatásos.

A találmány egyik megvalósításában azt tapasztaltuk, hogy MBP-peptidek sorozatos intratekális beadása monoszimptomás relapszusban szenvedő pácienseknek az F anti-MBP-t csökkenti, és az alacsony szintet az injekciók beadása után hónapokon át fenntartja. Ennek a megvalósításnak egyik példájában 4-5 napon át naponta 50 mg MBP-peptidet adtunk be egy páciensnek. Egy másik példa szerint a kezdeti injekciók után egy-két hét múlva egy további dózis adható be.

Az alábbi példák a találmány részletesebb ismertetésére szolgálnak, annak oltalmi körét nem befolyásolják.

1. példa

Humán myelin bázikus fehérje elleni antitest közömbösítése in vitro

Az 1. ábrán 18 szintetikus peptid lokalizációja látható az eredeti humán MBP-molekulához viszonyítva. A natív MBP-t MS-mentes agyszövetből izoláltuk a Diebler, G. E., Martenson, R. E. és Kies, M. W. [Prep Biochem 2:139–165 (1972)] által leírt módon, majd gélszűrővel és fordított fázisú nagynyomású folyadékkromatográfiával (HPLC) tisztítottuk. A végső antigénkészítmények tisztaságát SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel ellenőriztük. A további vizsgálatokhoz csak azokat használtuk, amelyek 18,5 KD molekulatömeggel vándoroltak. A tisztított MBP-t antigénspecifikus affinitáskromatográfiához, közömbösítési vizsgálatokhoz és a szilárd fázisú anti-MBP radioimmunvizsgálathoz használtuk.

Tizennyolcféle, 8–25 aminosavból álló, a h-MBP hosszát lefedő peptidet szintetizáltunk a Groome, N. P., Dawkcs, A., Barry, R. és munkatársai [J Neuroimmun 19:305–315 (1988)] által leírt Fmoc (9-fluorenil-metoxi-karbonil)-módszerrel. A peptidek tisztaságát fordított fázisú HPLC-vel ellenőriztük, ehhez C18 oszlopot és 0,1% trifluor-ecetsavat tartalmazó víz/acetonitril gradienst alkalmaztunk. A peptidek aminosavanalízisét is elvégeztük a szokásos elemzési módszerek alkalmazásával. A vizsgálatban sok olyan peptidet használtunk, amelyek egy nem természetes ciszteinmardékot tartalmaztak, mert ezeket azzal a céllal állítottuk elő, hogy a Freund-féle adjuvánssal alkalmazva immunogénként működjenek. Megállapításainkat ez valószínűleg nem érinti.

35 akut visszaeső MS-pácienstől a tünetek fellépése után 1 héten belül gerincfolyadékot (CSF) vettünk, és nefelometrián (zavarosság-méréssel) meghatároztuk az IgG-szinteket. A vizsgálatban olyan CSF-mintákat választottunk, amelyekben az abszolút IgG-szint kezdeti értéke magas ($\geq 0,080$ g/l), és az anti-MBP-titer megemelkedett (F/B arány $> 1,0$). Minden páciens klinikailag azonosított MS-beteg volt.

Az IgG-t a korábban leírt módon {Warren, K. G. and Catz, I. [J Neurol Sci 96:19–27 (1990)]} protein A-Sepharose (Pharmacia™) affinitáskromatográfiával nyertük ki az akut MS-páciensek koncentrált gerincfolyadékból. Minden IgG-preparátum tisztaságát poliakrilamid-gélelektroforézissel és izoelektromos fókuszálással ellenőriztük. Mikor a tisztított IgG-ben a megemelkedett anti-MBP-szint az MBP-vel végbemenő abszorpció révén nullára csökkent, az abszorpció után kapott felülúszó folyadékok visszamaradt IgG-t tartalmaztak, ami azt mutatja, hogy az anti-MBP csak egy részét képezi a megemelkedett IgG-nek.

Tisztított MBP-t CNBr-aktivált Sepharose 4B-hez (Pharmacia™) kapcsoltunk a gyártó útmutatása szerint. A 35 akut visszaeső MS-pácienstől származó, megemelkedett anti-MBP-szintű, tisztított CSF IgG-ből izoláltuk az anti-MBP-t MBP-Sepharose affinitáskroma-

tográfia alkalmazásával a Warren, K. G. és Catz, I. [J Neurol Sci 103:90–96 (1991)] által leírt módon. A tisztított anti-MBP-mintákat poliakrilamid-gélelektroforézis segítségével összehasonlítottuk az eredeti IgG-forrással. Mikor a tisztított anti-MBP-mintákat az MBP nullára abszorbeálta, az abszorpció utáni felülúszó nem tartalmazott visszamaradt IgG-t – ez az anti-MBP tisztaságát mutatja.

Egy folyékony fázisú vizsgálatban anti-MBP konstans mennyiségeit (15 radioaktív kötési egység, ami a skála megnyújtása céljából 100%-nak felel meg) növekvő mennyiségű (0–1000 ng) h-MBP-vel, illetve 0 és 10 000 ng közötti egyedi MBP-peptidekkel inkubáltuk, majd 1,5 óra múlva minden keverékben meghatároztuk a szabad anti-MBP szintjét. A közömbösítési kísérletekhez 7 MS-páciensből egyenként izolált, illetve 10 különböző MS-páciensből összegyűjtött anti-MBP-t használtunk. Negatív antigén összehasonlítóként 10–1000 ng borjú-thymus hisztont és humán szérumalbumint, pozitív antitest összehasonlítóként pedig egy MBP64–78 peptid elleni monoklonális antitestet (MAb) és egy MBP1–8 peptid elleni poliklonális nyúlantisérumot alkalmaztunk [Groome, N., Harland, J., and Dawkes, A. [Neurochem Int 7:309–317 (1985)]; és Barry, R., Payton, M., and Groome, N. [Neurochem Int 2:291–300 (1991)]]. A 45–50 epitóppal szemben negatív antitest összehasonlítóként egy másik egér monoklonális antitestet használtunk.

Az anti-MBP-szinteket szilárd fázisú radioimmunvizsgálattal mértük, humán MBP alkalmazásával [Warren, K. G. and Catz, I. [Ann Neurol 209:20–25 (1986)]; Warren, K. G. and Catz, I. [Ann Neurol 21:183–187 (1987)]; és Warren, K. G. and Catz, I. [J Neurol Sci 91:143–151 (1989)]]. Az affinitáskromatográfia minden frakciójában, valamint az összes neutralizációs keverékben mértük a szabad anti-MBP-szinteket. Minden egyes mintán 4 mérést végeztünk ugyanazzal a jódzott anyaggal, hogy a vizsgálatok közötti szóródást minimálisra csökkentsük.

A tisztított anti-MBP-t teljes mértékben közömbösítette az MBP, valamint az MBP80–97, MBP91–106 és MBP75–95 peptid, részlegesen közömbösítette az MBP64–78, MBP69–83 és MBP61–75 peptid (lásd az 1. táblázaton és 2. ábrán). A további 12 peptid a tisztított anti-MBP-t nem közömbösítette, ezek kinetikai görbéi a 2. ábrán látható sraffozott területre esnek. A borjú-thymus hisztont és a humán szérumalbumin a tisztított anti-MBP-vel még 1000 ng koncentrációban sem reagált. Az MBP64–78 peptid elleni MAb-t csak az MBP64–78 peptid, az MBP1–8 peptid elleni MAb-t pedig csak az MBP1–8 peptid inhibálta. Az MBP45–50 peptid elleni MAb sem az MBP-vel, sem a peptidekkel nem reagált (az ábrán a világosság kedvéért az összehasonlító adatokat nem tüntettük fel). A kontrollminták mutatják a neutralizációra vonatkozó elképzelés érvényességét, mert minden összehasonlító antitestet az a peptid közömbösített teljes mértékben, amelytől ezt vártuk, és egyetlen más peptid sem. Tehát azt tapasztaltuk, hogy a felismerés még nagy (10 000 ng) koncentrációban is specifikusan megy végbe.

1. táblázat

Humán MBP-szekvencia	Reakció anti-MBP-vel
1–170	++
1–8 Cy	–
Cy 4–18	–
Cy 11–24	–
18–32	–
26–40	–
Cy 35–58	–
Cy 51–64 Gly	+
Cy 64–78	+
Cy 61–75	+
Cy 69–83	++
Cy 75–95	++
Cy 80–97 Gly	++
Cy 91–106	–
117–129	–
Cy 127–140	–
Cy 136–149	–
141–155	–
Cy 149–162	–

++ teljes közömbösítés

+ részleges közömbösítés

– jelentéktelen reakció

A 7 MS-páciensből egyenként izolált anti-MBP-t a h-MBP, valamint az MBP80–97, MBP91–106 és MBP75–95 peptid teljes mértékben közömbösítette (lásd a 3. ábrát mint illusztratív példát). Minthogy az egyes MS-páciensektől csak korlátozott mennyiségű anti-MBP-t kaptunk, a többi 15 peptiddel nem végeztük el a reakciót.

Mint mondtuk, az anti-MBP-t a körülbelül 61. és körülbelül 106. aminosav közé eső peptidek közömbösítették. Az anti-MBP-t nem közömbösítő peptidek a h-MBP aminoterminális végét (körülbelül az 1–63. aminosav) és karboxiterminális végét (körülbelül a 117. és 162. közötti aminosavak) fedik le. Úgy látszik, hogy az MBP különböző, egymást nem átfedő régiói közömbösítik ugyanazt az (egy vagy több) antitestet. Ez úgy magyarázható, hogy az antitestek egy nem összefüggő (többrészes) epitópot ismernek fel, amely különböző régiókban lévő aminosavakat tartalmaz. Hasonló jelenséget tapasztaltak Hruby és munkatársai [Hruby, S., Alvord, B. C., Groome, N. P. et al. [Molec Immun 24: 1359–1364 (1987)]], akik kimutatták, hogy egy patkány monoklonális antitestnek van egy fő epitópja a 112–121. MBP-szekvenciában, de erős keresztreakciót ad egy másik epitóppal, amely a 39–91. peptidben található. Ez valószínűbb, mint az a feltevés, hogy az antitest keresztreakciót ad két teljesen különböző szekvenciával, amelyek nem képeznek egy nem folytonos epitópot [Hruby, S., Alvord, E. G., Martenson, R. E., és

munkatársai [J Neurochem 44:637–650 (1985)]. A neutralizációs eredményeket lehet úgy magyarázni, hogy az MBP különböző részeiből származó peptidek mindegyike részlegesen foglalja el az antitestkötő „zsebet” úgy, hogy az antitest különböző aminosav-oldaláncaival reagálnak. Ez a magyarázat összhangban áll azzal a megfigyeléssel, hogy a teljes inhibíciót nyújtó peptidek (MBP80–97, MBP91–106 és MBP75–95) inhibáló hatása molárisan körülbelül a századrésze az eredeti MBP hatásának. A fenti hipotézis szerint ennek az lehet az oka, hogy az egyes peptidklónok nem képesek elérni az eredeti MBP kötési energiáját.

2. példa

Humán myelin bázikus fehérje elleni antitest közömbösítése vagy termelésének modulálása in vivo

Páciensek kiválasztása és kontrollvizsgálatok

Az ezen kutatási tervbe bevont pácienseket a Multiple Sclerosis Patient Care and Research Clinic of the University of Alberta Edmonton, Canada (az Albertai Egyetem Sclerosis Multiplex Gondozási és Kutatási Klinikája) vizsgálta. A pácienseknél a sclerosis multiplexet klinikailag a Schumacher-féle kritériumok (1965) alapján állapítottuk meg, és a diagnózist az agy mágneses rezonanciafelvételével és CSF immunkémiai profillal támasztottuk alá. Annak bemutatására, hogy krónikus progresszív MS-ben az anti-MBP hosszú időn, hónapokon vagy éveken át tartóan magas szinten marad, a pácienseken többszöri gerinccsapolást végeztünk, és követtük az F és B anti-MBP-szint alakulását. Azt tapasztaltuk, hogy krónikus progresszív MS-pácienseknél az autoantitestek szintje akár 11 éven át is tartóan magas értéken marad, és az anti-MBP-szintekben spontán csökkenés nem fordul elő (ezt mutatja a 4. ábra).

Annak eldöntésére, hogy a kezdetben magas CSF anti-MBP-szintek viszonylag állandóak maradnak-e 24 órán át, 2 páciensből (1F56 és 3M66) 2 órán át 30 percenként, majd 24 óra múlva CSF-mintákat vettünk, és mértük az F és B anti-MBP-szinteket (5A. és 5B. ábra). Az 1F56 és 3M66 páciens „időbeli összehasonlítóként” szolgált. Az F és B anti-MBP-szintek a 2 órán át 30 percenként, majd 24 óra múlva vett CSF-mintákban állandó magas értéken maradtak.

Két másik páciensnél (4M45 és 5M59; 5C., illetve 5D. ábra) azt vizsgáltuk, hogy milyen hatást okoz, ha a CSF-be 5 ml normál sóoldatot injektálunk. Ezek a páciensek „idő-sóoldat-kontrollként” szolgáltak. Az 5 ml normál sóoldat intratekális beadása után a CSF-ből a fenti módon vett mintákban az F és B anti-MBP-értékek megmaradtak a magas kiindulási szinten, ami azt mutatja, hogy a sóoldat „hígító hatása” az anti-MBP titerekre elhanyagolható.

Az anti-MBP-szinteket szilárd fázisú radioimmunvizsgálattal határoztuk meg Immulon mikrotiterlemezre felvitt humán MBP-vel. Az Immulon mikrotiterlemez lyukaiba 10 µg/ml koncentrációjú MBP-ből 100 µl-t (lyukanként 1 µl-t) töltöttünk, és a lemezt 37 °C-on egy éjszakán át inkubáltuk. Ezután marhaszérum-albuminba

(BSA) mártva lehűtöttük, vízzel háromszor átmostuk, és szobahőmérsékleten tároltuk. Az MBP-vel bevont lyukakban 100 µl-es CSF vagy szövetkivonat-mintákat 0,5% BSA-t és 0,05% Tween 20-at tartalmazó 0,01 M Barbitol-pufferolt sóoldattal (BBS, pH=6,9–7,1) 0,010 g IgG/liter koncentrációra hígítva 1-2 órán át szobahőmérsékleten inkubáltunk. Ezután a lyukakat 0,5% BSA-t és 0,05% Tween 20-at tartalmazó 0,01 M BBS pufferrel ötször átmostuk, nyúlban készített ellenanyaggal szemben kecskében készített IgG-Fc specifikus ellenanyaggal (0,5% BSA-t és 0,05% Tween 20-at tartalmazó 0,01 M BBS-ben) 1 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd a fenti módon öblítettük. Végül ¹²⁵I-fehérjét (vagy ¹²⁵I-G-fehérjét) adtunk hozzá, és szobahőmérsékleten 1 órán át inkubáltuk. Mikor nyomjelzőként ¹²⁵I-G-fehérjét használtunk, akkor a vizsgálati pufferben és a lehűtéshez alkalmazott BSA-t tojásfehérje-albuminnal helyettesítettük. Minden mintát 10 példányban futtattunk, és 10 percig számláltunk, hogy minden pozitív mintához 10 000-nél nagyobb beütésszámot gyűjtsünk össze.

Vizsgálat előtt minden CSF- és/vagy szövetmintát a végső 0,010 g/l IgG-koncentrációra hígítottunk. Az F anti-MBP-t közvetlenül a CSF-ből vagy a szövetkivonatból mértük, míg az antitestek B-szintjének meghatározásához az immunkomplexeket előbb savas hidrolízissel, pH=2,2-es glicin-HCl pufferben elbontottuk. A nemspecifikus kötést minden mintánál bevonat nélküli lyukakban alakítottuk ki. Az epitóp lokalizációjához a szintetikus peptideket először egy folyékony fázisú kompetitív kötési vizsgálatban tisztított antitestekkel reagáltattuk, majd az így kapott felülúszókban radioimmunvizsgálattal meghatároztuk az anti-MBP-t. A kompetitív kötési vizsgálat és a radioimmunvizsgálat kombinált eredményeit a szintetikus peptid inhibíciós százalékaként adjuk meg: inhibíció % = 100 – radioaktivitási egységek száma. Minden méréshez 10 párhuzamos mintát készítettünk, és ezeket egy LKB1275 Minigamma számlálóval 10 percig számláltuk. Pozitív összehasonlítóként szövetekből tisztítással kinyert és összegyűjtött anti-MBP-t használtunk 5-féle hígításban. Negatív összehasonlítóként neurológiai betegségekben nem szenvedő páciensektől gyűjtött CSF-et alkalmaztunk. A vizsgálaton belüli reprodukálhatóság 3 és 5% között, a vizsgálatok közötti szórás pedig 7% alatt volt.

Ennek a kutatásnak a következő lépését az tette lehetővé, hogy a vizsgálatban összehasonlítóként (idő- és hígítási kontrollként) részt vevő páciensekben a CSF anti-MBP-szintje megmaradt a kezdeti magas és állandó értéken.

1. fázisú kettős vak kísérlet peptidek

összehasonlítására – intratekális injekció

Az 1. fázisú kísérletet azért végeztük, hogy meghatározzuk az MBP75–95 szintetikus peptid hatását a CSF szabad és kötött anti-MBP-titerére. Miután megkaptuk az engedélyt az Albertai Egyetem Kutatásetikai Bizottságától, a kutatási tervet a betegség előrehaladott stádiumában lévő, a Schumacher-kritériumok (Schumacher és munkatársai [Ann. N. Y. Acad. Sci., 122,

552–568 (1965)] alapján klinikailag azonosított, súlyosan rokkant progresszív MS-betegeken hajtottuk végre. A vizsgálatra 14 páciens jelentkezett önkéntesen; miután megkaptuk tőlük a beleegyezési nyilatkozatot, nyolc beteget választottunk ki a CSF kezdeti F anti-MBP-titere alapján (8 radioaktivitási egység fölött, lásd a 2. táblázatot). Ezek 1 intratekális injekciót kaptak, amely vagy MBP75–95 peptidet tartalmazott – amely *in vitro* megkötötte az anti-MBP-t –, vagy összehasonlóként a nem kötő MBP35–58 peptidet (Warren and Catz, 1993b). A kísérletet kettősen vak módszerrel végeztük: sem a kutatók, sem a páciensek nem ismerték az injek-

ció összetételét. Minden peptidet egy független orvos által véletlenszerűen generált 7 jegyű számmal kódoltunk. A peptidpárokat 5 ml normál sóoldatban oldottuk, és növekvő (1, 2,5, 5, illetve 10 mg-os) dózisban, lumbálpunkció útján injektáltuk a CSF-be. A CSF-ből mintát vettünk az injekció előtt (kezdeti érték), az injekció után 2 óráig 30 percenként, 24 óra múlva, majd hetenként egyszer 3–4 hétig, amíg az anti-MBP vissza nem tért a kezdeti értékre. Minden levett CSF-mintában mértük a sejtszámokat, az összes fehérje-, glükóz-, IgG- és albuminszintet. Az F és B anti-MBP-szinteket a fenti radioimmunvizsgálattal határoztuk meg.

2. táblázat

Páciens azonosító száma, neve, kora	Betegség fennállásának ideje (év)	Kurtzke EDSS	CSF anti-MBP (radioaktivitási egységekben)		Kutatáshoz kiválasztva
			Szabad (F)	Kötött (B)	
1F56	10	8.5 – Triplegia	9	10	igen
2M50	18	6 – Paraparesis	2	10	nem
3M66	20	9 – Quadriplegia	11	12	igen
4M45	21	9 – Quadriplegia	10	11	igen
5M59	28	9 – Quadriplegia	8	10	igen
6F53	19	9 – Quadriplegia	10	9	igen
7F33	11	6 – Paraparesis, ataxia	5	13	nem
8M41	8	8 – Triplegia	9	12	igen
9M49	7	7 – Paraparesis	5	10	nem
10F38	7	8.5 – Paraplegia	11	10	igen
11M49	20	8 – Triplegia	6	13	nem
12M35	12	6.5 – Paraparesis, ataxia	7	12	nem
13F43	15	8 – Paraplegia	9	10	igen
14F32	4	6 – Paraparesis, ataxia	8	7	nem

2. táblázat: 14 olyan krónikus progresszív MS-páciens klinikai adatai és CSF anti-MBP-szintjei, akik önként jelentkeztek MBP-szintetikus peptidok egyszeri intratekális beadásából álló 1. fázisú kutatási vizsgálatra. Ahhoz, hogy az injekció után szignifikáns változást lehessen elérni, a kezdeti anti-MBP-szintnek magasnak (>8 radioaktivitási egység) kellett lennie, ezért a vizsgálatba a 14 páciensből csak nyolcat választottunk ki.

A vizsgálatokban használt összes peptidet az úgynevezett GMP kóddal („good manufacturing product”), a Procyon Inc. (London, Ontario, Canada) által alkalmazott Fmoc (9-fluorenil-metoxi-karbonil)-módszer alkalmazásával szintetizáltuk. A peptidok tisztaságát fordított fázisú nagynyomású folyadékkromatográfiával ellenőriztük, ehhez C18 oszlopot és 0,1% trifluor-ecetsavat tartalmazó víz/acetonitril gradienst alkalmaztunk. A tömegspektroszkópiát és aminosavanalízist ismert módszerekkel végeztük. A beadás előtt minden peptidet ellenőriztünk pirogenitás (lázkeltő hatás) (Vancouver General Hospital, Vancouver, Canada), sterilitás (Provincial Laboratory for Public Health for Nor-

thern Alberta, Edmonton, Canada) és akut toxicitás (Provincial Laboratory for Public Health for Northern Alberta, Edmonton, Canada) szempontjából; a peptidok „embernek beadható” minősítést kaptak. A kódszámokkal jelölt szintetikus peptidok megfelelő mennyiségét 5 ml steril normál sóoldatban (USA Gyógyszerkönyv szerinti 0,9%-os nem pirogén nátrium-klorid-injekció, Baxter Corp. Toronto, Canada), 0,22 µm lyukbőségű sterilizáló szűrőegységen (Millex-GX, Millipore Corp., Bedford, MA, USA) kétszer átszűrtek, majd lumbálpunkció útján beadták a CSF-be.

Több páciensen végzett peptidvizsgálatok

A 6F53, 8M41, 4M45 és 1F56 páciens az anti-MBP *in vitro* megkötésére képes MBP75–95 szintetikus peptidet, a 10F36, 13F43, 5M59 és 3M66 páciens pedig összehasonlóként a nem kötő MBP35–58 szintetikus peptidet kapta növekvő, 1, 2,5, 5, illetve 10 mg-os mennyiségben, amint a 6. ábrán látható. A 6F53 páciensnél (6B. ábra), aki 1 mg MBP75–95-öt kapott, az F anti-MBP 75%-kal csökkent, majd rögtön visszatért a kezdeti értékhez; a 8M41 páciensnél (6D. ábra), aki

2,5 mg MBP75–95-öt kapott, az F anti-MBP teljes megkötődését/közömbösítését tapasztaltuk, majd 24 óra múlva érte el ismét a kezdeti értéket; a 4M45 páciensnél (6F. ábra), aki 5 mg MBP75–95-öt kapott, az F anti-MBP hirtelen és teljes mértékű kötődése/közömbösítése következett be, ez 7 napig fennmaradt, és csak a 21 nap múlva vett mintában tért vissza a kezdeti értékhez; az 1F56 páciens (6H. ábra) 10 mg MBP75–95-öt kapott, ami szintén előidézte az F anti-MBP teljes kötődését/közömbösítését, ami 7 napig fennmaradt, és a 14, illetve 28 nap múlva vett mintában tért vissza a kezdeti értékhez. A 10F36, 13F43, 5M59 és 3M66 pácienseknél, akik 1, 2,5, 5, illetve 10 mg-ot kaptak az MBP35–58 nem kötő összehasonlító szintetikus peptidből, a CSF F és B anti-MBP szintje a kísérlet 24 órája folyamán változatlanul megmaradt a magas kezdeti értéken, amint a 6A., 6C., 6E., illetve 6G. ábrán látható. A CSF hagyományos gyulladásjelző paraméterei MS-ben – például sejtszámok, az összes fehérje, az IgG és az albumin szintje, oligoklonális kötegek képződés, IgG-index és IgG-szintézis a központi idegrendszerben – a peptid beadásának hatására nem változtak.

Egy-egy páciensen végzett peptidvizsgálatok

Ezeket a kísérleteket azért végeztük, hogy a páciensek közötti szóródást minimálisra csökkentsük. Az 5M59 páciensnél, aki egyrészt „időkontrollként” szolgált, másrészt 5 mg MBP35–58 nem kötő peptidet kapott, az F anti-MBP-szint mindkét esetben megmaradt a magas kezdeti értéken (7A. ábra). A 4M45 páciens kezdetben „hígítási összehasonlító” volt, majd 2 hónappal később 5 mg MBP75–95-öt kapott. F anti-MBP-szintje a „hígítási” kísérlet folyamán minden mintában végig magas értéken maradt, az MBP75–95 beadása után pedig kimutathatatlaná vált (7B. ábra). Hasonló eredményeket kaptunk az 1F56 páciensnél, akinek F antitestszintje az „időkontroll” kísérlet folyamán mindig magas volt, majd 10 mg MBP75–95 beadása után kimutathatatlaná vált (7C. ábra). A 3M66 páciensen egy összetett kísérletet hajtottunk végre. F anti-MBP-szintje az „időkontroll” kísérlet folyamán, továbbá 10 mg MBP35–58 beadása után is tartósan magas értéken maradt, viszont 10 mg MBP75–95 beinjektálása után az F anti-MBP teljesen neutralizálódott, és 7 napig kimutathatatlan maradt (7D. ábra).

MBP75–95 szintetikus peptid többszöri beadása

Miután megállapítottuk, hogy az MBP75–95 peptid az F anti-MBP-t 7 napnál hosszabb időre közömbösíti *in vivo*, azt az utat választottuk, hogy 10 héten át hetenként egyszer 10 mg MBP75–95-öt oltottunk be a gerincfolyadékba. Ezt a kísérletet 3 különböző krónikus progresszív MS-páciensen végeztük, akik az egyszeri peptidinjekciós projektben nem vettek részt, és erre a kísérletre önként jelentkeztek. Az F és B anti-MBP-szinteket mértük 1-2 héttel az első oltás előtt, mind a 10 injekció előtt és 30 perccel utána, majd az utolsó injekció után 1 hónap elteltével. A 10 injekció előtt vett CSF-minták mindegyikében meghatároztuk a sejtszámokat, az összes fehérje-, glükóz-, IgG- és albumin-

szintet. Az első injekció előtt és az utolsó után vérmin-tát vettünk, ebből mértük az elektrolitokat, kreatinint, szív- és májenzimeket, és elvégeztük a szokásos hematológiai vizsgálatokat.

Mikor a krónikus progresszív MS-ben szenvedő páciensek 10 héten át hetenként egy 10 mg-os MBP75–95 intratekális injekciót kaptak, a kezdetben magas F anti-MBP-szint a kimutathatóság határa alá csökkent, és mindaddig ott maradt, amíg a betegek kapták a peptidet; mikor a peptid beadását megszüntettük, az F anti-MBP-szint 1 hónapon belül visszatért a kezdeti értékhez (8. ábra). A B antitestek titere végig a kísérlet folyamán állandó magas szinten maradt, ami azt mutatja, hogy a betegekben az anti-MBP termelése folytatódott, és a peptid intratekális beadása csak valamilyen „kísérő hatást” fejtett ki az F anti-MBP-re.

A páciensek, akik egyszeri vagy hetenként ismételt szintetikus peptid injekciókat kaptak, előrehaladott neurológiai károsodással járó krónikus progresszív sclerosis multiplexben szenvedtek. Közülük egy sem jelezte a peptid intratekális beadása után neurológiai tüneteinek súlyosbodását vagy az MS fellobbanását, és a CSF-ben sejtválasz nem jött létre. Azokat a pácienseket, akik ismételt MBP75–95 oltásokat kaptak, monitoroztuk szisztémás komplikációk – például elektrolitváltozások, szív-, máj-, vesediszfunkció és hematológiai változások – szempontjából, és semmiféle káros szövdményt vagy káros hatást nem tapasztaltunk.

MBP75–95 intravénás beadása

Miután megállapítottuk, hogy az MBP75–95 peptid intratekális beadva az F anti-MBP-t teljes mértékben megköti/közömbösíti, viszont a B antitestekre egyáltalán nem hat, elhatároztuk, hogy megvizsgáljuk ugyan-ezen peptid intravénás beadásának hatását a CSF szabad és kötött anti-MBP-szintjeire; 500 mg MBP75–95-öt 100 ml normál sóoldatban feloldottunk, 30 perc alatt intravénásan beadtuk a 8M41 páciensnek, és az első két órában 30 percenként, majd 18 óra múlva, azután 10, 16, illetve 30 nap elteltével mértük a CSF-ben az anti-MBP-t. Vért vettünk az injekció előtt, valamint 16 és 30 nap múlva, ebből mértük az elektrolitokat, kreatinint, szív- és májenzimeket, és elvégeztük a szokásos hematológiai vizsgálatokat. A gerincfolyadékban követtük a sejtszámok, valamint az összes fehérje-, glükóz-, IgG- és albuminszint változását. Semmiféle káros hatást nem észleltünk.

A 9. ábrán látható, hogy 500 mg MBP75–95 intravénás beadása az első két órában semmi változást nem okozott a CSF szabad és kötött anti-MBP-szintjeiben. 18 óra múlva a CSF F anti-MBP-szintje 30%-os csökkenést mutatott. A 10, 16, illetve 30 nap elteltével vett CSF-mintákban mind az F, mind a B anti-MBP szintje a kezdeti 11 radioaktivitási egységről 4, 2, illetve 1 egységre csökkent.

Többszörösen tapasztaltuk, hogy minden olyan páciensnél, akit MBP75–95-tel intratekális kezel-tünk, a kötött antitestek szintje magas maradt, míg az F anti-MBP dózisfüggő módon kimutathatatlan szintre

csökkent. Ez azt mutatja, hogy az MBP75–95 intratekális beadása után az MBP elleni autoantitestek termelődése aktív maradt. Ezen megfigyelés alapján MBP75–95-öt adtunk be intravénásan egy olyan páciensnek, aki előzőleg egy egyszeri intratekális injekciót kapott ebből a peptidből. Az intravénás beadás után 1 hónapig terjedő időszak alatt a CSF-ben az F és B anti-MBP-szint egyaránt jelentős mértékben csökkent. Abból, hogy a CSF-ben az MBP75–95 intravénás beadása után az F és B anti-MBP-szint is csökkent, arra következtethetünk, hogy ez a beadási mód gátolja azt az autoimmun gyulladásos folyamatot, amely az anti-MBP termeléséért felelős. Egy jelenleg is tartó követő vizsgálat azt mutatja, hogy az első intravénás injekció után 4–6 hónappal az anti-MBP-szintek emelkedni kezdtek; ugyanezen peptidből egy második (emlékeztető) intravénás injekció körülbelül 70 különböző krónikus progresszív MS-páciensnél 2 évig terjedő csökkenést eredményezett az anti-MBP termelésében.

Az MS anti-MBP-t megkötő epitóp az MBP-ben

Az MS anti-MBP-t megkötő MBP-epitóp helyének további pontosítására CSF-ből és MS agyszövetből affinitáskromatográfiás tisztítással kinyert F és B anti-MBP-t [Warren, K. G. és munkatársai [Ann. Neurol. 35, 280–289 (1994)]] egy kompetitív inhibíciós vizsgálatban 41 egymást követő, azonos hosszúságú, a humán MBP 61. és 110. aminosava közötti területet lefedő szintetikus peptiddel reagáltattunk. Minden peptid 10 aminosavból állt, és 9-ben átfedte a vele szomszédos peptidet. A maximális inhibíciót adó egy vagy több peptidet tekintjük az antitestkötő hellyel a legszorosabb kapcsolatban állónak.

Az MS agyszövetből származó tisztított anti-MBP F és B formájára nézve egyaránt négy dekapeptid, éspe-dig az MBP84–93, MBP85–94, MBP86–95 és MBP87–96 adott maximális ($\geq 80\%$) inhibíciót, ami azt mutatja, hogy az MS anti-MBP-t megkötő epitóp az MBP 84. és 96. aminosava között helyezkedik el. A közös aminosavak minimális területe a 87.-től a 93. aminosavig terjed. A B anti-MBP tartománya szűkebb, mint az F antitesteké.

Azt, hogy az anti-MBP antitestek milyen szerepet játszanak az MS demielizáció patogenezisében, még nem ismerjük pontosan, és csak úgy tudjuk meghatározni, hogy az anti-MBP-t *in vivo* változtatjuk, majd megfigyeljük a klinikai és patológiai következményeket. Például egy akut MS visszaesés idején, mikor az F/B antitestarány 1-nél nagyobb, intratekálisan beadhatunk egy olyan peptidet, amelyről tudjuk, hogy az F anti-MBP-t megkötö, és az akut visszaesés klinikai hatásait megszünteti; esetleg a beadást hetenként kell ismételni, míg az enyhülés bekövetkezik. Krónikus progresszív betegségben szenvedő MS-pácienseknél, akiknél járulékosan akut visszaesések lépnek fel, az anti-MBP-t termelő gyulladásos mechanizmus fékezésére a peptid intratekális beadása mellett intravénás beadás is szükséges lehet.

3. példa

Intratekális PMBP86–95 vagy pMBP82–98 megfelelő dózisa akut súlyosbodás esetén

- 5 Az MS súlyosbodásai azzal járnak, hogy az F és B anti-MBP aránya nagyobb, mint 1,0, mert a CSF-ben a szabad antitestek szintje magasabb, mint a kötöttek. Általában 3 hónapig tart, míg a betegség belép a következő javulási/enyhülési fázisba, ezalatt az F anti-MBP-szint fokozatosan csökken, és amikor a biológiai remisszió befejeződik, az F és B anti-MBP általában már nem mutatható ki a CSF-ben.

- 10 Az alábbi példákban szereplő páciensek az MS súlyosbodó/enyhülő vagy súlyosbodó/progresszív szakaszában voltak.

- 15 Itt és a további példákban pMBP86–95-öt vagy pMBP82–98-at alkalmaztunk. A pMBP86–95 normál sóoldatban nagyon gyengén oldódik, mert 4 hidrofíll és 6 hidrofób aminosavat tartalmaz. A pMBP82–98 viszont jól oldódik normál sóoldatban, mert 5 további hidrofíll aminosavmaradék van benne.

- Két páciens vizsgáltunk, hogy meghatározzuk a pMBP86–95 vagy pMBP82–98 megfelelő intratekális dózisát, amely az F anti-MBP mennyiségét azonnal a kimutathatósági szint alá csökkenti. Az egyik páciensnél, aki ataxiás (koordinátatlan) járást és törzsi egyensúlyzavart mutatott, akut súlyosbodás lépett fel. Ez a páciens a roham kezdetén egy egyszeri 10 mg-os intratekális pMBP86–95 injekciót kapott; az F és B anti-MBP-szinteket az injekció előtt, 1 órával utána és a következő három hónapban még ötször mértük. A fenti dózis csak részlegesen szorította le az F anti-MBP-t, és az antitestgörbe visszaemelkedése a természetes folyamathoz nagyon hasonló módon ment végbe; a páciensnél továbbra is megmaradt a progresszív spastikus paraparesis (részleges bénulás) és ataxia. Ebből arra következtettünk, hogy egy egyszeri 10 mg-os intratekális pMBP86–95 injekció nem elegendő az F anti-MBP teljes visszaszorításához és a visszaállás természetes sebességének megváltoztatásához.

- 40 A másik páciens, egy akut látóideg-gyulladásban szenvedő 18 éves lány egyszeri 50 mg-os intratekális pMBP86–95 injekciót kapott, és előtte, valamint 30 perccel utána mértük az F és B antitestek szintjét. 30 perccel az injekció után az F antitestek kimutathatlanná váltak. További lumbálpunkciókhoz a páciens nem adta beleegyezését. Így arra a következtetésre jutottunk, hogy legalább 50 mg-os dózis szükséges ahhoz, hogy a CSF-ben az anti-MBP-t legalább 30 percre megkösse és neutralizálja.

4. példa

A beadás gyakorisága és időtartama monoszimptomás relapszusban szenvedő pácienseknél

- 55 Ebben a vizsgálatban azt határoztuk meg, hogy milyen gyakorisággal és mennyi ideig kell a pMBP-t alkalmazni ahhoz, hogy az F antitestek hosszabb időn át alacsony vagy kimutathatatlan szinten maradjanak.
- 60 A négy páciens, akiket ebben a csoportban vizsgál-

tunk, a roham fellépésétől számított egy héten belül kapott szintetikus peptideket.

Az első két páciensnél akut féloldali látóideg-gyulladás rohamok léptek fel. Közülük az egyik (11A. ábra) két 50 mg-os intratekális pMBP86–95 injekciót (it #1 és it #2) kapott 4 hetes időközben. Mindkét injekció után 1 órával az F anti-MBP kimutathatatlanná vált. Az első injekció után 1 héttel az F anti-MBP valamivel magasabb lett, 4 héttel később pedig már erősen megemelkedett. Ekkor a páciens egy második intratekális injekciót (it #2) kapott; az F anti-MBP 30 perc múlva kimutathatatlan lett, de ezután még 24 óráig követték. Az eredményekből arra következtettünk, hogy ez a gyakoriság nem elegendő: a roham első hetében valószínűleg többszöri injektálás szükséges ahhoz, hogy az antitestek elhanyagolható szinten maradjanak.

A második páciens, akinek komplett látóideg-gyulladása volt, a roham első hetében több 50 mg-os intratekális pMBP82–98 kapott: négy napon át naponta egyet (11B. ábra: it #1, it #2, it #3, it #4), majd egy héttel később egy ötödiket (it #5). Ennek a páciensnek az anti-MBP-profilja 7 napig tartós, gyors csökkenést mutatott. Ami még fontosabb: CSF-jében az anti-MBP-szintek 7 hét, illetve 6 hónap múlva is kimutathatatlanok maradtak, és a páciens sem a látóideg-gyulladás visszatérését, sem az MS súlyosbodásának bármilyen más jelét nem tapasztalta. A látóideg-gyulladás következtében fellépő féloldali vakság teljesen mértékben megszűnt.

Ezután ugyanilyen napi 50 mg-os intratekális pMBP82–98 injekciókat adtunk a monoszimptomás relapszus különböző típusaiban szenvedő MS-páciensteknek. A 11C. ábra egy olyan páciens anti-MBP-profilját mutatja, akinek a bal kezében akut pseudoathetosis lépett fel, és a roham második hetében naponta, összesen öt alkalommal kapott 50 mg-os intratekális pMBP82–98 injekciókat (it #1, it #2, it #3, it #4 és it #5). Négy nap múlva az F antitestek szintje kimutathatatlanná vált, és a 11 nappal, illetve egy hónappal később végzett vizsgálatban is így maradt. A páciens tartósan visszanyerte bal kezének működőképességét, így ismét tudott motorkerékpározni és gitározni.

Az utolsó páciensnél a krónikus progresszív MS mellett egy akut bal oldali hemiplégiás (bénulási) roham lépett fel. A beteg 2-3 naponként, összesen négy alkalommal 50 mg-os intratekális pMBP86–95 injekciókat kapott. Minden injekció előtt és 30 perccel utána (11D. ábra, it #1, it #2, it #3 és it #4), majd az első injekció után 10 nappal mértük az anti-MBP-t. A kezdetben magas F anti-MBP-szint 7 nap múlva a kimutathatási határ alá esett, ekkor a páciensnél klinikailag és biokémiaileg visszatért az eredeti krónikus progresszív állapot, és nem sokkal ezután egy 400 mg-os intravénás pMBP86–95 injekciót kapott. Ez a kötött antitestek szintjét 4 hónapig lenyomta. Viszont az intravénás injekció után 8,5 hónappal végzett lumbálpunkciót követően a betegség mind klinikailag, mind biokémiaileg visszatért az eredeti krónikus progresszív állapothoz.

5. példa

*A beadás gyakorisága és időtartama
poliszimptomás relapszusban szenvedő
pácienseknél*

Ugyanezeket a peptideket injektáltuk olyan páciensekbe, akik a központi idegrendszer több területét érintő poliszimptomás rohamokban szenvedtek. Ez a csoport 3 páciensből állt, egyikük a betegség súlyosbodo/enyhülő, a másik kettő a súlyosbodo/progresszív szakaszban volt.

Az első páciensnél súlyos poliszimptomás fellobbanás jelentkezett. A súlyosbodoás első hetében három 50 mg-os intratekális pMBP86–95 injekciót kapott, az 1., 3. és 7. napon (12. ábra, it #1, it #2 és it #3). Minden injekció előtt és 30 perccel utána mértük az anti-MBP-t. E három injekció beadása után az F anti-MBP majdnem kimutathatatlan szintre csökkent. Egy hónap múlva az F anti-MBP-szint már megemelkedett, 1,5 hónap múlva pedig újból klinikailag aktívva és biokémiaileg igazolhatóvá vált a relapszus. Ekkor a páciens egy második sorozatban újabb négy 50 mg-os intratekális pMBP86–95 injekciót kapott, a súlyosbodoástól számított 45., 48., 49. és 50. napon (it #4, it #5, it #6 és it #7). Az anti-MBP-t mértük minden injekció előtt, 30 perccel utána, és a következő két hónap folyamán még háromszor. Az F anti-MBP-szint legalább 2 hétre ismét lecsökkent, de a páciensnél újabb relapszus lépett fel, és ekkor F anti-MBP-szintje visszatért a kezdeti, relapszus előtti értékhez. A szintetikus peptidet nyilvánvalóan hosszabb ideig kell intratekálisan alkalmazni ahhoz, hogy az F anti-MBP-t hosszabb időn át alacsony/kimutathatatlan szinten tartsuk.

A második páciens súlyosbodo/progresszív MS-ben szenved (13. ábra). Először a progresszív szakaszban (F=B) 500 mg pMBP86–95-öt (IV #1) kapott intravénásan. 1 hónap elteltével mind az F, mind a B antitestek szintje csökkent valamelyest, de 9 héttel az intravénás injekció után poliszimptomás klinikai relapszus lépett fel, ami az F anti-MBP erőteljes megnövekedésével járt. A relapszus 1., 3. és 12. napján egy-egy 50 mg-os intratekális pMBP86–95 injekciót (it #1, it #2 és it #3) kapott, és az első és harmadik injekció előtt, továbbá 30 perccel és 24 órával ezen injekciók után mértük az anti-MBP-szinteket. Az egy hónap múlva végzett vizsgálatnál azt tapasztaltuk, hogy a páciens visszatért a progresszív spasticus paraparesisnek azon klinikai és biokémiai státusába, amelyben kezdetben volt. Két hét múlva kapott egy második 500 mg-os pMBP86–95 intravénás injekciót (IV #2). A következő 26 hónapban figyeltük a CSF F és B anti-MBP-szinteket: ezek mind a mai napig alacsonyabbak maradtak a kiindulási értéknél. A páciens álló- és járóképesége jelentősen javult.

Ebben a csoportban az utolsó MS-páciens először a progresszív fázisban (F=B, 14. ábra) 500 mg pMBP86–95-öt kapott intravénásan (IV #1). A CSF anti-MBP-t mértük 9 nap elteltével, azután 2 hónapig havonta, majd az IV #1 után 4,5 hónappal. Az injekció után az F és B anti-MBP-szintek 2 hónapig alacsonyak maradtak; az IV#1 után 4,5 hónappal a páciens fokozó-

dó gyengeségről panaszkodott, amit klinikailag és biokémiaileg is megerősített, hogy az antitestszintek a krónikus progresszív betegséggel összemérhető értékre emelkedtek. A következő hónapban a páciens kapott egy második 500 mg-os intravénás pMBP86–95 injekciót (IV #2). Annak a CSF-mintának a vizsgálati eredménye, amelyet közvetlenül a második injekció előtt vettünk, egy akut visszaesést jelzett (F>B), és másnap a páciensnél akut kettős látás lépett fel a bal oldali egyenes izom parézise (enyhe bénulása) következtében. Nyilvánvaló, hogy ekkor a páciens egy klinikailag és biokémiaileg akut súlyosbodást élt át, amely az ezt követő 4,5 hónapon át fennmaradt; jellemzői: az állás és járás súlyos egyensúlyzavarai, a lábak gyengesége és kettős látás. Megemelkedett F anti-MBP-szintjének csökkentésére a páciens két sorozat intratekális pMBP82–98 injekciót kapott. Az első sorozatban, amely a súlyosbodás kezdetétől számítva 4,5 hónap elteltével indult, a páciens 5 napon át napi 50 mg pMBP82–98-at kapott (it #1, it #2, it #3, it #4 és it #5), és az egyes injekciók előtt, majd 30 perccel utánuk mért anti-MBP-szintek meglehetősen magasak voltak. Minthogy a relapszus fennmaradt, és a páciens mozgását súlyosan korlátozta, elhatároztuk egy második sorozat indítását, amelyben a peptidet nagyobb dózisban és gyakrabban adjuk be: így a páciens 2 napig (a 19. és 20. napon) naponta kétszer 100 mg pMBP82–98-at kapott (it #6, it #7, it #8 és it #9). Minden injekció előtt és 30 perccel utána mértük az anti-MBP-t. A dózis és a gyakoriság megnövelése után az F anti-MBP elhanyagolható szintre csökkent, és az egy héttel később (a 28. napon) végzett vizsgálatnál a páciens CSF-profilja hasonló lett, mint a betegség lassú progressziója idején (F/B anti-MBP=1,0). Ekkor kapott egy harmadik 500 mg-os intravénás pMBP82–98 injekciót (IV #3), amely már nem csökkentette tovább az anti-MBP termelését.

6. példa

MBP-peptidek intravénás beadása a súlyosbodások megelőzésére

Két súlyosbodó/progresszív MS-páciensnek, akiknél gyakori visszaesések léptek fel, intravénás pMBP86–95, illetve pMBP82–98 injekciókat adunk annak eldöntésére, hogy ezzel a beadási móddal megelőzhető-e a további rohamok.

Az első páciens 4 év alatt évente 2-3 relapszuson esett át, és ezek következtében fokozatosan előrehaladó spasticus paraparesisben szenvedett (15. ábra). Hat hónapos időközökben két intravénás injekciót kapott, az első 400 mg pMBP86–95 (IV #1), a második 400 mg pMBP82–98 (IV #2); havonként végeztük a klinikai megfigyelést és CSF-elemzést. A 15. ábrán az anti-MBP-szintek láthatók 9 hónapon át (lásd a felső bekeretezett területet). Az első intravénás injekció körülbelül 2 hónapra visszaszorította az anti-MBP termelését. Az injekciótól számított harmadik hónapban a páciens klinikai súlyosbodáson esett át – sajnos ekkor nem kaptunk tőle CSF-mintát. A következő 2-3 hónap folyamán, miután a súlyosbodás annyira normalizáló-

dott, hogy a betegség visszatért a krónikus progressziós fázisba, a páciens megkapta a második intravénás injekciót (IV #2). A CSF anti-MBP-szintek ismét lesüllyedtek 2 hónapig, de 3 hónappal a második injekció után a páciens egy újabb relapszuson esett át, ami az F anti-MBP erőteljes megemelkedésével járt. A páciens – hasonló gyakorisággal, mint az előző 4 évben – évente 2-3 relapszuson esett át annak ellenére, hogy egy pMBP86–95 és egy pMBP82–98 intravénás injekciót kapott.

Egy másik páciens (16. ábra) a megelőző 10 évben évente 1–4 akut relapszuson esett át (lásd a felső skálán), súlyosan rokkant, paraplegiás, toléshatárához kötött lett. A 11. évben ismét 4 relapszuson esett át (felső bekeretezett terület) annak ellenére, hogy MBP szintetikus peptideket kapott intratekálisan és intravénásan. Az első visszaesés folyamán, miután az 1. és a 6. napon egy-egy 50 mg-os pMBP86–95 intratekális injekciót (it #1, it #2) kapott, F anti-MBP-szintje erősen lecsökkent; a 6. napon egy 300 mg-os pMBP86–95 intravénás injekciót (IV) is kapott, amely a következő 3 hónapra mind az F, mind a B anti-MBP-szintet lenyomta. Az intravénás injekció után 4 hónappal a páciens egy újabb klinikai relapszuson esett át, amely idővel még rosszabbodott: a CSF antitestek szintje erősen megemelkedett; az intravénás injekció után 6,5 hónappal a páciens 4 napon át egy napi 50 mg pMBP82–98-ból álló injekciósorozatot kapott (it #3, it #4, it #5 és it #6), ezek az F anti-MBP-szintet nem csökkentették, és a klinikai súlyosbodást nem normalizálták.

7. példa

A peptidek különböző beadási módjainak összehasonlítása

Az első vizsgálatokban szintetikus MBP-peptideket adtunk be 8 krónikus progresszív MS-betegnek. A páciensek növekvő, 1 és 10 mg közötti dózisokban, intratekálisan kaptak egy 5 ml sóoldatban oldott kötő MBP75–95 vagy egy nem kötő MBP35–58 peptidet: az a négy beteg, aki először az összehasonlítóként használt nem kötő peptidet (MBP35–58) kapta, később kötő MBP75–95 peptidet kapott.

A CSF-be beadott MBP75–95 injekció átmenetileg közömbösítette az F MBP-specifikus antitesteket; a kötött MBP-autoantitesteket nem befolyásolta. 1 mg peptid hatása 1 óráig, 2,5 mg peptidé 24 óráig, 5–10 mg peptidé 7 napig tartott. Minthogy az intratekális peptidbeadás hatása nem volt teljes (a B anti-MBP-szint magas maradt), és viszonylag rövid ideig tartott, ezt a beadási módot összehasonlítottuk az intravénás injekcióval. Az intratekális beadással szemben egyetlen 500 mg-os intravénás MBP75–95 injekció beadása után 1 hónappal a szabad és kötött MBP antitestek egyaránt kimutathatatlaná váltak, és alacsony szinten maradtak három hónapig, egy emlékeztető injekció után pedig akár 26 hónapig is (17. ábra). Hasonló megfigyeléseket végeztünk eddig körülbelül 70 krónikus progresszív MS-páciensen, akik intravénás injekció alakjában kaptak egy kötő MBP-peptidet, például MBP75–95-öt, pMBP86–95-öt vagy pMBP82–98-at.

500 mg-os dózist (5 mg/testtömeg-kg) választottunk 10–50 ml normál sóoldatban, mert a vér térfogata nagyobb a CSF-énél (15-szörös faktor), és a peptidek a vesén keresztül gyorsan kiürülnek a vérkeringésből; intratekálisan nem adtunk be az intravénás injekcióknak megfelelő dózisokat, mert ilyen térfogatokat nem lehet a CSF-be injektálni. Összefoglalva: az intratekális beadás a vizsgált dózistartományokban ezeknél a pácienseknél csak átmenetileg „söpörte ki” az anti-MBP-t, ezzel szemben az (egy vagy több) intravénás injekció visszaszorította az anti-MBP termelését, és egyetlen intravénás injekció hosszú időn át fennmaradó toleranciát eredményezett.

8. példa

A tolerancia időtartama az MBP-peptid intravénás beadása után

Ezen eredmények alapján vizsgáltuk az MBP-vel szembeni tolerancia kinetikáját eddig körülbelül 70 krónikus progresszív MS-páciensnél, akiket többszöri intravénás MBP75–95, MBP86–95 vagy MBP82–98 injekció beadása után több mint két évig követtünk. A peptideket 5–6 mg/testtömeg-kg dózisban (256–500 mg), 10–50 ml normál sóoldatban intravénásan adtuk be. Az első intravénás peptidbeadás előtt mind a 13 páciens CSF-jében magas volt a szabad és kötött anti-MBP szintje (18. ábra, 3. táblázat). Egy hónappal a peptid beadása után az MBP-specifikus antitestek lényegében kimutathatatlanok lettek, és általában 3–4 hónapig alacsony szinten maradtak; ezután az antitestek mennyisége ismét növekedni kezdett, egyes pácienseknél 8 hónap alatt visszatért a kezdeti értékhez. Az első intravénás injekció (IV #1) után 6–10 hónappal minden páciens kapott egy 275–500 mg-os (5–6 mg/testtömeg-kg) MBP82–98 emlékeztető injekciót 10 ml normál sóoldatban (IV #2). A második injekcióhoz választott hosszabb peptidnek jobb az oldhatósága, így kisebb térfogatban lehetett feloldani és beadni. Ebben a csoportban általában az injekció beadásától számított 6 héten–2 hónapon belül a CSF anti-MBP-szintjei meredeken csökkentek, és hosszabb (26 hónapig terjedő) időn át kimutathatatlanok maradtak. A körülbelül 70 páciensből álló csoportból egy betegnél tüdőembólia és az azt követő antikoaguláns terápia miatt – ami a továbbiakban a lumbálpunkciót lehetetlenné tette – nem tudtuk befejezni a vizsgálatot, egy másikat pedig azért zártunk ki a követésből, mert intravénásan nagy dózisban kapott kortikoszteroidokat. Az emlékeztető injekció után 18–26 hónappal a körülbelül 70 páciensből 63-nál nem voltak mérhetőek az anti-MBP-szintek.

9. példa

Tartós tolerancia a HLA-DR2 haplotípust hordozó pácienseknél

Az MS-páciensek haplotípusait a genom DNS-molekuláris tipizálásával határoztuk meg (3. táblázat). A vizsgálatban 11 páciens vett részt, ezek közül négy hordozta a betegséggel kapcsolatos DR2 haplotípust (DRB1*1501 vagy DRB1*15021); a második intravé-

nás MBP-peptid injekció után egy évvel mind a négyüknél alacsony vagy kimutathatatlan volt az autoantitestek szintje. Az MBP-peptid nagy affinitással kötődik a HLA-DR2-höz, és immunodomináns a HLA-DR2-korlátozott, MBP-specifikus T-sejtekre nézve. A HLA-DR4 (DRB1*0401) és HLA-DR7 (DRB1*0701) megköti a beadott MBP-peptidet; a k(F) páciens által hordozott DR molekulákra (DRB1*0407, DRB1*0801) nem végeztük el a kötési vizsgálatot. A HLA-DR3 (DRB1*03011) nem köti meg az MBP-peptidet; két olyan páciens, akinek a vizsgálat végén magas volt az anti-MBP-szintje, a DRB1*03011 haplotípust hordozta (3. táblázat). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az MBP-vel szembeni tolerancia időtartama a páciens HLA-DR haplotípusától függ. A tolerancia hosszabb ideig fennmaradhat, ha az MBP-specifikus T-sejtekre és B-sejtekre egyaránt toleráltak.

3. táblázat

MS-páciensek HLA-DR haplotípusai

A. Alacsony anti-MBP-szint az IV#2 után 1 évvel

Páciens	HLA-DR haplotípus	Összes anti-MBP (Re)
b(N)	DRB1*1501	4,1
e(N)	DRB1*1501 DRB1*1303	2,5
m(F)	DRB1*1501 DRB1*0101	3,9
l(N)	DRB1*15021 DRB1*0403	3,9
a(F)	DRB1*1401 DRB1*0701	4,1
f(N)	DRB1*0701	2,4
k(F)	DRB1*0407 DRB1*0801	4,5

B. Magas anti-MBP-szint az IV#2 után 1 évvel

Páciens	HLA-DR haplotípus	Összes anti-MBP (Re)
j(F)	DRB1*03011	7,3
h(N)	DRB1*0101 DRB1*0701	9,7
g(N)	DRB1*0101 DRB1*1101	19,1
l(F)	DRB1*0403 DRB1*03011	19,0

összes anti-MBP=szabad anti-MBP+kötött anti-MBP

Re=radioaktivitási egység

A második intravénás peptidinjekció (IV #2) után 1 évvel végzett vizsgálatban részt vevő 11 páciens HLA-DR haplotípusai. Az IV #2 után 1 évvel a DR2 haplotípust (DRB1*1501 vagy DRB1*15021) hordozó 4 páciens mindegyikénél alacsony volt az autoantitestek szintje.

10. példa

A peptid szubkután beadása nem hoz létre toleranciát

A peptid optimális beadási módját a továbbiakban úgy vizsgáltuk, hogy 33 MS-páciensnek szubkután adtunk be egy vagy több, sóoldatban oldott MBP82–98 injekciót. Növekvő mennyiségű (1 és 100 mg közötti) egyszeri szubkután injekciók 26 páciensnél az MBP elleni autoantitestek szintjét a CSF-ben nem befolyásolták

(ezek az adatok nincsenek feltüntetve); ezután nyolcan közülük kaptak egy intravénás peptidinjekciót, és két hónap múlva a CSF-ben az antitestek szintje kimutathatatlanra vált (4A. táblázat). Öt másik páciensnél egy 5 összesen 900–1000 mg-os dózis (öt egymást követő napon át napi 100 mg, majd egy újabb 400 vagy 500 mg-os szubkután injekció) csak mérsékelten csökkentette az anti-MBP-szinteket a CSF-ben (4B. táblá-

zat). Annak eldöntésére, hogy hatásosabb lenne-e egy másféle beadási rendszer, két páciens egy hónapos időközökben két 250 mg-os szubkután injekciót kapott (4C. táblázat). Az autoantitestek szintje itt sem változott. Ezek az eredmények összefoglalva azt mutatják, hogy a vizsgálatunkban alkalmazott peptiddózisok esetén az MBP-peptidek csak intravénásan beadva idéznek elő tartós toleranciát az MBP-vel szemben.

4. táblázat

A.

Páciens azonosítója (neme)	MBP82–98 SC mg	Kezdeti érték		6–7 hét		Eltelt idő (hónap)	Kezdeti érték		MGP (82–98) IV#1 mg	2 hónap		4 hónap	
		f	b	f	b		f	b		f	b	f	b
E(F)	5	9,1		10,2		6	9,3		400	1,0	1,1	1,4	1,0
		11,2		10,4			9,8						
K(F)	7	2,1		3,1		6,5	6,3		500	1,5	0,8		
		3,4		5,9			6,7						
N(F)	10	8,1		7,1		8	6,6		500	3,0			
		8,0		8,1			5,6			3,0*			
Q(F)	40	9,9		10,9			10,0		400	1,5	1,6	2,1	2,1
		10,1		8,3			9,3						
R(F)	50	10,2		11,1		6	7,5		500	1,5	1,6	1,5	1,7
		10,3		7,4			9,9						
S(F)	60	4,1		6,1		6,5	7,4		500	1,8	0,9		
		4,3		5,4			7,4						
X(F)	100	9,9		9,5		4,5	9,7		500	1,4	1,0	1,5	1,1
		7,3		8,2			9,0						
Z(F)	100	9,9		10,9		4,5	10,5		500	2,0	1,9	1,5	1,6
		8,4		10,1			9,7						
Középérték-szórás		7,9		8,6			8,4			1,7	1,5	1,6	1,5
		7,9		8,0			8,4						
		2,9		2,7			1,5			0,6	0,7	0,3	0,4
		2,6		1,7			1,5						

B.

Páciens azonosítója (neme)	MBP82–98 SC mg/nap	Kezdeti érték		6–7 hét		Eltelt idő (hónap)	MBP82–98 SC mg	7 hét	
		f	b	f	b			f	b
AA(N)	100×5	7,7		4,4		0,5	400	4,3	
		8,1		4,9				3,4	
BB(N)	100×5	5,4		3,5		0,5	500	2,0	
		5,4		3,7				2,5	
CC(F)	100×5	5,9		6,9		–	–		
		5,4		8,8					
DD(N)	100×5	4,6		2,7		0,5	500	3,0	
		4,8		1,9				2,8	

4. táblázat (folytatás)

Páciens azonosítója (neme)	MBP82–98 SC mg/nap	Kezdeti érték		6–7 hét	Eltelt idő (hónap)	MBP82–98 SC mg	7 hét	
		f	b	f			f	b
EE(N)	100×5	7,4		3,7	0,5	400	2,6	
		8,9		3,9			2,4	
Középértékszórás		6,2		4,2			3,0	
		6,5		4,6			2,9	
		1,2		1,4			0,8	
		1,7		2,3			0,7	

C.

Páciens azonosítója (neme)	MBP82–98 SC mg/hónap	Kezdeti érték		15 hét	
		f	b	f	b
GG	100×5	8,4		7,1	
(F)		8,7		8,3	
FF(N)	100×5	4,8		5,4	
		5,3		4,2	

A. Nyolc páciens egyszeri szubkután MBP82–98 injekciót kapott (5–100 mg 1–5 ml sóoldatban), ez egyáltalán nem hatott az MBP-autoantitest-szintekre. Ezzel szemben az ugyanezen peptidből 4,5–8 hónappal később beadott egyszeri 400–500 mg-os intravénás injekció hatására az antitestek szintje a CSF-ben kimutathatatlanná vált.

B. Nagy dózisú MBP82–98 szubkután injekciók többszöri beadása (100 mg/nap 5 egymást követő napon) némi hatást fejtett ki a CSF anti-MBP-szintekre; egy további nagy MBP82–98 dózis (400 vagy 500 mg) – amelyet az első injekcióorozat után két héttel szubkután adtunk be – már nem csökkentette tovább az autoantitestek szintjét.

C. Egy hónapos időközökben beadott két nagy dózisú (250 mg-os) MBP82–98 szubkután injekció semmiféle hatást nem fejtett ki a CSF MBP-autoantitest-szintjeire.

Az eredmények összefoglalva azt mutatják, hogy az MBP-vel szembeni tolerancia létrehozásában csak az intravénás beadási mód hatásos.

A találmány előnyös megvalósításaiban a szakember számára nyilvánvaló módon sokféle olyan módosítás hajtható végre, amelyek nem sértik a találmány szellemét és a mellékelt igénypontokban meghatározott oltalmi kört.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Az

Asp-Glu-Asn-Pro-Val-Val-His-Phe-Phe-Lys-Asn-Ile-Val-Thr-Pro-Arg-Thr képletű peptid alkalmazása HLA-DR2 haplotípust hordozó páciensek esetében sclerosis multiplex kezelésére szolgáló gyógyszerkészítmény előállítására.

2. Az 1. igénypont szerint alkalmazás az 1. igénypont szerinti peptidet valamilyen gyógyászati lag alkalmazható hordozóanyag mellett tartalmazó gyógyszerkészítmény előállítására.

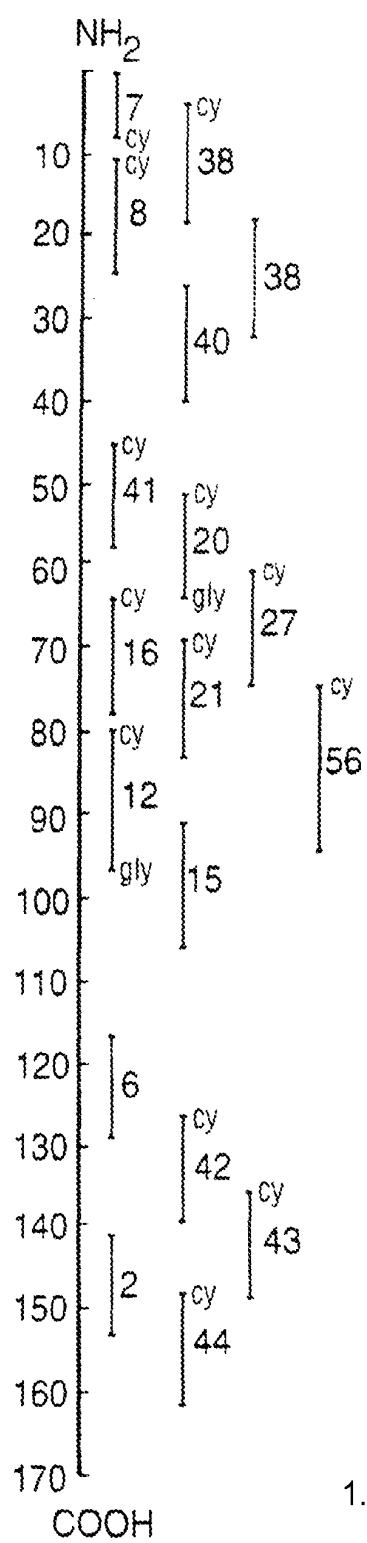
3. Az előző igénypontok szerinti alkalmazás intravénás, intratekális vagy e két módszer kombinálása szerinti beadásra szolgáló gyógyszerkészítmény előállítására.

4. Az előző igénypontok szerinti alkalmazás intravénás beadás esetén egységdózisonként 1 mg/testtömeg-kg és 10 mg/testtömeg-kg közötti 1. igénypont szerinti peptidet tartalmazó gyógyszerkészítmény előállítására.

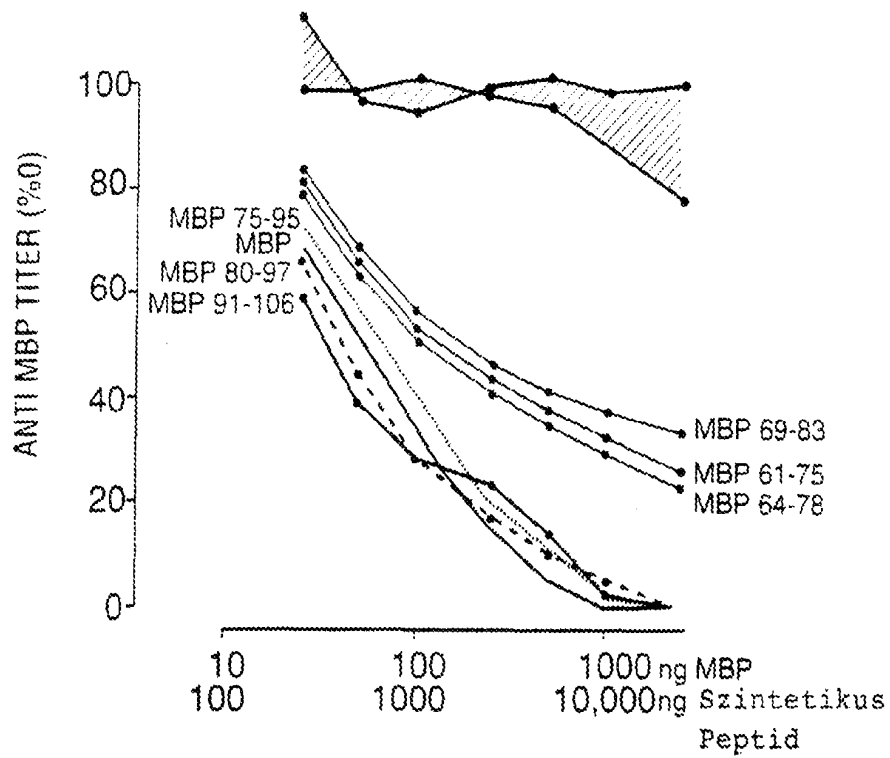
5. A 4. igénypont szerinti alkalmazás intratekális beadás esetén egységdózisonként 1 mg/testtömeg-kg és 100 mg/testtömeg-kg közötti 1. igénypont szerinti peptidet tartalmazó gyógyszerkészítmény előállítására.

6. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás HLA-DR2 haplotípusként DRB1*1501 vagy DRB1* 15021 haplotípust hordozó páciensek kezelésére szolgáló gyógyszerkészítmény előállítására.

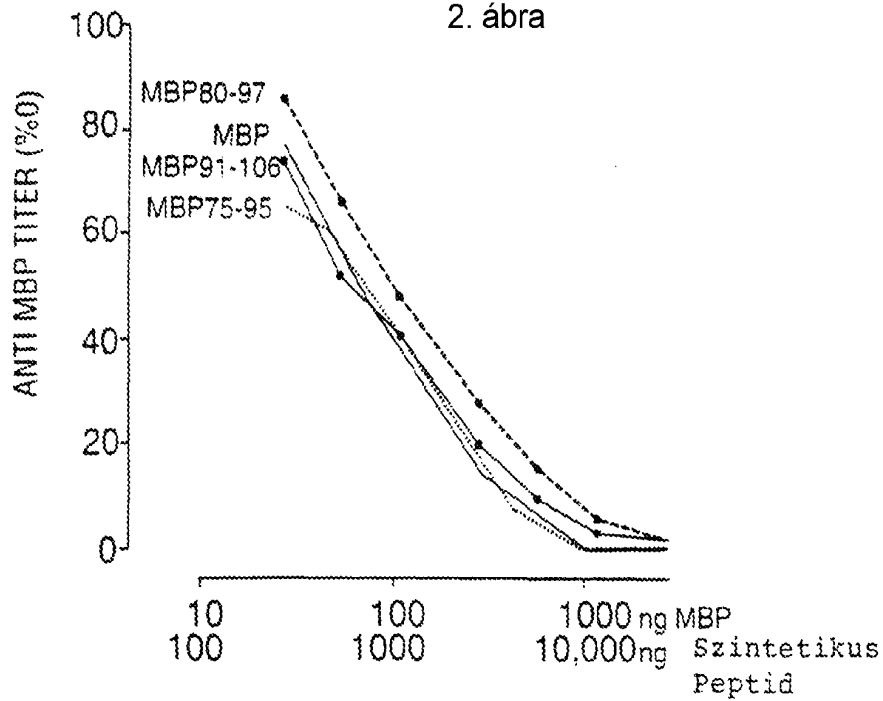
7. A 6. igénypont szerinti alkalmazás krónikus progresszív sclerosis multiplex kezelésére szolgáló gyógyszerkészítmény előállítására.



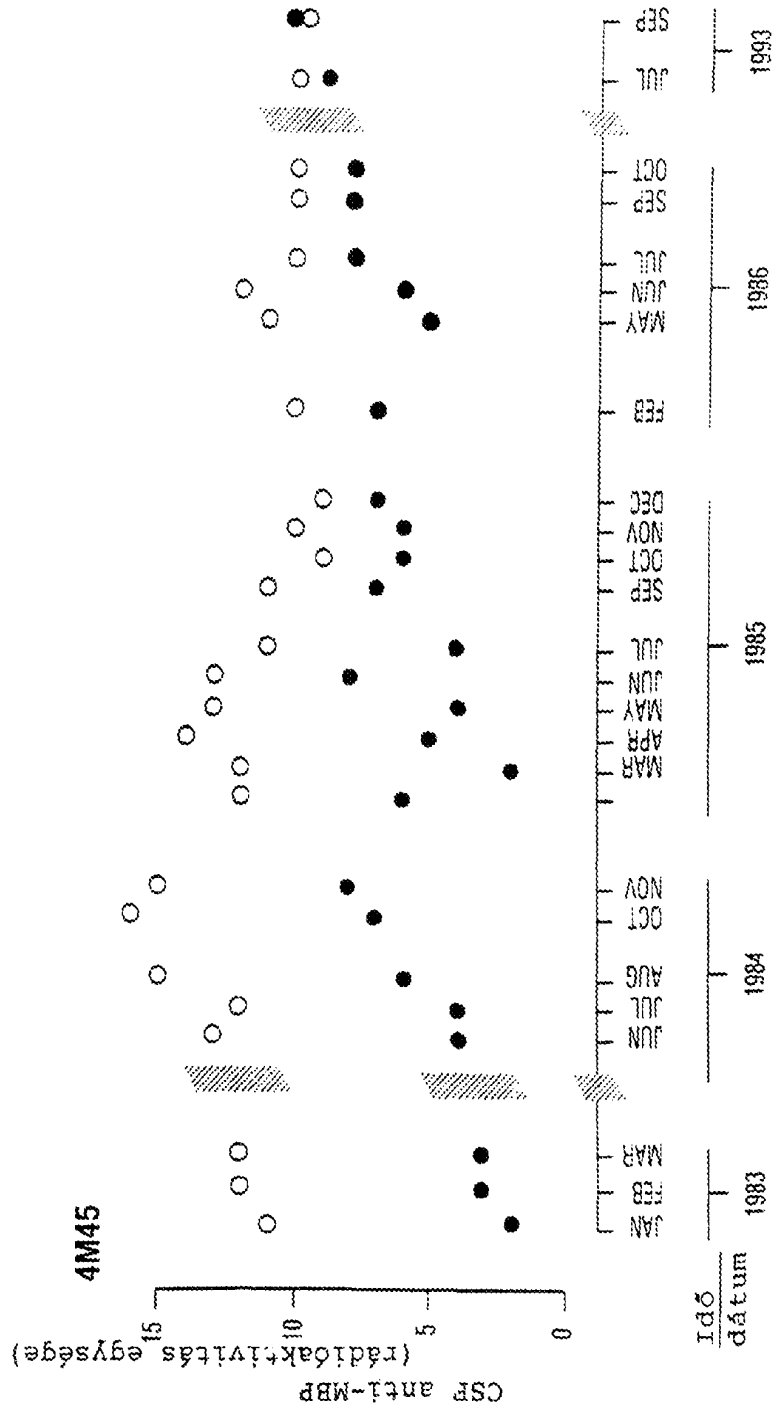
1. ábra



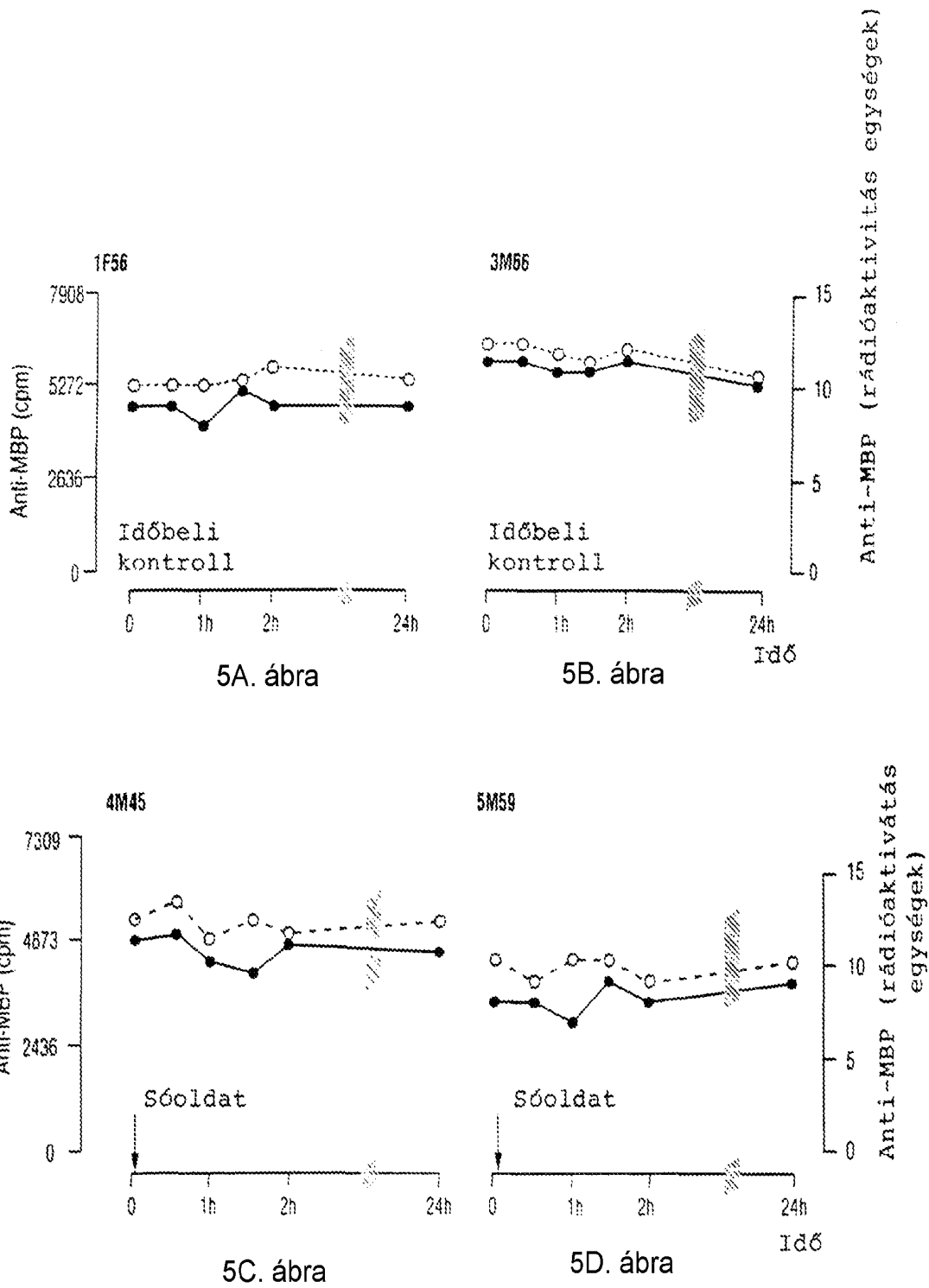
2. ábra

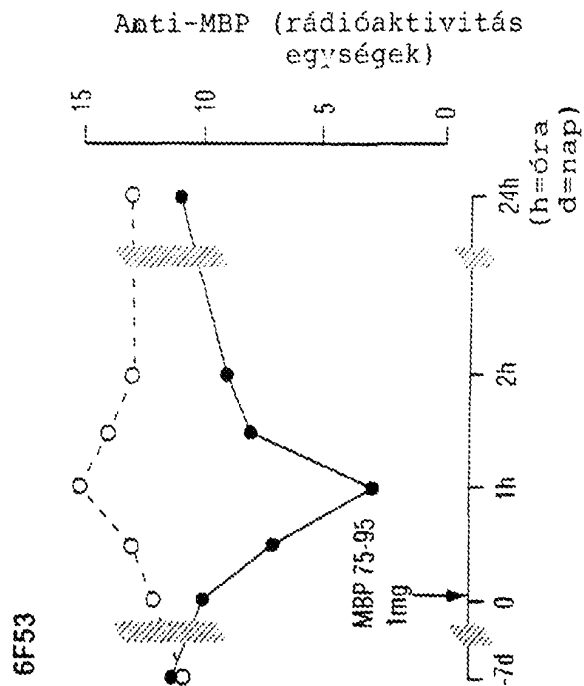


3. ábra

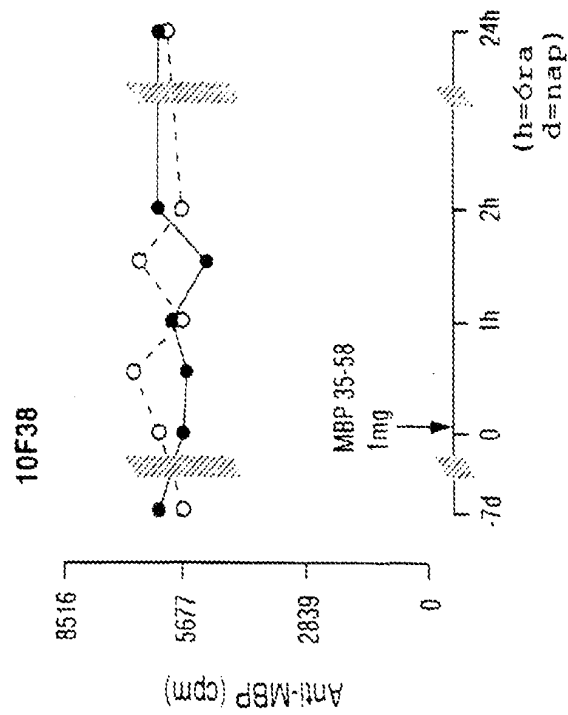


4. ábra

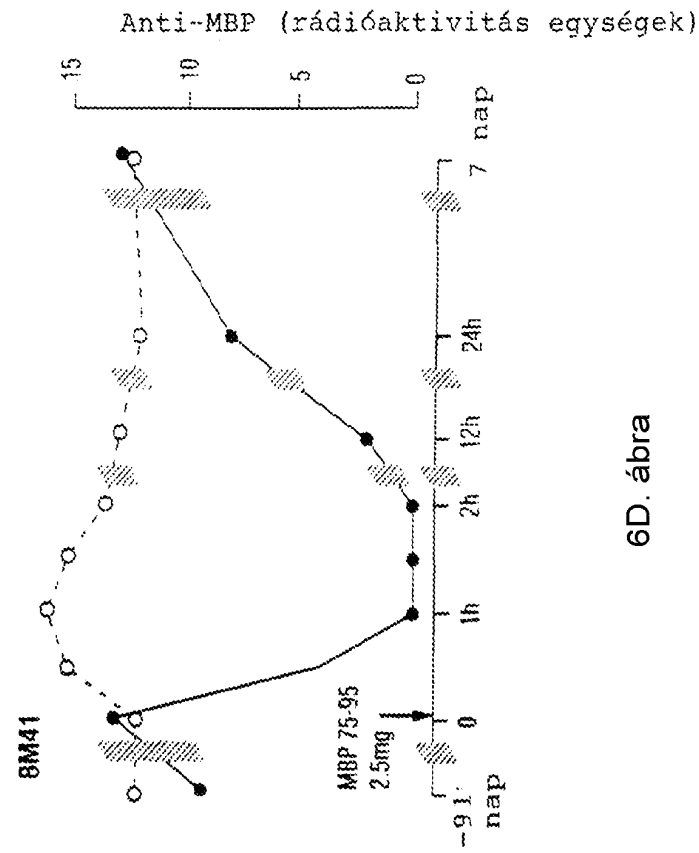




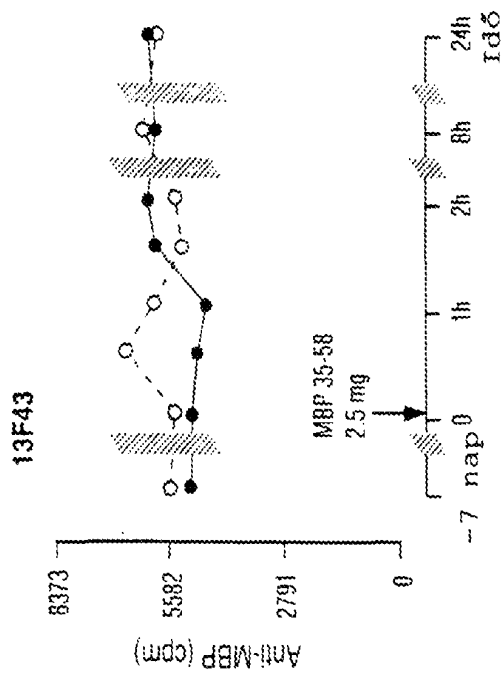
6B. ábra



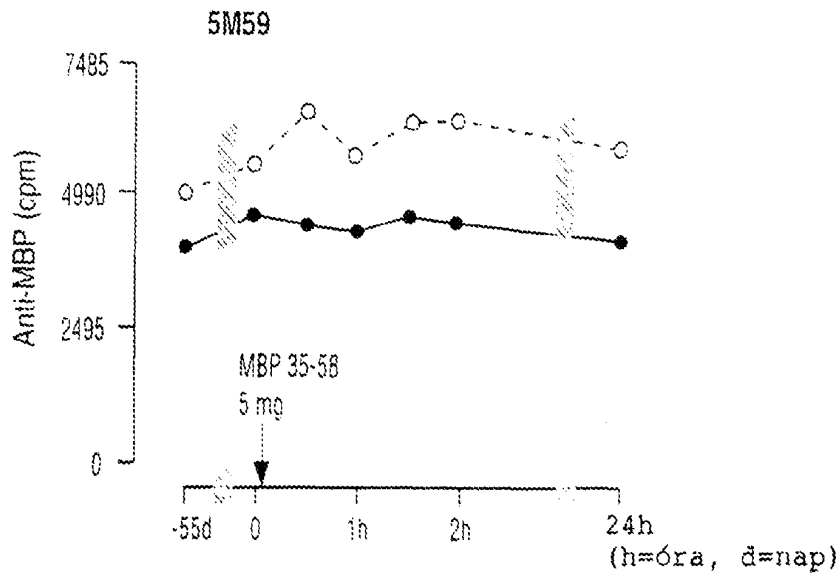
6A. ábra



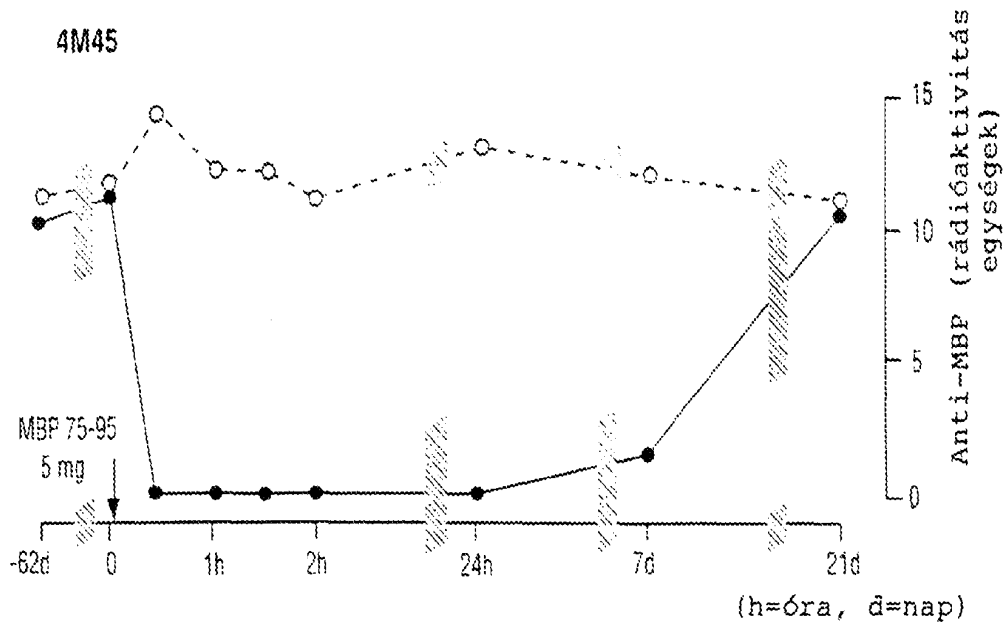
6D. ábra



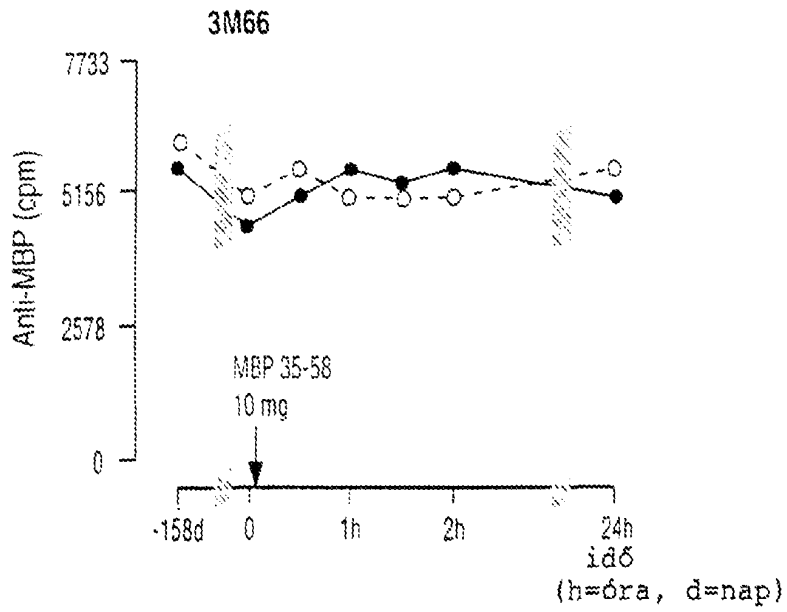
6C. ábra



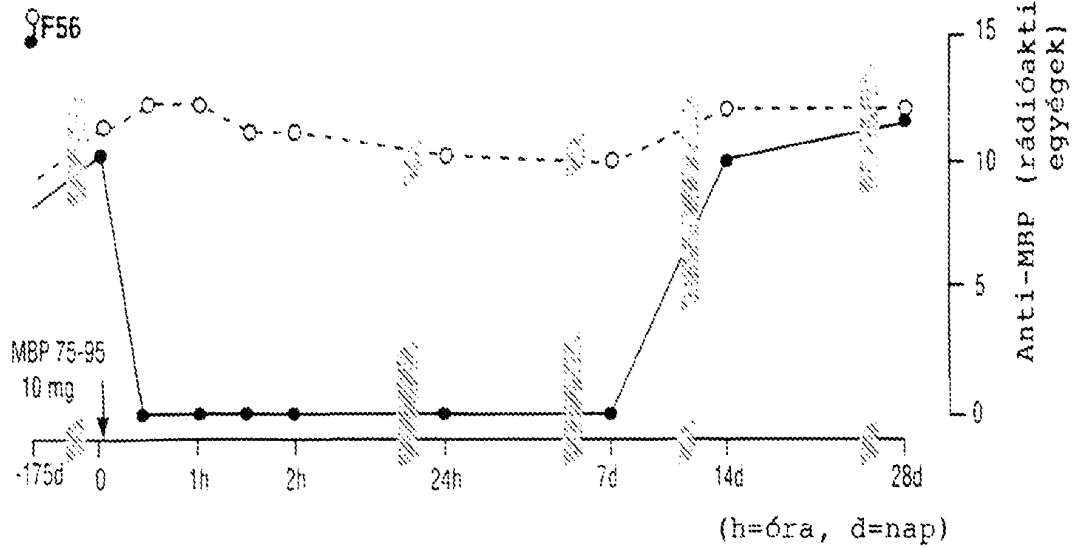
6E. ábra



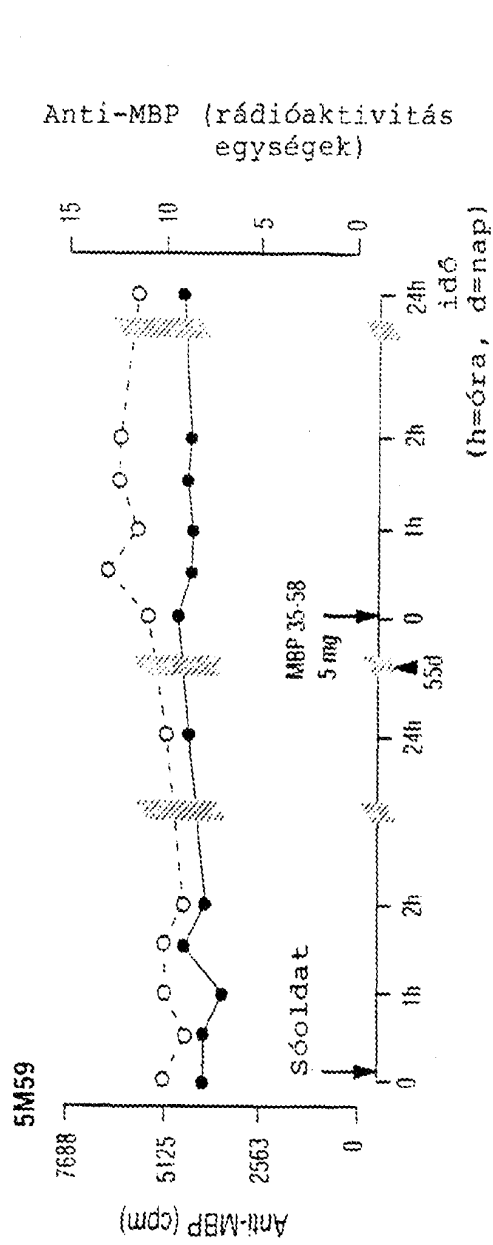
6F. ábra



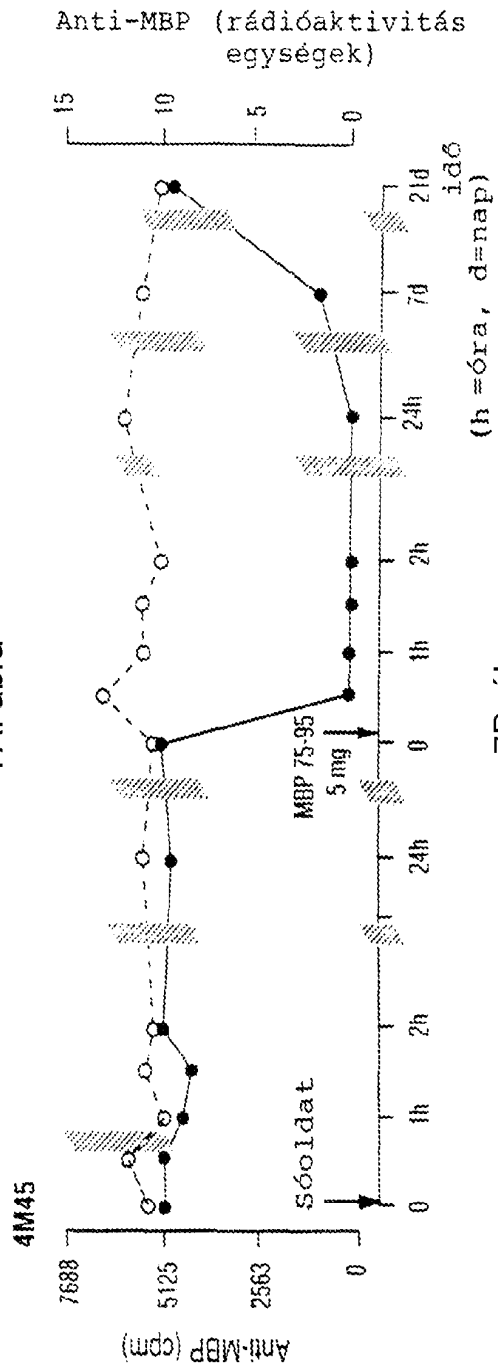
6G. ábra



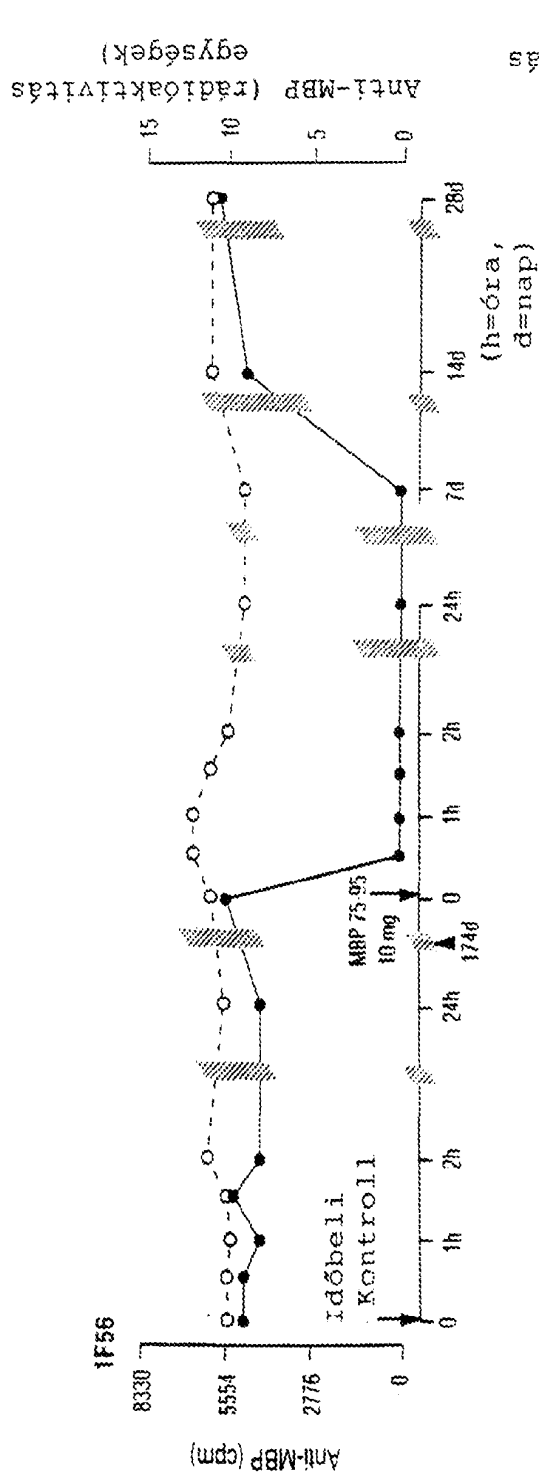
6H. ábra



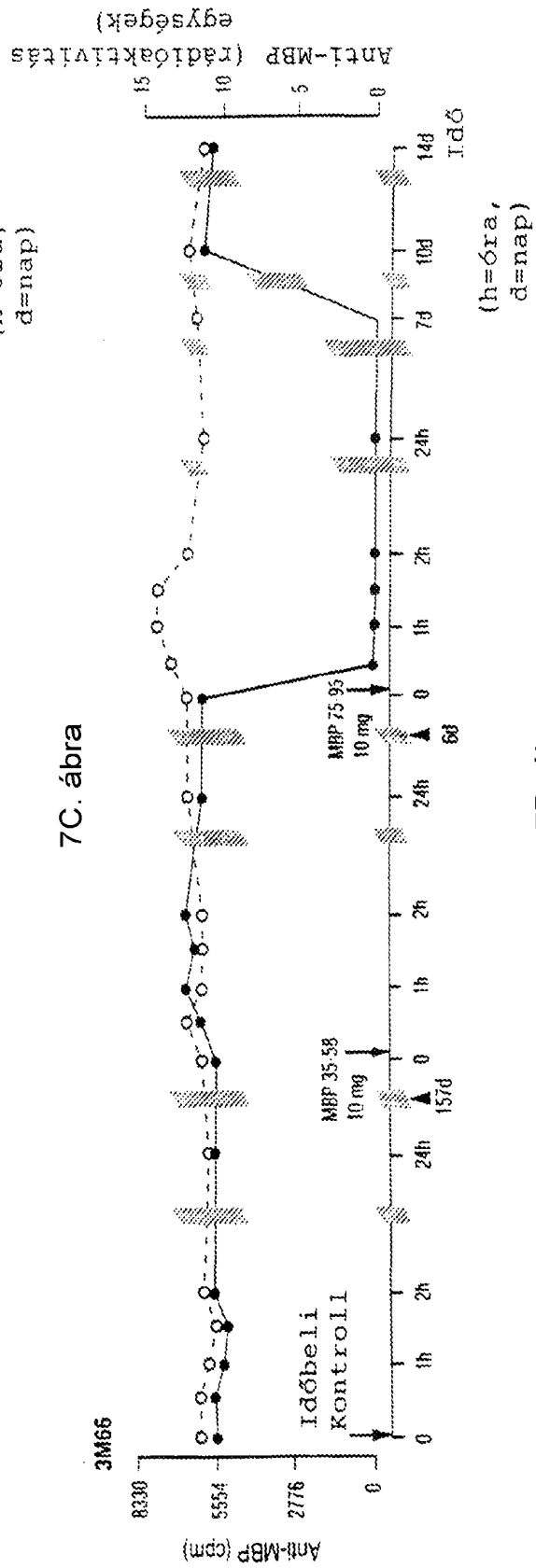
7A. ábra



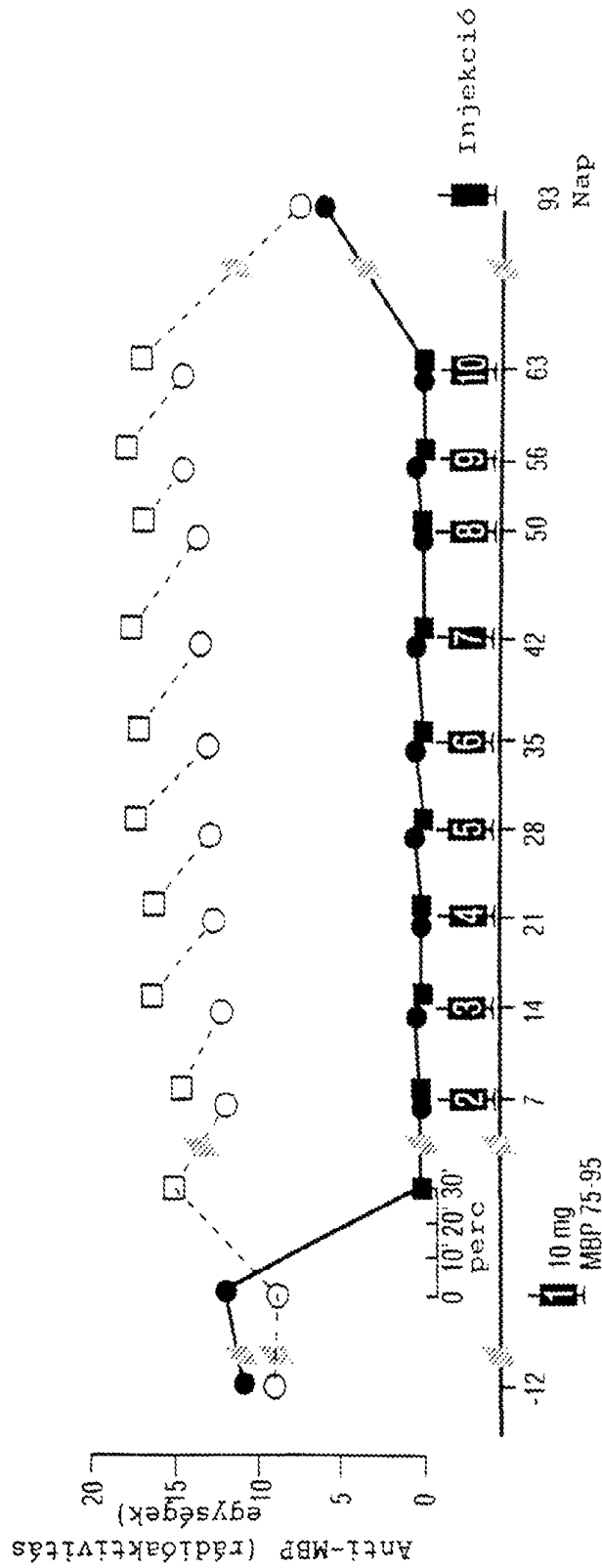
7B. ábra



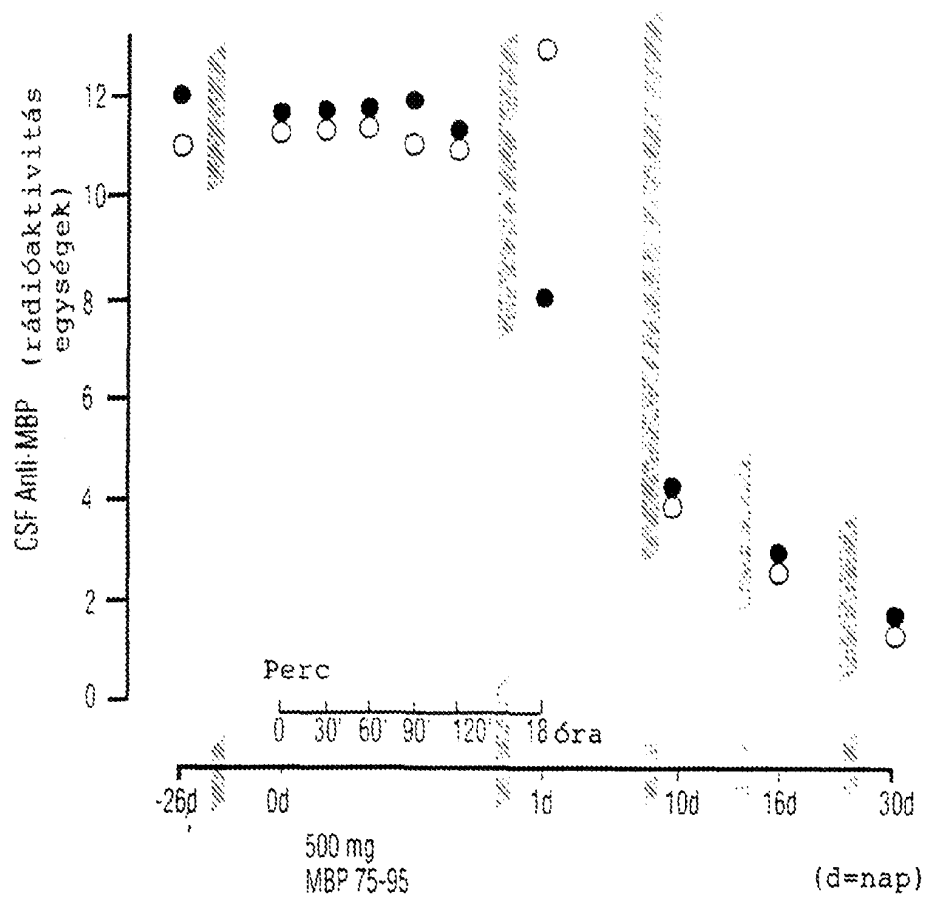
7C. ábra



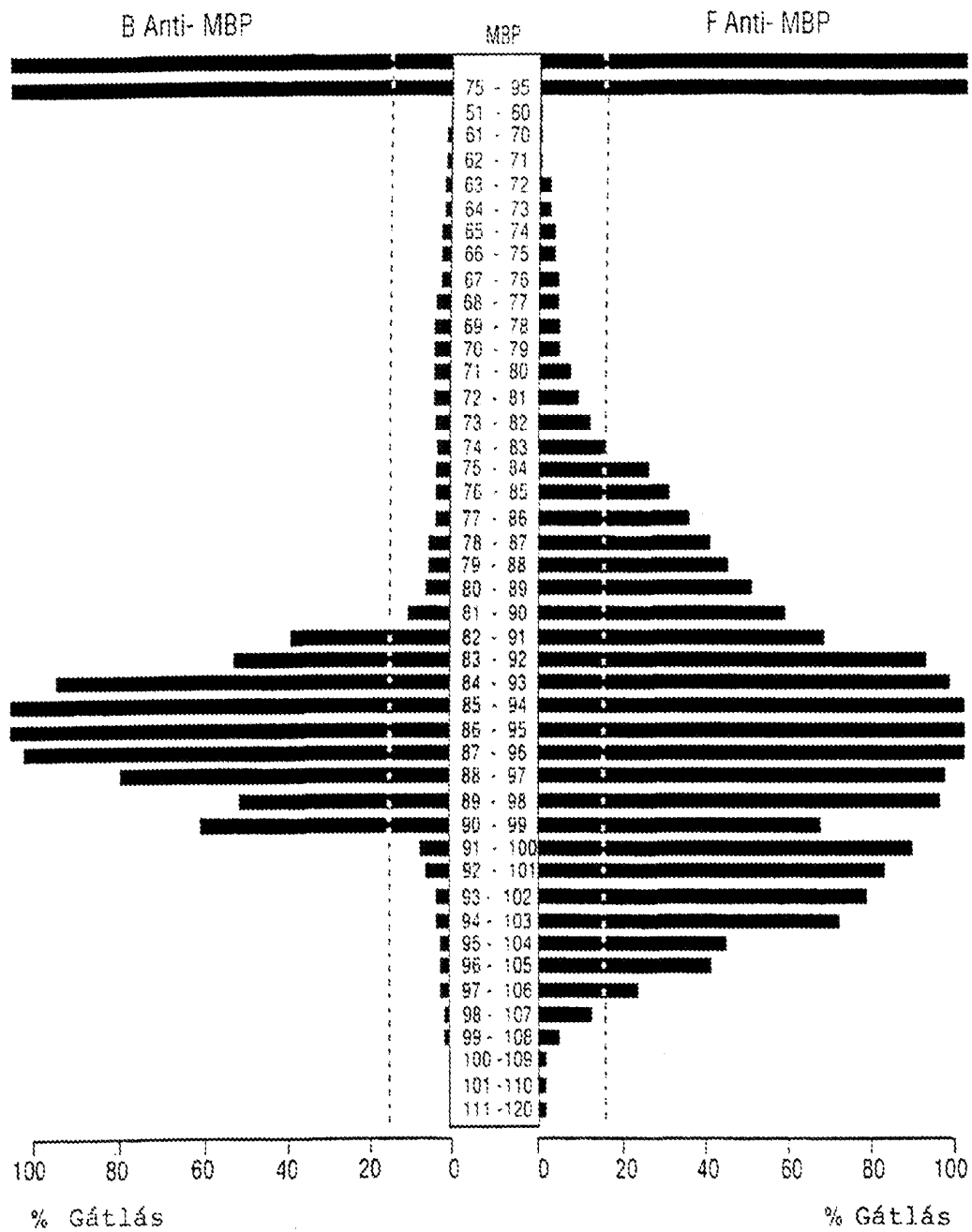
7D. ábra



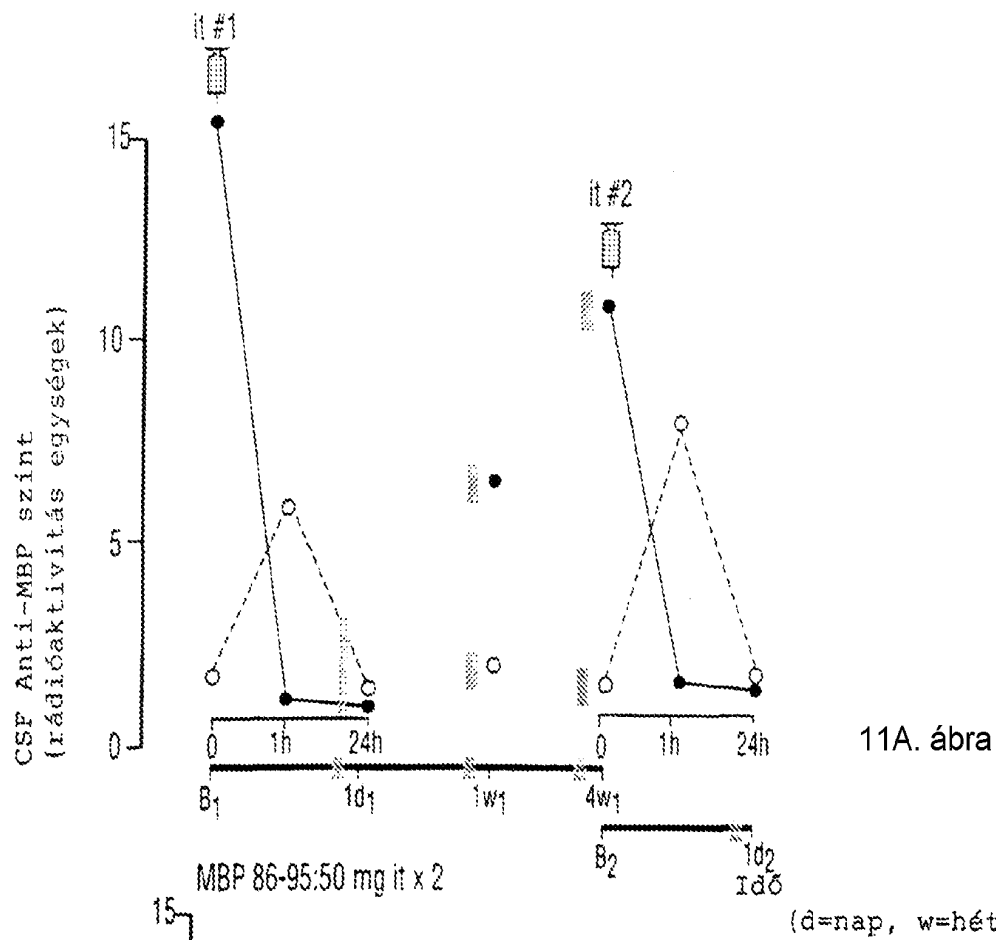
8. ábra



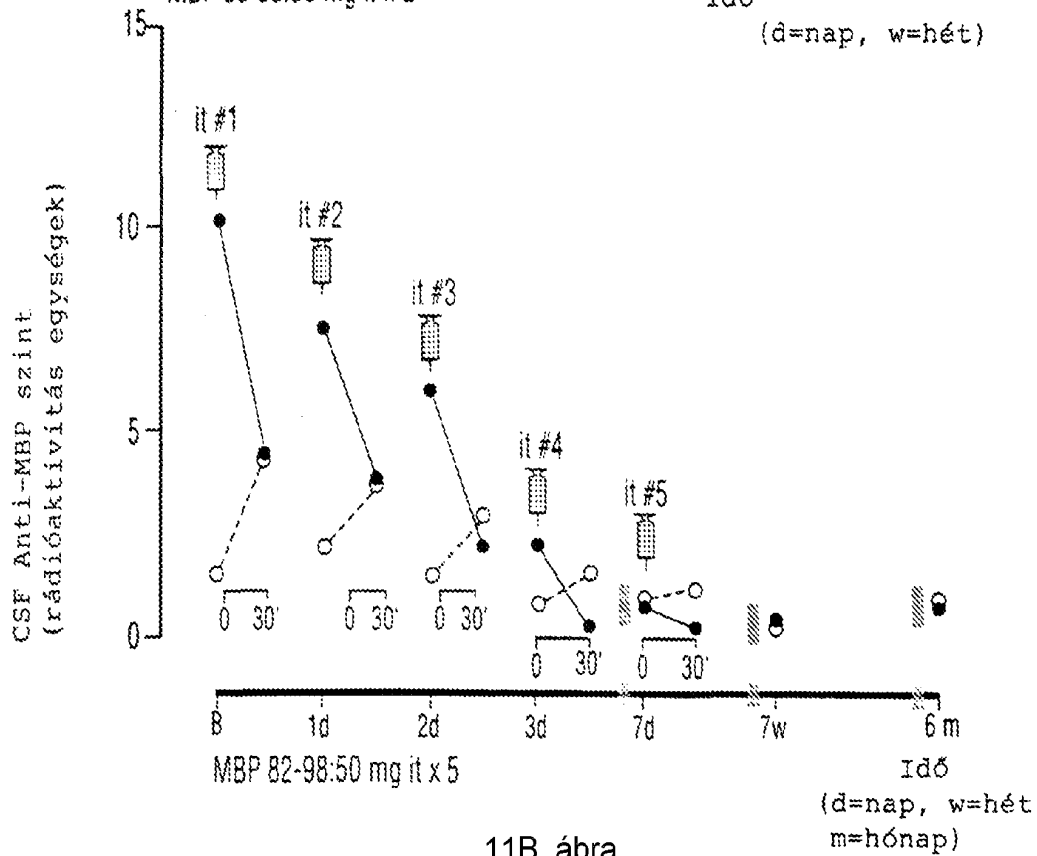
9. ábra



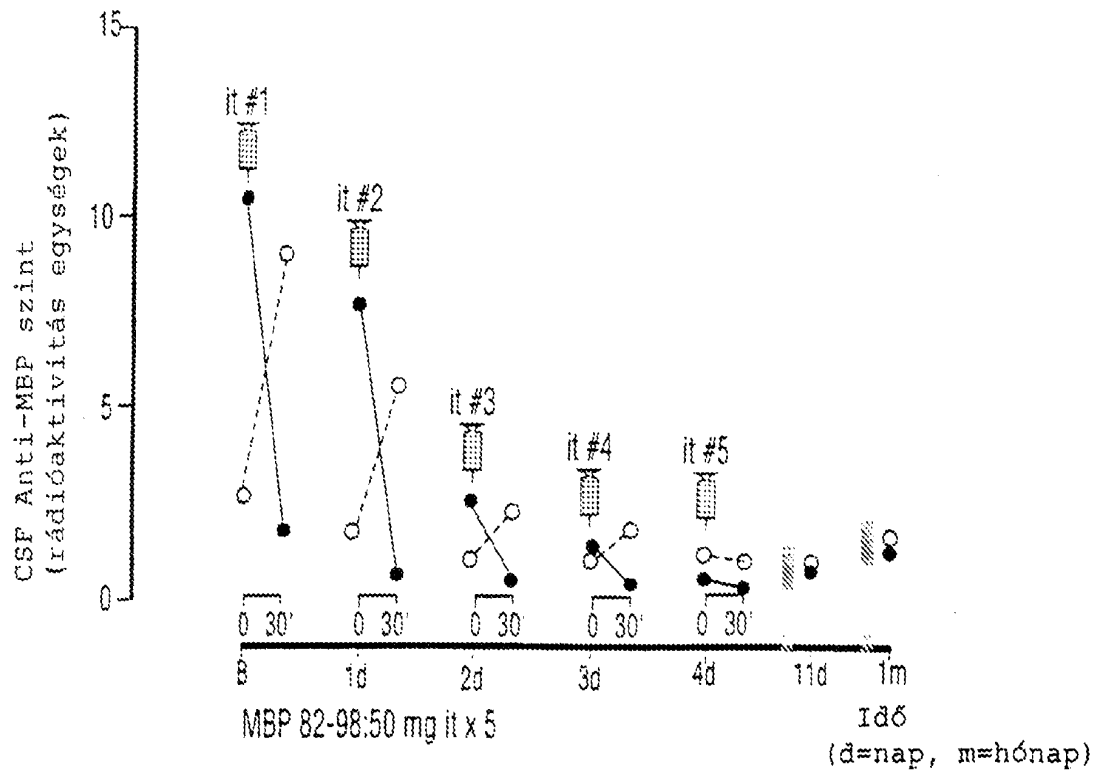
10. ábra



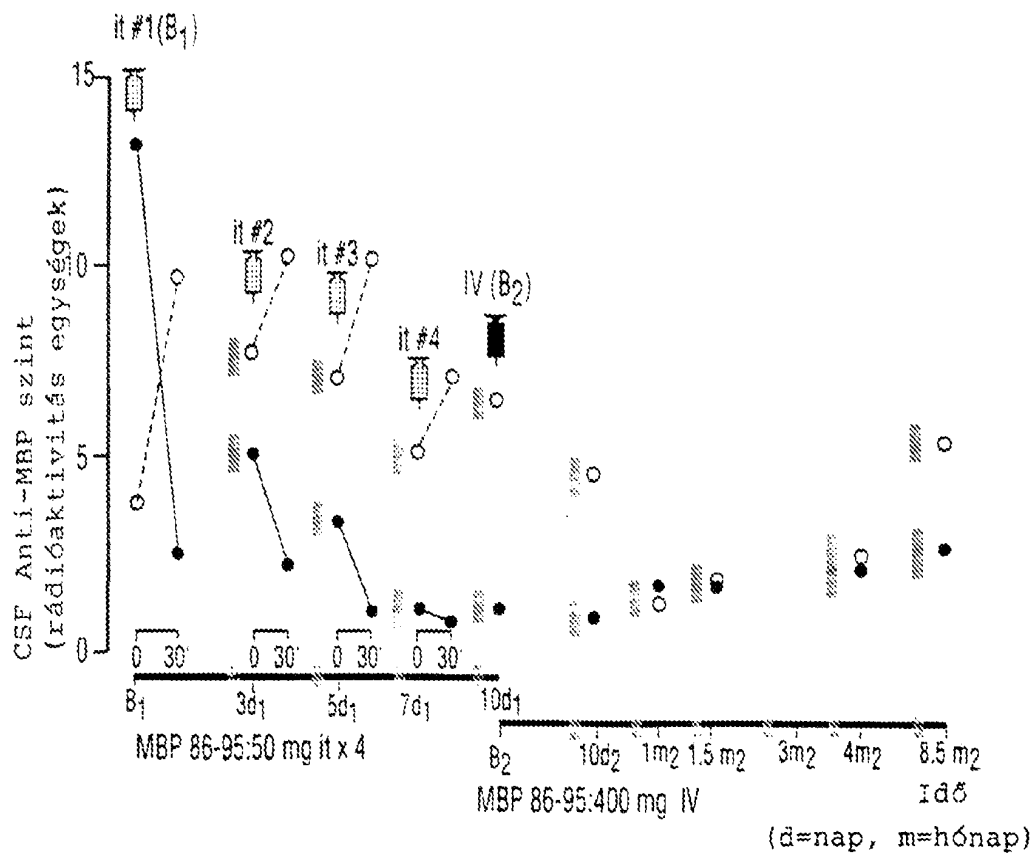
11A. ábra



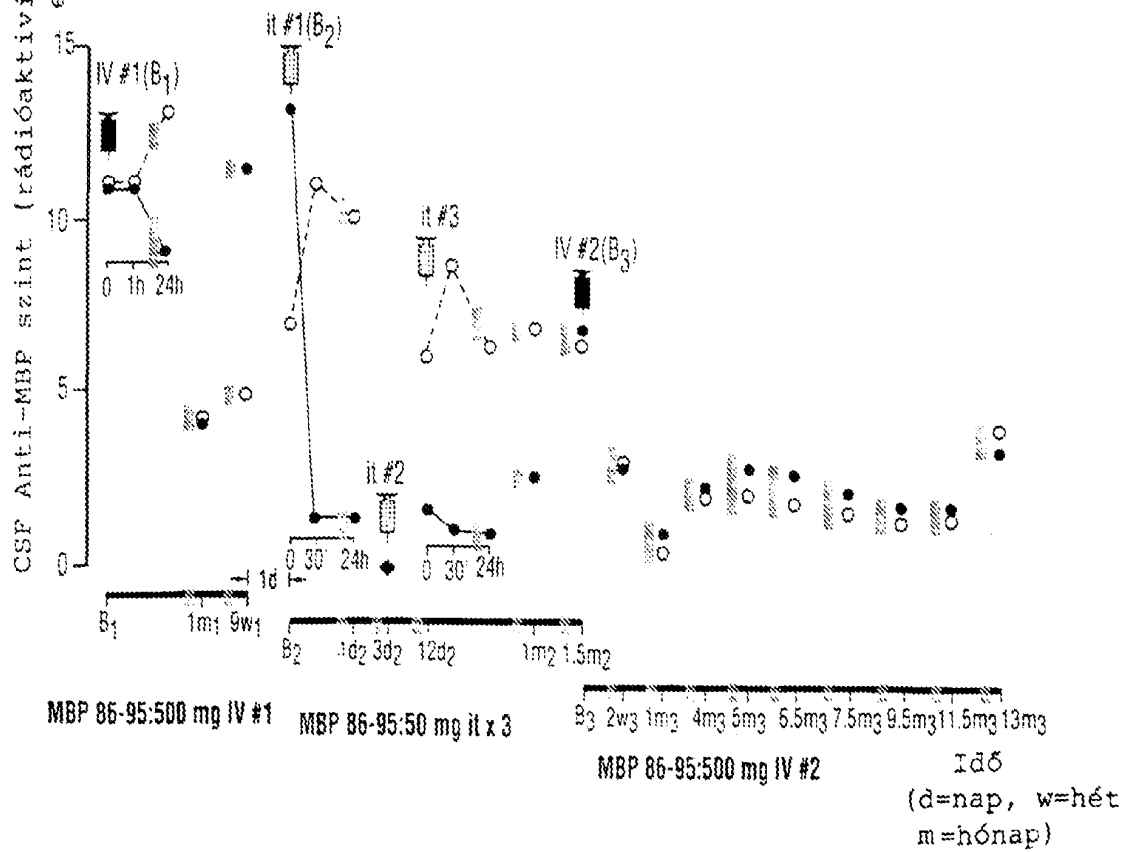
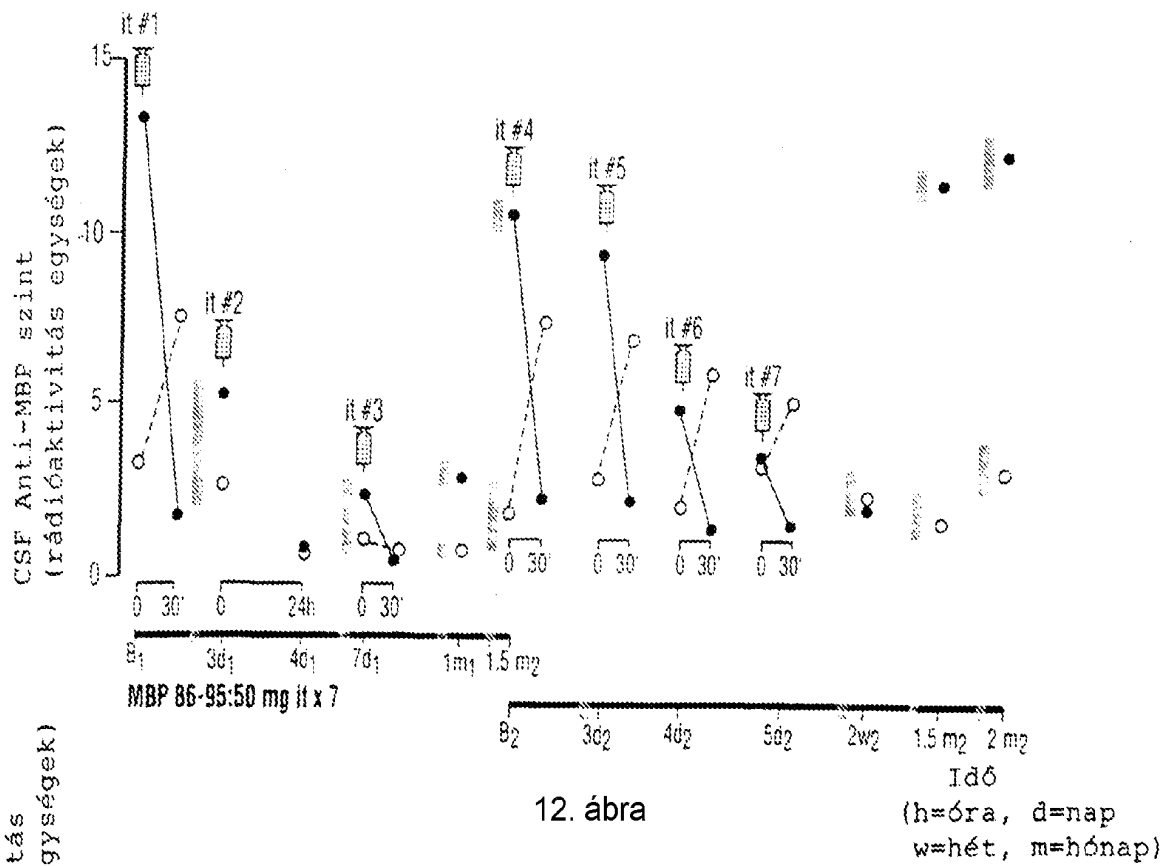
11B. ábra

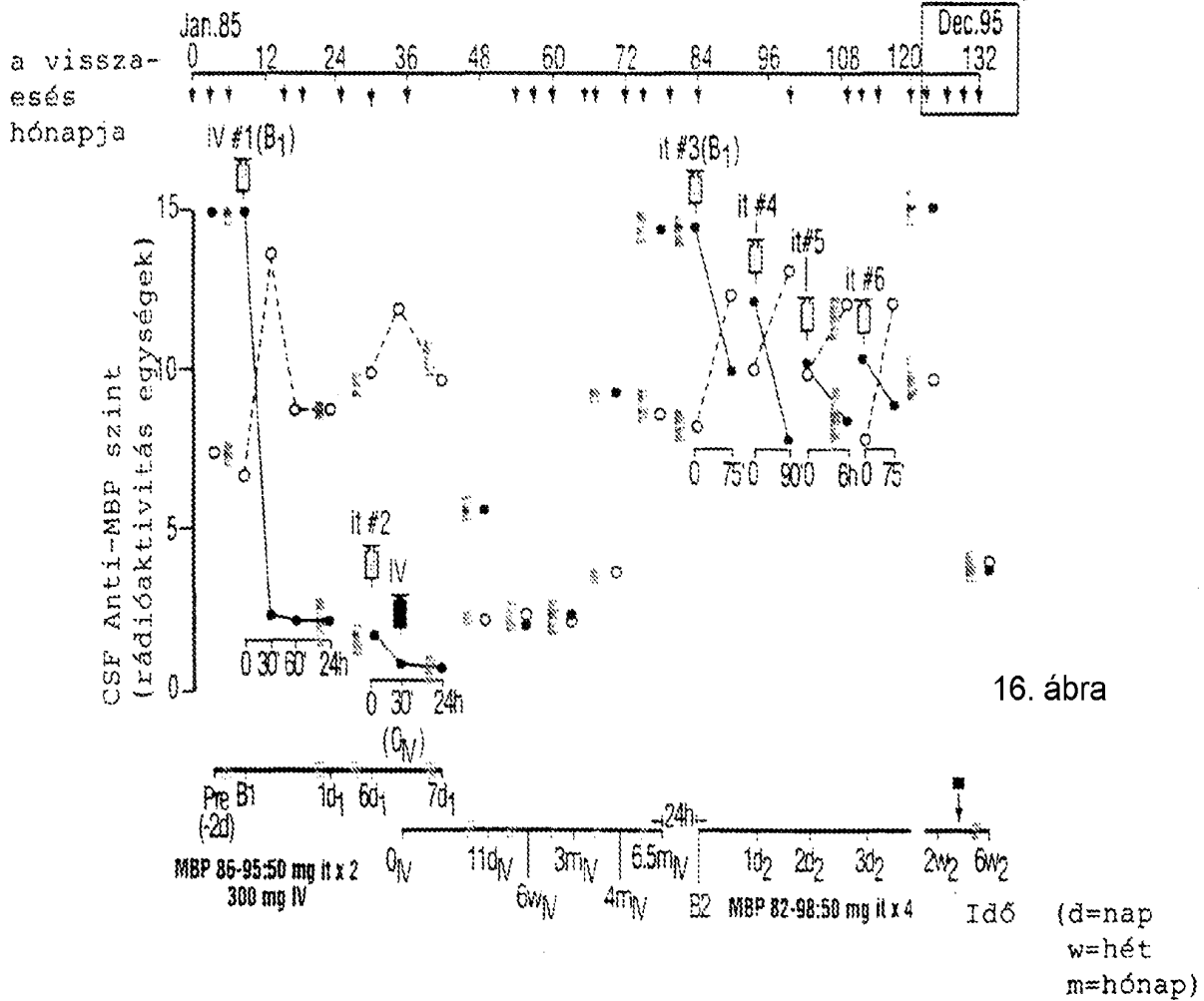
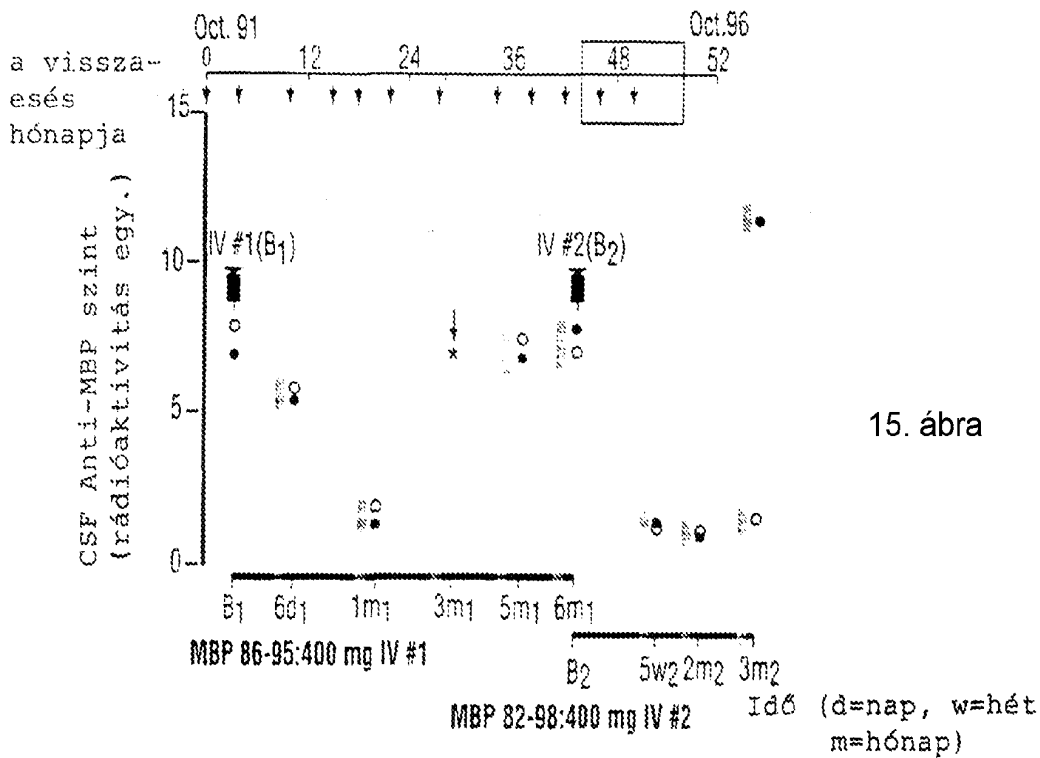


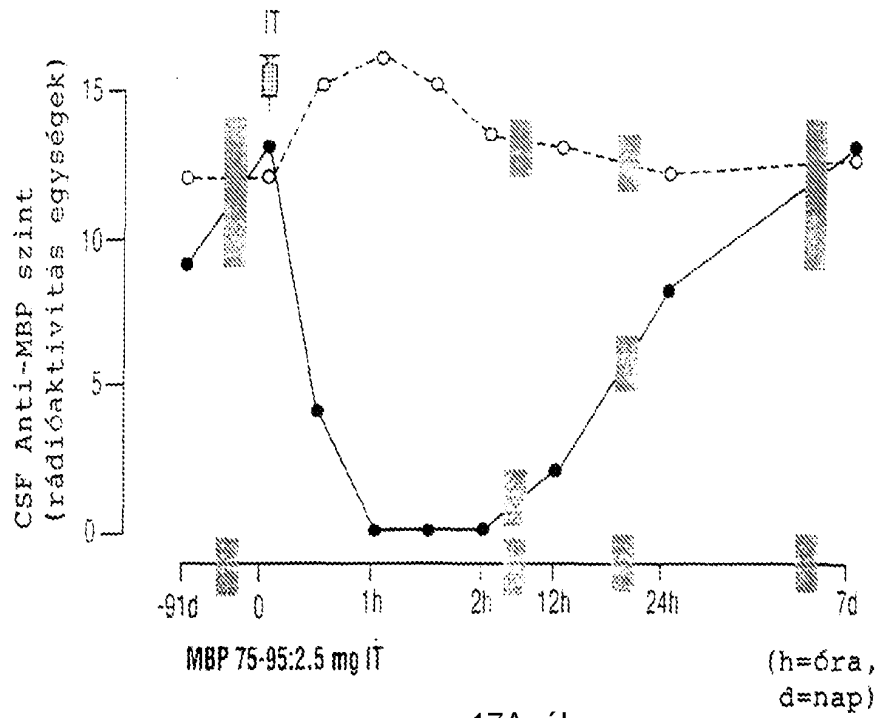
11C. ábra



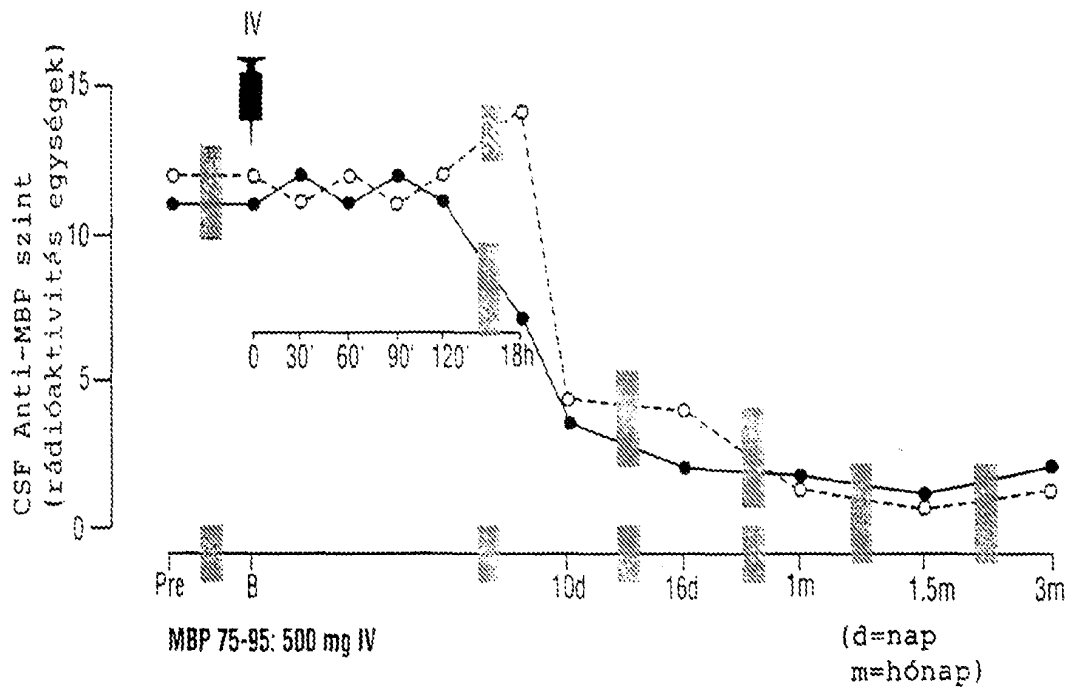
11D. ábra



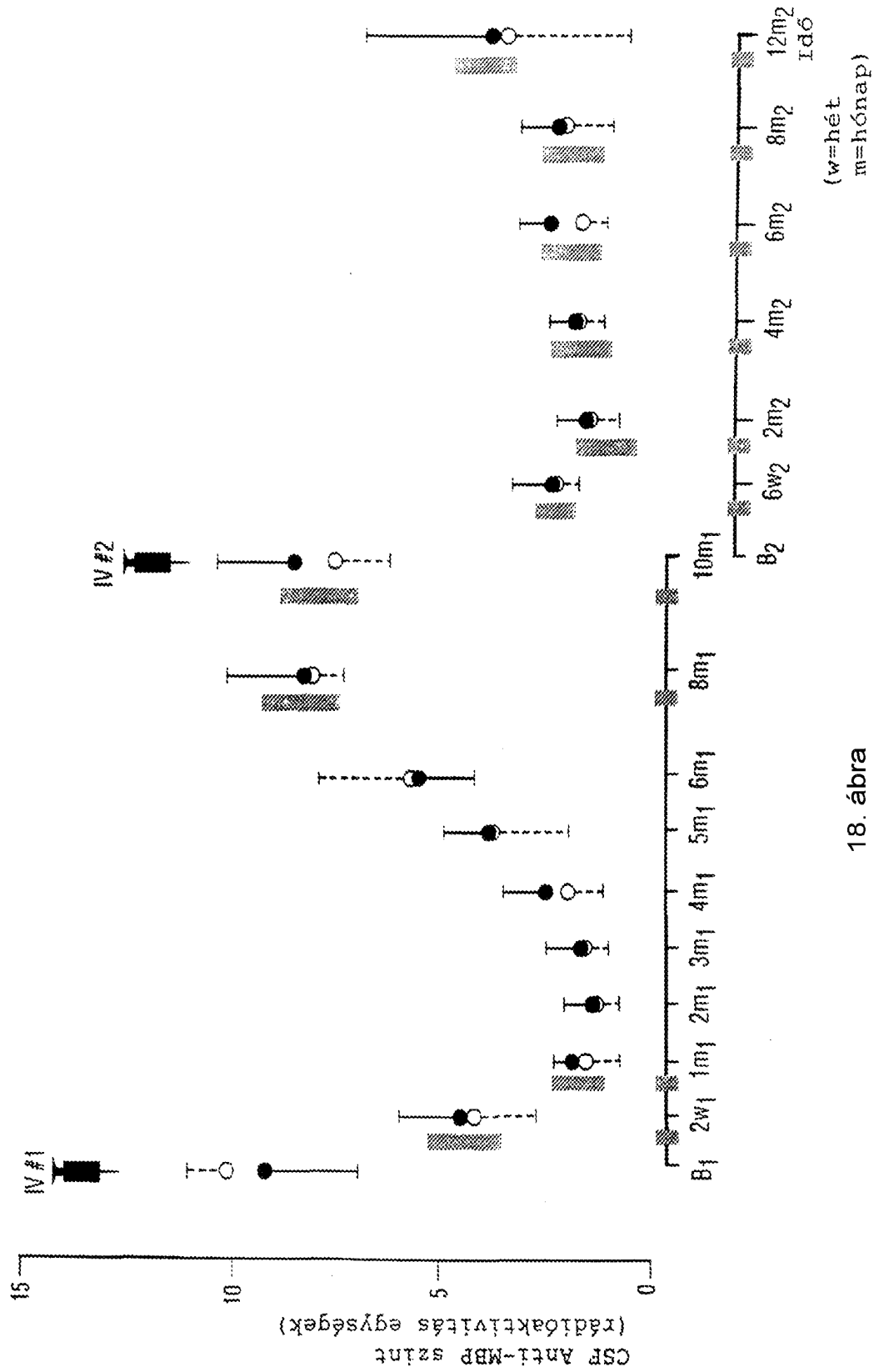




17A. ábra



17B. ábra



18. ábra