



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 189 248** ⁽¹³⁾ **C2**
(51) МПК⁷ **A 61 K 38/17, C 07 K 14/47**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

(21), (22) Заявка: 98120519/14, 15.04.1997
(24) Дата начала действия патента: 15.04.1997
(30) Приоритет: 18.04.1996 US 08/634.493
(43) Дата публикации заявки: 20.09.2000
(46) Дата публикации: 20.09.2002
(56) Ссылки: REJMAN J.J. et al, Biochim. Biophys. Res-Comm. 1988, v.150, №1, p.329-334. SU 1814899 A1, 05.05.1993. RU 2080872 C1, 10.06.1997. GB 2074864 A, 11.11.1981. WO 95/29194 A, 02.11.1995. WO 96/13517 A, 09.05.1996.
(85) Дата перевода заявки PCT на национальную фазу: 18.11.1998
(86) Заявка PCT: EP 97/01903 (15.04.1997)
(87) Публикация PCT: WO 97/40149 (30.11.1997)
(98) Адрес для переписки: 103735, Москва, ул. Ильинка 5/2, ООО "Союзпатент", Агурееву А.П.

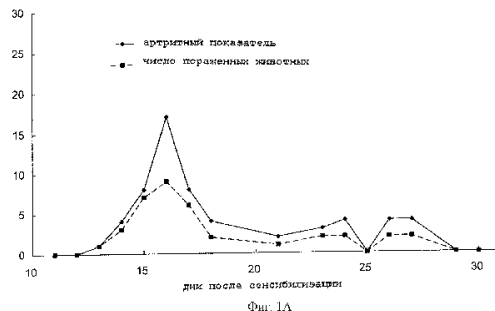
(71) Заявитель:
АКЦО НОБЕЛЬ Н.В. (NL)
(72) Изобретатель: БОТС Анна Мария Хелена (NL),
ВЕРХЕЙДЕН Гейсбертус Франсискус Мария (NL), БОС Эбо Сибрен (NL)
(73) Патентообладатель:
АКЦО НОБЕЛЬ Н.В. (NL)
(74) Патентный поверенный:
Агуреев Александр Павлович

(54) **АУТОАНТИГЕН И СТРУКТУРНО РОДСТВЕННЫЕ ЕМУ БЕЛКИ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ ПРИ ИММУНОТЕРАПИИ АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ**

(57)
Изобретение относится к медицине, в частности к применению аутоантигена HC gr-39 и белков, содержащих аминокислотную последовательность, обнаруживающую, по меньшей мере, 50%-ную гомологию с аминокислотной последовательностью HC gr-39, в особенности с аминокислотной последовательностью YKLVCCYYT SWSQYREGDGSCFPDALDRFLCTHIIYSFANIS ND (послед. 1), при антигенспецифическом лечении разрушения суставного хряща при аутоиммунных болезнях у млекопитающих, для индуцирования системной толерантности иммунной системы. Аутоантиген HC gr-39 и артритогенные белки, содержащие аминокислотную последовательность, обнаруживающую, по меньшей мере, 50%-ную гомологию с аминокислотной последовательностью YKLVCCYYT SWSQYREGDGSCFPDALDRFLCT HIIYSFANISND (послед. 1), также подходят

для индуцирования артрита у животных, предпочтительно у мышей. Изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим указанные антиген и/или артритогенные белки. Изобретение обеспечивает использование заявленных аутоантигенов для подавления развития артрита. 5 с. и 5 з.п.ф-лы, 5 табл., 2 ил.

Артритный показатель для парадигм латт у нестерилизованных животных





RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 189 248** ⁽¹³⁾ **C2**
(51) Int. Cl.⁷ **A 61 K 38/17, C 07 K 14/47**

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 98120519/14, 15.04.1997
(24) Effective date for property rights: 15.04.1997
(30) Priority: 18.04.1996 US 08/634.493
(43) Application published: 20.09.2000
(46) Date of publication: 20.09.2002
(85) Commencement of national phase: 18.11.1998
(86) PCT application:
EP 97/01903 (15.04.1997)
(87) PCT publication:
WO 97/40149 (30.11.1997)
(98) Mail address:
103735, Moskva, ul. Il'inka 5/2, OOO
"Sojuzpatent", Agureevu A.P.

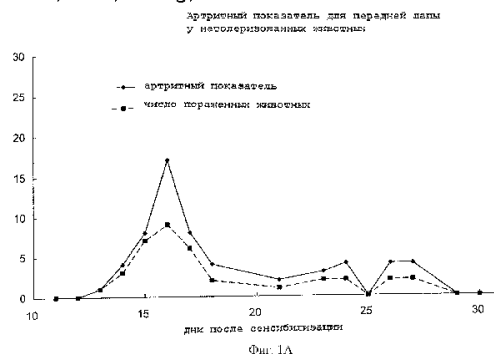
(71) Applicant:
AKTsO NOBEL' N.V. (NL)
(72) Inventor: BOTS Anna Marija Khelena (NL),
VERKhEJDEN Gejsbertus Fransiskus Marija
(NL), BOS Ehbo Sibren (NL)
(73) Proprietor:
AKTsO NOBEL' N.V. (NL)
(74) Representative:
Agureev Aleksandr Pavlovich

(54) **AUTOANTIGEN AND STRUCTURALLY RELATED PROTEINS FOR USING IN IMMUNOTHERAPY OF AUTOIMMUNE DISEASES**

(57) Abstract:

FIELD: medicine, chemistry of proteins, pharmacy. SUBSTANCE: invention relates to the use of an autoantigen HC gp-39 and other proteins comprising an amino acid sequence showing at least 50% of homology with amino acid sequence of HC gp-39 and especially with amino acid sequence: YKLVCYYTWSQYREGDGSCFPDALD-RFLCT HIIYSFANISND (sequence No. 1), in an antigen-specific treatment of destruction of articular cartilage in autoimmune diseases in mammals, for induction of systemic tolerance of immune system. Autoantigen HC gp-39 and arthritogenic proteins containing an amino acid sequence showing at least 50% of homology with an amino acid sequence: YKLVCYYTWSQYREGDGSCFPDALDR-FLCT HIIYS-FANISD (sequence No. 1) are suitable also for induction of arthritis in animals but preferably in mice. Invention relates to

also pharmaceutical compositions containing indicated antigen and/or arthritogenic proteins. Invention provides the use of the claimed autoantigens for suppression of arthritis development. EFFECT: enhanced effectiveness of autoantigen and proteins. 10 cl, 5 tbl, 5 dwg, 2 ex



Изобретение относится к новому аутоантигену и родственным ему белкам, их применению при лечении хронического разрушения суставного хряща при аутоиммунных болезнях, фармацевтическим композициям, содержащим указанные аутоантиген и/или белки, способу диагностики для обнаружения аутореактивных Т-клеток в исследуемом образце и тест-наборам, применяемым в указанном способе.

Иммунная система основана на принципе отделения чужеродных антигенов (несобственных антигенов) от аутоантигенов (собственных антигенов, образованных в организме самого индивидуума), достигаемого посредством создания толерантности к аутоантигенам.

Иммунная система защищает индивидуума от чужеродных антигенов и реагирует на воздействие чужеродного антигена путем активации определенных клеток, таких как Т- и В-лимфоциты, и продуцирования растворимых факторов, подобных интерлейкинам, антителам и факторам комплемента. Антиген, на который реагирует иммунная система, разрушается антигенпредставляющими клетками (АРС), и на клеточной поверхности, ассоциированной с гликопротеином главного комплекса гистосовместимости (МНС) класса II, экспрессируется фрагмент антигена. Комплекс МНС-гликопротеина с фрагментом антигена представляется Т-клетке, которая благодаря своему Т-клеточному рецептору распознает фрагмент антигена совместно с белком МНС класса II, с которым он связан. Т-клетка становится активированной, т.е., пролиферирует и/или продуцирует интерлейкины, результатом чего является экспансия активированных лимфоцитов, направленных на "атакованный" антиген (Grey et al., Sci. Am., 261:38-46, 1989).

Собственные антигены также непрерывно продуцируются и представляются в виде фрагментов антигена гликопротеинами МНС Т-клеткам (Jardetsky et al., Nature, 353: 326-329, 1991). Таким образом, иммунной системе присуще самораспознавание. При нормальных условиях иммунная система толерантна к собственным антигенам и активации иммунной реакции собственными антигенами не происходит.

Когда толерантность к собственным антигенам теряется, иммунная система становится активированной против одного или нескольких собственных антигенов, результатом чего является активация аутореактивных Т-клеток и продуцирование аутоантител. Это явление называют аутоиммунитетом. Так как иммунная реакция вообще деструктивна, т.е., предназначена для разрушения инвазивного чужеродного антигена, аутоиммунные реакции могут вызвать разрушение ткани собственного организма.

Вклад Т-клеток в аутоиммунные болезни установлен рядом исследований. У мышей экспериментальный аутоиммунный энцефало-миелит (ЕАЕ) опосредован весьма ограниченной группой Т-клеток, объединенных благодаря своей специфичности к одному эпитопу основного миелинового белка (МВР) в комплекс с молекулой МНС класса II. Показано, что у крысы Льюиса - вида с высокой

подверженностью различным аутоиммунным болезням - посредником при заболевании являются Т-клетки. Предполагается, что аутоиммунные болезни человека также ассоциированы с развитием аутоагрессивных Т-клеток.

Деструктивная аутоиммунная реакция вовлечена в различные заболевания, такие как ревматоидный артрит (RA), при которых целостность суставного хряща разрушается хроническим воспалительным процессом, являющимся результатом присутствия большого числа активированных лимфоцитов и клеток, экспрессирующих МНС класса II. Для поддержания местной воспалительной реакции оказывается необходимым всего лишь наличие хряща: показано, что при RA разрушение хряща связано с активностью реагирующих на хрящ аутореактивных Т-клеток (Sigall et al., Clin. Exp. Rheumat., 6:59, 1988; Giant et al., Biochem. Soc. Trans., 18:796, 1990; Bunnesser et al., Rheumatoid arthritis, Smolen, Kalden, Maini (Eds) Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1992). Кроме того, показано, что удаление хряща у больных RA посредством хирургического вмешательства уменьшает воспалительный процесс (G.S. Panayi et al., Clin. Exp. Rheumatol., 11(suppl.8):SI-S8, 1993). Поэтому полагают, что белки хряща являются аутоантигенами-мишенями, компетентными в стимуляции Т-клеток. Активация этих аутореактивных Т-клеток ведет к развитию аутоиммунной болезни. Однако идентификация аутоантигенных компонентов, которые играют роль при начале ревматоидного артрита, пока не удается.

Воспалительную реакцию, результатом которой является разрушение хряща, можно лечить некоторыми лекарственными средствами, такими как, например, стероидные лекарственные средства. Однако такие лекарственные средства часто являются иммунодепрессивными

лекарственными средствами, которые неспецифичны и обладают токсичным побочным действием. Недостатки неспецифической иммуносупрессии делают такое лечение совсем неподходящим. Антигенспецифическая, нетоксичная иммунодепрессивная терапия представляет весьма привлекательную альтернативу неспецифической иммуносупрессии. Такая антигенспецифическая терапия включает лечение больных аутоантигеном-мишенью или антигенами с аминокислотной последовательностью, которая обнаруживает гомологию последовательностей с аминокислотной последовательностью аутоантигена-мишени или синтетических Т-клеточных пептидов, образованных от указанного аутоантигена или указанного антигена. Эти синтетические пептиды соответствуют Т-клеточным эпитопам аутоантигена и могут использоваться для индуцирования специфической Т-клеточной толерантности как к ним самим, так и к аутоантигену. Хотя десенсибилизация иммунной системы именно тем же антигеном, который ответствен за активацию иммунной системы, кажется парадоксальной, регулируемое введение (ауто)антигена-мишени может быть весьма эффективным при сенсibilизации иммунной

системы. Десенсибилизация или иммунологическая толерантность иммунной системы основывается на давно наблюдаемом явлении, что животные, которым с пищей или в виде ингаляции дают антиген или эпитоп, менее способны к развитию системной иммунной реакции к указанным антигену или эпитопу, когда указанные антиген или эпитоп вводят системным путем.

Для эффективного применения толерантной терапии для лечения опосредованного Т-клетками разрушения хряща весьма необходимо идентифицировать ответственный аутоантиген или антигены с аминокислотной последовательностью, обнаруживающей гомологию последовательности с аминокислотной последовательностью аутоантигена-мишени, чтобы десенсибилизировать больных против аутоантигена, активирующего Т-клетки, ответственные за воспалительный процесс.

Целью данного изобретения является аутоантиген и белки с аминокислотной последовательностью, обнаруживающей гомологию последовательности с аминокислотной последовательностью аутоантигена, причем указанные аутоантиген и/или белок подходят для индукции специфической Т-клеточной толерантности к реагирующему на хрящ антигену у пациентов, страдающих от опосредованного Т-клетками разрушения хряща.

Другой целью данного изобретения являются животные тест-модели артрита, подходящие для применения при скрининге новых лекарственных средств для подавления симптомов артрита.

Еще одной целью данного изобретения является способ обнаружения аутореактивных Т-клеток, участвующих в разрушении суставного хряща, и тест-наборы применяемые в указанном способе.

Было неожиданно обнаружено, что гликопротеин 39 хряща человека (называемый здесь далее HC gr-39) является аутоантигеном-мишенью у больных RA, который активирует специфические Т-клетки, вызывая или опосредуя, таким образом, воспалительный процесс. Артритогенный характер HC gr-39 подтвержден на мышах Balb/c. Однократная подкожная инъекция указанного белка мышам Balb/c способна инициировать у животных признаки артрита. Течение индуцированной HC gr-39 болезни отличается рецидивами, периодически происходящими в передних и/или задних лапах, и постепенным развитием от легкого артрита до более тяжелой формы. Также наблюдается симметричное расположение пораженных суставов, которое, наряду с наблюдением повторных рецидивов и образования узелков, напоминает развитие болезни при артрите, в особенности при RA.

Еще более удивительно, что результатом введения HC gr-39 является иммунологическая толерантность и, что еще важнее, задержка и/или подавление развития артрита.

Также неожиданно обнаружено, что белки, содержащие аминокислотную последовательность, показывающую по меньшей мере 50% гомологию с аминокислотной последовательностью HC gr-39, при инъекции животным

способны индуцировать артрит. В частности белки, содержащие аминокислотную последовательность, показывающую по меньшей мере 50% гомологию с аминокислотной последовательностью YKLVCYYTSWSQYREGDGSFCFDPALDRFLCT HIIYSFANISND (послед. 1), также способны индуцировать артрит у животных, как это описано в случае HC gr-39.

Предпочтительно такие артритогенные белки содержат аминокислотную последовательность, показывающую по меньшей мере 70%, предпочтительнее 80%, наиболее предпочтительно 90% гомологию с аминокислотной последовательностью HC gr-39, еще лучше - с аминокислотной последовательностью YKLVCYYTSWSQYREGDGSFCFDPALDRFLCT HIIYSFANISND (послед. 1).

Процент гомологии последовательностей артритогенных белков по изобретению с аминокислотной последовательностью послед. 1 понимается как измеренный с помощью обычно применяемых программ сравнения последовательностей, таких как FASTA (W.R. Pearson and D.J. Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 2444-2448, 1988).

Подходящими артритогенными белками по изобретению являются, например, свиной гепаринсвязывающий белок в 38 кД, коровий сывороточный белок в 39 кД, человеческий белок YKL-39, мышинный белок регрессирующей молочной железы в 39 кД (brp39), человеческий специфический гликопротеин яйцевода, мышинный специфический гликопротеин яйцевода, специфический гликопротеин яйцевода хомяка, коровий специфический гликопротеин яйцевода, человеческий белок-предшественник хитотриозидазы и предшественник мышинного секреторного белка YM-1. Артритогенные белки по изобретению весьма подходят для индуцирования системной толерантности иммунной системы к гомологичным аутоантигенам и могут использоваться для задержки и/или подавления проявления артрита у млекопитающих.

HC gr-39 присутствует в сыворотке как больных, так и здоровых взрослых людей, хотя концентрация белка в сыворотке у больных примерно в два раза выше по сравнению со здоровыми взрослыми людьми. Кроме того, мРНК, кодирующую HC gr-39, можно обнаружить в синовиальных пробах или хряще, взятом у больных RA, в то время как хрящ здоровых взрослых людей, полученный при хирургическом вмешательстве, не содержит существенного количества указанной мРНК. При выращивании суставных хондроцитов и синовиальных клеток их главным секреторным продуктом становится HC gr-39 (Hakala et al., J. Biol. Chem., Vol.268, 34: 25803, 1993). Артритогенный характер HC gr-39 ранее не описывался и не предполагался ни в публикациях Hakala et al., ни в какой-либо другой публикации.

Белки, аминокислотная последовательность которых обнаруживает по меньшей мере 50% гомологию с аминокислотной последовательностью HC gr-39, в особенности с аминокислотной последовательностью YXLVCYYTSWSQYREGDGSFCFDPALDRFLCT

HIYSFANISND (послед. 1), описаны в литературе. Идентификация свиного гепаринсвязывающего белка в 38 кД описана в работе Shackelton et al. (1995), J. Biol. Chem., Vol.270, No.22, 13076-13083, однако функция белка не идентифицирована. Выделение и характеристики коровьего сывороточного белка в 39 кД описаны в J.J. Rejman et al. (1988), Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 150, No. 1, 329-334. Мышиный белок регрессирующей молочной железы в 39 кД (brp39) описан в Morrison and Leder, 1994, Oncogene, 9, 3417. Клонирование кДНК, кодирующей человеческий специфический гликопротеин яйцевода, и соответствующая аминокислотная последовательность описаны в Arias et al. (1994), Biology of Reproduction, 51, 685-694. Специфические гликопротеины яйцевода других млекопитающих, такие как мышиный специфический гликопротеин яйцевода и специфический гликопротеин яйцевода хомяка, описаны в JP-A-07107979, Kinosei Peptide Kenkyusho KK. Очистка и молекулярное клонирование коровьего специфического гликопротеина яйцевода описаны в Y. Sendai et al., 1994, Biol. of Reprod., 50, 927-934. Человеческий белок-предшественник хитотриозидазы секретируется активированными человеческими макрофагами, и клонирование соответствующей кДНК и аминокислотная последовательность описаны в Boot et al. (1995), J. Biol. Chem., Vol.270, No.44, 26252-26256. Аминокислотная последовательность предшественника мышинного секреторного белка YM-1 представлены в неопубликованной работе EMBL Data Library, June 1992, Accession No. M94584, Chang et al. Аминокислотная последовательность человеческого хондроцитного белка YKL-39 описана в Hu et al. (1996), J. Biol. Chem., Vol. 271, No.32, 19415-19420. Однако ни в одной из вышеупомянутых публикации нет ни намека, ни предположения в отношении артритагенного характера белков по изобретению, или того факта, что эти белки можно применять в качестве лекарственных веществ при лечении для индуцирования специфической Т-клеточной толерантности к HC gr-39 у млекопитающих, конкретнее - у людей, страдающих от опосредованного Т-клетками разрушения хряща, например от артрита, конкретнее - от ревматоидного артрита.

Таким образом, в соответствии с изобретением HC gr-39 и белки, содержащие аминокислотную последовательность, обнаруживают по меньшей мере 50% гомологию с аминокислотной последовательностью HC gr-39, а в особенности с аминокислотной последовательностью YKLVCYYTWSQYREGDGSCFPDALDRFLCT HIYSFANISND (послед. 1), весьма подходят для применения при лечении для индуцирования специфической Т-клеточной толерантности к HC gr-39 у больных, страдающих от опосредованного Т-клетками разрушения хряща, например от артрита, конкретнее - от ревматоидного артрита. В объем изобретения также входят фрагменты HC gr-39 и артритагенные белки по изобретению, которые способны

индуцировать Т-клеточную специфическую толерантность к аутоантигену HC gr-39 в атакованном хряще.

В WO 95/01995 и WO 95/02188 описывается диагностическое использование HC gr-39 в качестве маркера для РА, однако не описывается и не делается предположений об артритагенном характере HC gr-39. Нигде нет ни намека, ни предположений о применении HC gr-39, или его фрагментов, или Т-клеточных реактивных пептидов по настоящему изобретению при антигенспецифической терапии для индуцирования Т-клеточной специфической толерантности к HC gr-39 в атакованном хряще.

HC gr-39, артритагенные белки, содержащие аминокислотную последовательность, обнаруживающую по меньшей мере 50% гомологию с аминокислотной последовательностью HC gr-39, а в особенности с аминокислотной последовательностью YKLVCYYTWSQYREGDGSCFPDALDRFLCT HIYSFANISND (послед. 1), и фрагменты, образованные из указанных артритагенных белков по изобретению, можно получить с помощью методов рекомбинантных ДНК. С этой целью нуклеотидную последовательность, которая кодирует HC gr-39 или белок, содержащий аминокислотную последовательность, обнаруживающую по меньшей мере 50% гомологию с аминокислотной последовательностью HC gr-39, а в особенности с аминокислотной последовательностью YKLVCYYTWSQYREGDGSCFPDALDRFLCT HIYSFANISND (послед. 1), или фрагмент, образованный из указанных белков по изобретению, или мультимер указанного фрагмента вставляют в экспрессионный вектор. Подходящими экспрессионными векторами являются, среди прочих, плазмиды, космиды, вирусы и YAC (искусственные хромосомы дрожжей), содержащие необходимые регуляторные области для репликации и экспрессии. Экспрессионный вектор может быть привнесен для экспрессии в клетке-хозяине. Подходящими клетками-хозяевами являются, например, бактерии, дрожжевые клетки и клетки млекопитающих. Такие методы хорошо известны в технике (Sambrook et al., Molecular Cloning: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989).

С использованием таких методов рекомбинантных ДНК в клетке-хозяине можно получить коровий молочно-сывороточный белок, последовательность которого описана здесь.

Таким образом, настоящее изобретение также относится к выделенной кДНК, кодирующей коровий молочно-сывороточный белок, показанной послед. 3, а также к коровьему молочно-сывороточному белку по послед. 2. Также будет очевидно, что можно получить также фрагменты по данным в настоящем изобретении указаниям. Термин "фрагмент" относится к любой последовательности аминокислот, которая является частью белка, с общими элементами происхождения, структуры и механизм действия, которые входят в объем

настоящего изобретения.

Подходящие фрагменты, образованные от артритагенных белков по изобретению, можно также получить посредством одного из известных химических способов синтеза пептидов. Способы органической химии синтеза пептидов включают соединение требуемых аминокислот посредством реакции конденсации или в гомогенной фазе или с помощью так называемой твердой фазы. Наиболее обычными способами осуществления вышеупомянутых реакций конденсации являются карбодимидный способ, азидный способ, сочетание ангидридного способа и способа с использованием активированных сложных эфиров, описанные в *The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology*, Vol.1-3 (Ed. Gross, E. and Meienhofer, J.) 1979, 1980, 1981 (Academic Press, Inc.).

Получение подходящих фрагментов вышеупомянутого HC gp-39 и артритагенных белков по изобретению с использованием "твердой фазы" описано, например, в *J. Amer. Chem. Soc.*, 85:2149 (1963) и в *Int. J. Peptide Protein Res.*, 35: 161-214 (1990).

Особенно подходящей твердой фазой является, например, смола на основе п-алкоксибензилового спирта (смола - сополимер 4-гидроксиметилфеноксиметилстирола с 1% дивинилбензола), описанная в Wang (1974), *J. Am. Chem. Soc.*, 95: 1328. После синтеза пептиды можно отделить от этой твердой фазы при умеренных условиях.

После синтеза нужной аминокислотной последовательности следует отделение ее от смолы с помощью, например, трифторуксусной кислоты, содержащей акцепторы, например триизопропилсилан, анизол или этандитиол, тиоанизол.

Реакционноспособные группы, которые могут не участвовать в реакции конденсации, защищают эффективными для этой цели группами, которые очень легко можно снова удалить посредством гидролиза в присутствии кислоты или основания или восстановлением. Более широкое описание возможных защитных групп можно найти в *The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology*, Vol.1-9 (Eds. Gross, Udenfreund and Meienhofer) 1979-1987 (Academic Press, Inc.). Защитные группы можно отщепить различными традиционными способами, зависящими от природы конкретной группы, например с помощью трифторуксусной кислоты или посредством мягкого восстановления, например водородом, в присутствии катализатора, такого как палладий, или HBr в ледяной уксусной кислоте.

Хотя десенсибилизация иммунной системы именно тем же антигеном, который ответствен за активацию иммунной системы, кажется парадоксальной, такая десенсибилизация основывается на давно наблюдаемом явлении, что животные, которым с пищей или в виде ингаляции дают антиген или эпитоп, менее способны к развитию системной иммунной реакции к указанным антигену или эпитопу, когда указанные антиген или эпитоп вводят системным путем. Следовательно, контролируемое введение HC gp-39 и/или белков, содержащих аминокислотную

последовательность, обнаруживающую по меньшей мере 50% гомологию с аминокислотной последовательностью HC gp-39, а в особенности с аминокислотной последовательностью

5 YKLVCYYTSWSQYREGDGSFCFDPALDRFLCT
HIIYSFANISND (послед. 1), может быть эффективным в десенсибилизации иммунной системы. Фрагменты белков по изобретению, которые способны десенсибилизировать больных против HC gp-39, также входят в объем данного изобретения.

10 В соответствии с изобретением больных, у которых хрящ атакован аутореактивными Т-клетками, можно лечить фармацевтической композицией, содержащей HC gp-39, один или несколько белков, содержащих аминокислотную последовательность, обнаруживающую по меньшей мере 50% гомологию с аминокислотной последовательностью HC gp-39, а в особенности с аминокислотной последовательностью

20 YKLVCYYTSWSQYREGDGSFCFDPALDRFLCT
HIIYSFANISND (послед. 1), или один или несколько фрагментов, образовавшихся из белка по изобретению, и фармацевтически приемлемый носитель, с целью сделать специфические аутореактивные Т-клетки этих больных толерантными к HC gp-39 в атакованном хряще и ослабить воспалительную реакцию.

30 Подходящие белки, которые используются в фармацевтической композиции по изобретению, являются белками, содержащими аминокислотную последовательность, обнаруживающую по меньшей мере 70%, предпочтительно 80%, предпочтительнее 90% гомологию с аминокислотной последовательностью HC gp-39, а в особенности с аминокислотной последовательностью

35 YKLVCYYTSWSQYREGDGSFCFDPALDRFLCT
HIIYSFANISND (послед. 1).

40 Весьма подходящими белками для использования в фармацевтической композиции по изобретению являются, например, свиной гепаринсвязывающий белок в 38 кД, коровий сывороточный белок в 39 кД, мышинный белок регрессирующей молочной железы в 39 кД (bpr39), мышинный

45 яйцеводспецифический гликопротеин, яйцеводспецифический гликопротеин хомяка, коровий яйцеводспецифический гликопротеин, человеческий YKL-39, человеческий яйцеводспецифический гликопротеин, человеческий белок-предшественник хитотриозидазы и предшественник мышинного секреторного белка YM-1.

50 Также весьма подходящими для применения в фармацевтической композиции по изобретению являются

55 ДНК-(экспрессионные) векторы, содержащие ДНК, которая кодирует HC gp-39, или белок, содержащий аминокислотную последовательность, обнаруживающую по меньшей мере 50% гомологию с аминокислотной последовательностью HC gp-39, а в особенности с аминокислотной последовательностью

60 YKLVCYYTSWSQYREGDGSFCFDPALDRFLCT
HIIYSFANISND (послед. 1), или один или несколько фрагментов, образовавшихся из белков по изобретению. После доставки

ДНК(экспрессионный)вектор может обеспечить путем экспрессии уровень рекомбинантного НС gr-39, или белка, содержащего аминокислотную последовательность, обнаруживающую по меньшей мере 50% гомологию с аминокислотной последовательностью НС gr-39, а в особенности с аминокислотной последовательностью YKLVCYYTWSQYREGDGSCFPDALDRFLCT HIIYSFANISND (послед. 1), или фрагментов по изобретению, подобный уровню, которого можно достичь путем непосредственного введения фармацевтической композиции, содержащей белок НС gr-39 или пептиды.

Аутоантиген НС gr-39, артритогенные белки, содержащие аминокислотную последовательность, обнаруживающую по меньшей мере 50% гомологию с аминокислотной последовательностью НС gr-39, а в особенности с аминокислотной последовательностью YKLVCYYTWSQYREGDGSCFPDALDRFLCT HIIYSFANISND (послед. 1), и фрагменты, образовавшиеся из указанных артритогенных белков по изобретению, имеют преимущество при сравнении с неспецифическим супрессивным действием иммунодепрессивных стероидных средств в том, что они обладают специфическим толерезирующим действием на аутореактивные Т-клетки, оставляя, таким образом, другие компоненты иммунной системы интактными. Лечение аутоантигеном или белками, содержащими аминокислотную последовательность, обнаруживающую по меньшей мере 50% гомологию с аминокислотной последовательностью НС gr-39, а в особенности с аминокислотной последовательностью YKLVCYYTWSQYREGDGSCFPDALDRFLCT HIIYSFANISND (послед. 1), и фрагментами по изобретению, будет безопасным и без побочных эффектов.

Толерантности можно достичь путем введения больших или малых доз аутоантигена или белков по изобретению. Количество аутоантигена или белка будет зависеть от способа введения, времени введения, возраста пациента, а также от общего состояния здоровья и питания.

Как правило, можно использовать дозировку в 0,01-1000 мкг белка на кг массы тела, предпочтительно 0,5-500 мкг, предпочтительнее 0,1-100 мкг.

Фармацевтически приемлемые носители известны специалистам в этой области техники, и к ним относятся, например, стерильный физиологический раствор, лактоза, сахароза, фосфат кальция, желатин, декстрин, агар, пектин, арахисовое масло, оливковое масло, сезамовое масло и вода. Другими носителями могут быть, например, молекулы МНС класса II, заключенные, если требуется, в липосомы.

Кроме того, фармацевтическая композиция по изобретению может содержать один или несколько адъювантов. Подходящими адъювантами являются, среди прочих, гидроксид алюминия, фосфат алюминия, амфиген, токофенолы, монофосфениллипид А, мурамил-дипептид и сапонины, например Quill А. Количество адъюванта зависит от природы самого адъюванта.

Кроме того, фармацевтическая композиция по изобретению может содержать один или несколько стабилизаторов, таких как, например, углеводы, в том числе сорбит, маннит, крахмал, сахароздекстрин и глюкозу, белки, такие как альбумин или казеин, и буферы, подобные щелочным фосфатам.

Подходящими способами введения являются внутримышечные инъекции, подкожные инъекции, внутривенные инъекции или интраперитонеальные инъекции, пероральное и интраназальное введение. Предпочтительными способами введения являются пероральное и интраназальное введение.

Благодаря своему артритогенному характеру НС gr-39, а также белки, содержащие аминокислотную последовательность, обнаруживающую по меньшей мере 50% гомологию с аминокислотной последовательностью НС gr-39, а в особенности с аминокислотной последовательностью YKLVCYYTWSQYREGDGSCFPDALDRFLCT HIIYSFANISND (послед. 1), могут использоваться для индуцирования у животных клинического артрита. После введения небольшого количества НС gr-39 или одного или нескольких белков, содержащих аминокислотную последовательность, обнаруживающую по меньшей мере 50% гомологию с аминокислотной последовательностью НС gr-39, а в особенности с аминокислотной последовательностью YKLVCYYTWSQYREGDGSCFPDALDRFLCT HIIYSFANISND (послед. 1), или одного или нескольких фрагментов белков по изобретению у указанных животных будут развиваться признаки артрита, приводящие к картине болезни, напоминающей развитие болезни при артрите, особенно при ревматоидном артрите. Когда мышам Balb/c инъецируют подкожно белок НС gr-39 или белок, содержащий аминокислотную последовательность, обнаруживающую по меньшей мере 50% гомологию с аминокислотной последовательностью НС gr-39, а в особенности с аминокислотной последовательностью YKLVCYYTWSQYREGDGSCFPDALDRFLCT HIIYSFANISND (послед. 1), у животных развиваются признаки артрита. Течение болезни, вызванной НС gr-39, а также болезни, вызванной белком, содержащим аминокислотную последовательность, обнаруживающую по меньшей мере 50% гомологию с аминокислотной последовательностью НС gr-39, а в особенности с аминокислотной последовательностью YKLVCYYTWSQYREGDGSCFPDALDRFLCT HIIYSFANISND (послед. 1), характеризуется рецидивами, происходящими периодически в передних лапах и/или задних лапах, и постепенным развитием от легкого артрита к более тяжелой форме. Также наблюдается симметричное расположение пораженных суставов, что наряду с наблюдением повторных рецидивов и образования узелков напоминает развитие болезни при артрите, особенно при RA.

Таким образом, эти пораженные болезнью животные представляют адекватную животную модель для исследования

механизма, лежащего в основе инициации и развития проявлений артрита. Кроме того, указанных пораженных животных можно использовать для поиска новых лекарственных средств для лечения артрита и для исследования действия этих лекарственных средств на развитие артрита. В случае артрита, особенно ревматоидного артрита, предпочтительно в качестве животных моделей использовать мышей.

Чтобы вызвать артрит у указанных животных, необходимо ввести подходящее количество HC gp-39 или одного или нескольких белков по изобретению. Подходящее количество составляет 0,1-1000 мкг, предпочтительно 1-100 мкг, предпочтительнее 10-50 мкг на кг массы тела. Количество HC gp-39 или белков, содержащих аминокислотную последовательность, обнаруживающую по меньшей мере 50% гомологию с аминокислотной последовательностью HC gp-39, а в особенности в аминокислотной последовательностью YKLVCYYTWSQYREGDGSCFPDALDRFLCT HIIYSFANISND (послед. 1), или их фрагментов будет зависеть от способа введения, времени введения и типа используемого животного. Подходящими способами введения являются те же способы, что описаны ранее. Чтобы вызвать эффект индукции артрита, HC gp-39 или белки, содержащие аминокислотную последовательность, обнаруживающую по меньшей мере 50% гомологию с аминокислотной последовательностью HC gp-39, а в особенности с аминокислотной последовательностью YKLVCYYTWSQYREGDGSCFPDALDRFLCT HIIYSFANISND (послед. 1), или пептиды по изобретению могут содержать один или несколько стабилизаторов или адъювантов, описанных ранее.

HC gp-39, белки, содержащие аминокислотную последовательность, обнаруживающую по меньшей мере 50% гомологию с аминокислотной последовательностью HC gp-39, а в особенности с аминокислотной последовательностью YKLVCYYTWSQYREGDGSCFPDALDRFLCT HIIYSFANISND (послед. 1), или их фрагменты по изобретению также являются весьма подходящими для применения при способе диагностики для обнаружения присутствия активированных аутореактивных Т-меток, вовлеченных в процесс хронического воспаления сустава хряща.

Способ диагностики по изобретению включает следующие стадии:

а) выделение мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) из образца крови индивидуума,

б) культивирование указанных PBMC при подходящих условиях,

в) инкубацию культуры указанных PBMC в присутствии аутоантигена или белков по изобретению и их фрагментов, и

г) детектирование реакции Т-клеток, например пролиферативной реакции, указывающей на наличие у индивидуума активированных аутореактивных Т-клеток.

В случае детектирования реакции по оценке пролиферативной реакции аутореактивных Т-клеток способом измерения пролиферации является введение

радиоизотопа, например 3Н-тимидина. Реакцию аутореактивных Т-клеток, присутствующих в PBMC, также можно обнаружить путем измерения выделения цитокина с помощью цитокин-специфического ELISA или цитотоксичности с высвобождением хрома⁵¹. Еще одним способом детекции является измерение экспрессии маркеров активации с помощью FACS-анализа, например I1-2R.

Диагностическая композиция, содержащая один или несколько пептидов по изобретению и подходящее детектирующее средство, составляет, таким образом, часть изобретения. В зависимости от типа детекции детектирующее средство может представлять радиоизотоп, фермент или антитела, специфические для клеточной поверхности, или маркеры активации.

В объем изобретения также входят тест-наборы, содержащие один или несколько пептидов по изобретению. Эти тест-наборы подходят для применения при способе диагностики по изобретению.

Таким образом, настоящее изобретение относится к способу определения того, присутствуют ли аутоагрессивные Т-клетки, реактивные в отношении HC gp-39, у больных, страдающих от опосредованного Т-клетками разрушения хряща, как, например, при артрите, в особенности при ревматоидном артрите. Если специфические к HC gp-39 Т-клетки присутствуют, толеризация этих Т-клеток с помощью фармацевтической композиции, содержащей HC gp-39 или один или нескольких артритогенных белков, содержащих аминокислотную последовательность, обнаруживающую по меньшей мере 50% гомологию с аминокислотной последовательностью HC gp-39, а в особенности с аминокислотной последовательностью YKLVCYYTWSQYREGDGSCFPDALDRFLCT HIIYSFANISND (послед. 1), или пептиды по настоящему изобретению, или их сочетания может приостановить или подавить развитие артрита.

Следующие далее примеры поясняют изобретение и никоим образом не должны истолковываться как ограничивающие объем изобретения.

Пояснения к чертежам

Фиг. 1. Инициация и развитие артрита у толеризованных HC gp-39 и нетолеризованных мышей Balb/c. AS - общий артритный показатель пораженных животных на данный день после сенсibilизации. N - число пораженных животных на день после сенсibilизации.

Фиг. 2. Инициация и развитие артрита у мышей Balb/c после введения соответственно 0,2, 1, и 25 мкг коровьего сывороточного белка в 39 кД. Отношение инициация/развитие представляется в виде кумулятивного показателя (общий артритный показатель пораженных животных) на день после сенсibilизации.

Пример 1

Методы

Выделение в чистом виде HC gp-39 из клеточной линии остеогенной саркомы MG63

Клетки MG63 (остеогенная саркома человека, ATCC CRL 1427) выращивают на клеточных фабриках в бессывороточной среде DMEM/HAM F12. HC gp-39 очищают от

супернатанта культуры посредством гепаринаффинной хроматографии с последующей хроматографией на супердексе 75. Чистоту контролируют с помощью SDS-PAGE. Дополнительно секвенирование N-концевых аминокислот подтверждает, что очищенный белок идентичен белку, описанному Nakala et al.

Артритогенность HC gr-39 на мышах Balb/c

Самкам мышей Balb/c (2•4) (Harlan CPB, Zeist, Нидерланды) в область грудной клетки инъекцируют подкожно 10 или 50 мкг очищенного HC gr-39 в объеме 100 мкл в 3ФР (0,5 М NaCl, 0,01 М натрийфосфатного буфера, pH 7,5), смешанного с неполным адьювантом Фрейнда (IFA), 1:1, в то время как 4 контрольных мышам инъекцируют 3ФР (в IFA, 1:1). Мышей ежедневно проверяют на клинические признаки артрита. Тяжесть артрита оценивают по показателям 0-3 состояния лап (как в статье Giant et al.), при этом показатель 0 - без изменений, показатель 1 - покраснение и опухание, показатель 2 - опухание и появление деформаций, показатель 3 - неподвижность из-за потери флексии (сгибаемости) и экстензии (распространенности).

Индукция толерантности посредством интраназального введения HC gr-39

Вводят интраназально (2•10 мкл) 28 мкг белка 10 самкам мышей Balb/c (под легким наркозом с Енфлгансе) с использованием микрошланга РТ45 и шприца Гамильтона. Антиген вводят в день -15, -10 и -5 перед индукцией артрита. Контрольных животных (n-10) подвергают той же процедуре, но дают только носитель (3ФР) (табл.1).

Иммунологическую толерантность оценивают посредством измерения аллергических реакций замедленного типа (DTH) после сенсibilизации, как описано выше, в день 0 с использованием 10 мкг белка. За сенсibilизацией в день 0 в день 8 следует инъекция 10 мкг HC gr-39 в объеме 50 мкг в подушечку левой задней лапы (контрольное заражение). Реакции DTH измеряют как увеличение объема подушечки $[(\text{опухание левой (мм} \cdot 10^{-3}) - \text{опухание правой (мм} \cdot 10^{-3})] / \text{опухание правой (мм} \cdot 10^{-3}) \cdot 100\%$. Опухание подушечки измеряют с использованием микрометра, созданного на фирме, в 0, 24 и 48 часов после заражения.

Толерантность к индукции артрита у этих же мышей затем контролируют до дня 31 после сенсibilизации и мышей ежедневно проверяют на клинические признаки. Тяжесть артрита оценивают так, как упоминалось выше.

Результаты

Артритогенность HC gr-39

После одной инъекции 50 мкг HC gr-39, смешанного с IFA, у всех мышей постепенно развивается тяжелый артрит (табл.2). Признаки артрита наблюдают впервые на 15-20 день после сенсibilизации в передних лапах у 3 животных из 4. У мыши, у которой нет признаков артрита в передних лапах, артрит развивается в задних лапах на 34 день после сенсibilизации. Течение вызванной HC gr-39 болезни характеризуется рецидивами, происходящими периодически в передних лапах или задних лапах, и

постепенным развитием от легкого артрита к более тяжелому артриту (болезнь развивается на протяжении 62 дней). Весьма часто (>50%) наблюдают симметричное расположение поврежденных суставов, что означает, что в обеих передних лапах или в обеих задних лапах признаки артрита появляются одновременно.

Подобным образом достигают возникновения артрита при использовании в смеси с IFA 10 мкг HC gr-39 вместо 50 мкг. Артритные показатели, однако, иногда более низкие (данные не приводятся). У 3 мышей из 4 развивается тяжелый артрит. У одной мыши на протяжении эксперимента появляются только легкие признаки артрита. На всем протяжении эксперимента у контрольных мышей признаков артрита не обнаруживают.

В целом как 10 мкг, так и 50 мкг белка достаточно для индукции развивающегося артрита у мышей Balb/c. Хроническая природа индукции артрита HC gr-39, характеризующегося повторными рецидивами вместе с симметричным поражением суставов, напоминает развитие болезни при ревматоидном артрите (RA).

Иммуногенная толерантность, измеренная при DTH-анализе

Контрольные мыши, получившие инъекцию HC gr-39 в день 0, показывают сильную антигенспецифическую реакцию DTH, что наводит на мысль, что после сенсibilизации выявляется клеточная иммунная реакция на HC gr-39 (табл.3). Однако интраназальное введение HC gr-39 полностью устраняет DTH-реакции после заражения аутоантигеном, причем таким образом демонстрируется, что HC gr-39-специфические Т-клетки действительно толеризованы.

Замечено, что у 4 из 10 животных нетолеризованной группы артрит развивается в голеностопном суставе, соседнем с местом заражения. Напротив, в толеризованной группе в суставах, ближайших к месту заражения, артрит не развивается, приводя, таким образом, к мысли, что иммунологическая толерантность в отношении HC gr-39 проявляется в результате в защите от развития артрита.

Толерантность к индукции или развитию артрита

Затем толеризованных HC gr-39 и нетолеризованных мышей Balb/c проверяют также на инициацию и развитие артрита.

У всех мышей контрольной (нетолеризованной) группы после сенсibilизации HC gr-39 появляется артрит (табл.4). У семи мышей постепенно развивается тяжелый артрит, в то время как три мыши показывают только легкие признаки (наивысший показатель 2). Напротив, пять мышей толеризованной HC gr-39 группы в ходе эксперимента защищены от развития болезни. Кроме того, двое животных из толеризованной группы показывают только легкие признаки в течение коротких периодов времени. У трех животных развивается более тяжелый артрит с показателями 4.

Представляет интерес, что у толеризованных животных начало артрита как в задних лапах, так и в передних лапах задерживается минимум на 7-9 дней соответственно (фиг. 1). Хотя поражается несколько животных в толеризованной группе,

артритный показатель на животное для передних лап сравним с артритным показателем у нетолеризованных животных. Однако артритный показатель на животное для задних лап иногда ниже у толеризованных животных (фиг.1).

Описанные выше эксперименты демонстрируют на мышах Balb/c артритогенный характер HC gr-39. Течение вызванного HC gr-39 заболевания характеризуется рецидивами, периодически происходящими в передних лапах и/или задних лапах, и постепенным развитием от легкого артрита к более тяжелой форме. Также наблюдают симметричное расположение пораженных суставов, что наряду с наблюдением повторных рецидивов напоминает развитие болезни при ревматоидном артрите. Жесткий артритогенный характер HC gr-39 иллюстрируется фактом, что единственная подкожная инъекция 10 или 50 мкг вызывает признаки артрита у всех животных. Тот факт, что специфические к HC gr-39 Т-клетки действительно выявляются в ответ на сенсibilизацию HC gr-39, демонстрируется путем индукции HC gr-39-специфических DTH-реакций. Эти результаты также подтверждают посредством проявления HC gr-39-специфических пролиферативных реакций *in vitro* у животных, иммунизированных HC gr-39 в подушечку стопы (данные не приводятся). Важно, что у нетолеризованных животных артрит развивается в голеностопном суставе, ближайшем к месту инъекции, что действительно предполагает участие специфических к HC gr-39 Т-клеток в индукции артрита.

Интраназальное введение пептидного антигена используется для индуцирования антигенспецифической иммунной толерантности. Эксперименты показывают, что интраназальное введение HC gr-39 приводит к иммунологической неответственности. DTH-реакции после иммунизации полностью устраняются у мышей, толеризованных HC gr-39, в то время как контрольные мыши показывают антигенспецифическое опухание. Эти наблюдения показывают, что введение HC gr-39 приводит к периферической иммунологической толерантности.

У нетолеризованных животных DTH-реакции сопровождаются артритом в голеностопном суставе (соседнем с областью заражения) у четырех из десяти мышей. Напротив, голеностопные суставы мышей, толеризованных HC gr-39, действительно полностью защищались, что приводит к мысли, что аутореактивные Т-клетки эффективно успокоены. Представление, что толеризация HC gr-39 защищает от развития заболевания, появляется также при наблюдении, что 5 из 10 животных в толеризованной группе совершенно защищены на протяжении эксперимента. Хотя у других пяти животных в группе в конечном счете клинические признаки развиваются, начало артрита существенно отодвигается. Следовательно, можно сделать вывод, что специфические к HC gr-39 Т-клетки вовлекаются в артритогенный процесс, и, что важнее, что путем толеризации этих Т-клеток фармацевтической композицией по

настоящему изобретению развитие артрита можно задержать или подавить.

Пример 2

Методы

Артритогенность коровьего сывороточного белка в 39 кД на мышах Balb/c

Самкам мышей Balb/c (Charles River, Suizfeld, Германия) (4•10) в область грудной клетки инъектируют подкожно 0,2, 1, 5 или 25 мкг очищенного коровьего сывороточного белка в 39 кД в объеме 100 мкл (0,5 М NaCl, 0,01 М натрийфосфатного буфера, pH 7,5), смешанного с неполным адъювантом Фрейнда (IFA), 1:1, в то время как 10 контрольным мышам инъектируют

ЗФР (в IFA, 1: 1). Мышей через день проверяют на клинические признаки артрита. Тяжесть артрита оценивают по показателям 0-3 состояния каждой лапы (как в статье Glant et al.), при этом показатель 0 - без изменений, показатель 1 - покраснение и/или легкое опухание, показатель 2 - сильное опухание и/или появление деформаций, показатель 3 - неподвижность из-за потери флексии и экстензии.

Клонирование кДНК коровьего сывороточного белка gr-39

Библиотеку кДНК лямбда Bluemid(-) коровьей молочной железы (олиго-dT и произвольнонаправленные, изготовлено на заказ Clontech Laboratories Inc.) амплифицируют с использованием штамма XLI Blue MRF в качестве хозяина и осуществляют культивирование библиотеки и получение копий на фильтре по инструкциям изготовителей. Фильтры гибридизуют с фрагментом PvuII кДНК HC gr-39 после мечения ³²P с использованием набора для мечения олигомеров (Pharmacia).

Положительные бляшки амплифицируют, повторно отбирают и ДНК-вставку соответствующих фагов секвенируют с использованием термосеквензного набора (Amersham). Последовательность указана в послед. 3. В нуклеотидной позиции 954 один клон содержит C, в то время как другой содержит T.

Результаты

Артритогенность коровьего сывороточного белка в 39 кД

После одной инъекции 25 мкг коровьего сывороточного белка 39 кД, смешанного с IFA, у всех мышей постепенно развивается артрит (табл.5). Признаки артрита наблюдают сначала на 8-20 дни после сенсibilизации в передних или задних лапах. Течение индуцированного коровьим

молочно-сывороточным белком в 39 кД артрита характеризуется рецидивами, периодически происходящими в задних лапах, и постепенным развитием от умеренного артрита к более тяжелому артриту (развитие заболевания продолжается в течение 70 дней). Очень часто наблюдают симметричное расположение пораженных суставов, означающее, что обе передние лапы или обе задние лапы показывают признаки артрита в одно и то же время.

Подобным образом достигают индукции артрита с использованием вместо 25 мкг 5, 1 или 0,2 мкг коровьего сывороточного белка 39 кД, смешанного с IFA.

У мышей, индуцированных 1 или 0,2 мкг коровьего молочно-сывороточного белка 39 кД, развивается более легкая форма артрита:

у 7 и 6 мышей соответственно развивается легкий артрит, в то время как тяжелый артрит развивается только у 3 и 4 мышей.

По окончании эксперимента вычисляются общие показатели на день наблюдения для каждой группы мышей (фиг.2). После иммунизации 25 мкг коровьего сывороточного белка в 39 кД максимальный показатель 27 (25 мкг) достигается через 30 дней с последующими отчетливыми рецидивами. Когда для иммунизации используют меньшие дозы коровьего сывороточного белка 39 кД, животные иногда показывают более низкий артритный показатель по сравнению с мышами, индуцированными дозой в 25 мкг. Хотя достигаются более низкие показатели, картина рецидивов обнаруживается во всех группах.

У мышей контрольной группы, обработанных ЗФР, иногда наблюдают слабое и временное опухание задних лап. Это явление также наблюдают у первичных, не получавших инъекции животных. Это среднее кумулятивное опухание на день снятия показаний для этих групп мышей имеет среднее значение 3,4 и рассматривается как колебание биологического фона.

Итак, коровий сывороточный белок 39 кД (в количестве как 25, 5, 1, так и 0,2 мкг) способен индуцировать развивающийся артрит у самок мышей Balb/c. Хроническая природа артритной индукции коровьим сывороточным белком 39 кД, характеризующейся рецидивами вместе с симметричным поражением суставов, напоминает развитие заболевания при ревматоидном артрите (РА).

Формула изобретения:

1. Аутоантиген, индуцирующий Т-клеточную толерантность, содержащий аминокислотную последовательность, обнаруживающую, по меньшей мере, 50% гомологию с аминокислотной последовательностью YKLVCYYTSWSQYREGDGSCFPDALDRFLCT HIIYSFANISND (SEQ ID N I), для применения в качестве лекарственного вещества.

2. Аутоантиген по п. 1, отличающийся тем, что указанный белок представляет собой

бычий сывороточный белок 39 кД или человеческий белок YKL-39.

3. Аутоантиген по п. 1, который предназначен для производства фармацевтического препарата для индукции специфической Т-клеточной толерантности к гомологическому аутоантигену у млекопитающих, страдающих от опосредованного Т-клетками разрушения хряща.

4. Фармацевтическая композиция, индуцирующая Т-клеточную толерантность, содержащая один или несколько аутоантигенов, содержащих аминокислотную последовательность, обнаруживающую, по меньшей мере, 50% гомологию с аминокислотной последовательностью YKLVCYYTSWSQYREGDGSCFPDALDRFLCT HIIYSFANISND (SEQ ID N I), и фармацевтически приемлемый носитель.

5. Фармацевтическая композиция по п. 4, отличающаяся тем, что указанный аутоантиген представляет собой бычий сывороточный белок 39 кД или человеческий белок YKL-39.

6. Способ индукции артрита у животных, предпочтительно у мышей, включающий обработку указанных животных активным агентом, отличающийся тем, что названный активный агент представляет собой один или несколько аутоантигенов, содержащих аминокислотную последовательность, обнаруживающую, по меньшей мере, 50% гомологию с аминокислотной последовательностью YKLVCYYTSWSQYREGDGSCFP DALDRFLCTHIIYSFANISND (SEQ ID N I).

7. Способ по п. 6, отличающийся тем, что указанный аутоантиген представляет собой бычий сывороточный белок 39 кД или человеческий белок YKL-39.

8. Аутоантиген, индуцирующий Т-клеточную толерантность с аминокислотной последовательностью SEQ ID N 2.

9. Выделенная ДНК, кодирующая аминокислотную последовательность по п. 8.

10. Выделенная ДНК по п. 9, отличающаяся тем, что имеет последовательность представленную в SEQ IDN 3.

Схема толеризации

День	Толеризованные НС гр-39	Нетолеризованные
-15	28 мкг НС гр-39 интраназально	ЗФР
-10	28 мкг НС гр-39 интраназально	ЗФР
-5	28 мкг НС гр-39 интраназально	ЗФР
0	10 мкг НС гр-39 подкожно	10 мкг НС гр-39 подкожно
8	10 мкг НС гр-39 в подушечку	10 мкг НС гр-39 в подушечку
9	24 часа, DTH	24 часа, DTH
10	48 часов, DTH	48 часов, DTH
0-31	показат.призн.артрита	показат.призн.артрита

DTH = аллергическая реакция замедленного типа

ЗФР = 0,5 М NaCl, 0,01 М натрийфосфатного буфера, pH 7,5.

Таблица 2

Инициация и развитие артрита у мышей Balb/c
сенсibilизированных НС гр-39

Сенсibilизация (n = 4)	Появление артрита (день)		Признаки артрита		
	ПЛ	ЗЛ	нет	легкие	тяжелые
ЗФР, контроль	-	-	4	0	0
10 мкг НС гр-39	-,13,15,57	32,34,36,43	0	1	3
50 мкг НС гр-39	13,15,15,48	29,34,34,53	0	0	4

ПЛ = передние лапы. ЗЛ = задние лапы. Контроль = контрольные-животные. Признаки артрита: нет: показатель =0; легкие: показатель на животное не превышает 2; тяжелые: показатель на животное ≥ 3 .

Таблица 3

Таблица 3 DTH-реакции на НС гр-39 после толеризации
посредством назального введения

Обработка	Средн. % опухания			Артрит голеностопного сустава
	0 час	24 час	48 час	
Контроль (n=10)	-1,3	31,4	38,6	4/10
Толеризов. (n=9)	-0,05	3,7	1,5	0/9

Таблица 4

Инициация и развитие артрита у мышей Balb/c,
толеризованных НС qр-39 и нетолеризованных

Животные	Появление артрита (день)	Признаки артрита		
		нет	легкие	тяжелые
Контрольные (n=10)	13-16	0	3	7
Толеризованные (n=10)	23-24	5	2	3

Начало артрита: появляются первые признаки - поражается наибольшее число животных. Признаки артрита: нет: показатель=0, легкие: показатель на животное не превышает 2, тяжелые: показатель на животное ≥ 4 .

Таблица 5

Инициация и развитие артрита у мышей Balb/c,
сенсibilизированных коровьим сыворочным белком в 39 кД

Сенсibilизация (n=10)	Начало артрита (день)		Признаки артрита		
	ПЛ	ЗЛ	нет	легкие	тяжелые
0,2 мкг кор.мол.- сыв.белка 39 кД	-, -, -, -, -, - -, -, -, 14, 18,	8, 14, 14, 14, 18 18, 18, 30, 54	0	6	4
1 мкг кор. мол.- сыв.белка 39 кД	-, -, -, -, -, - 8, 12, 12, 16, 18	8, 8, 8, 8, 8 8, 14, 16, 18, 18	0	7	3
5 мкг кор. мол.- сыв.белка 39 кД	-, -, -, -, -, - 8, 10, 10, 12, 14	6, 6, 8, 10, 10 16, 16, 18, 20, 30	0	0	10
25 мкг кор.мол.- сыв.белка . 39 кД	-, -, -, -, -, - -, -, -, -, 12	8, 8, 10, 12, 12 14, 14, 18, 18, 20	0	1	9

ПЛ = передняя лапа. ЗЛ = задняя лапа. Признаки артрита: нет: показатель=0; легкие: показатель на животное не превышает 2; тяжелые: показатель на животное ≥ 3 .

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

(1) ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ

(I) ЗАЯВИТЕЛЬ:

(А) ИМЯ: AKZO NOBEL N.V.
(Б) УЛИЦА: Velperweg 76
(В) ГОРОД: Арнем
(Г) СТРАНА: Нидерланды
(Д) ПОЧТОВЫЙ ИНДЕКС (ZIP): 6824 BM
(Е) ТЕЛЕФОН: 0412 666376
(Ж) ТЕЛЕФАКС: 0412 650592

(II) НАЗВАНИЕ ИЗОВРЕТЕНИЯ: Новые пептиды, образованные от аутоантигена, для применения при иммунотерапии аутоиммунных болезней

(III) ЧИСЛО ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ: 3

(IV) ФОРМА КОМПЬЮТЕРНОГО СЧИТЫВАНИЯ:

(А) ТИП СРЕДЫ: дискета
(Б) КОМПЬЮТЕР: совместимый с системой IBM PC
(В) ОПЕРАЦИОННАЯ СИСТЕМА: PC-DOS/MS-DOS
(Г) ПРОГРАММНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ: PatentIn Release #1.0,
версия #1.30 (ЕРО)

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕД. № 1

(I) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

(А) ДЛИНА: 42 аминокислоты
(Б) ТИП: аминокислота
(В) ЦЕПОЧЕЧНОСТЬ: одноцепочечная
(Г) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(II) ТИП МОЛЕКУЛЫ: пептид

(XI) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: ПОСЛЕД. № 1

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

М! Оставить 4 страницы для продолж.послед.№1 и других последов.
со сс.23-26 оригинала

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕД. № 2

(I) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (А) ДЛИНА: 383 аминокислоты
- (Б) ТИП: аминокислота
- (В) ЦЕПОЧЕЧНОСТЬ: двухцепочечная
- (Г) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(II) ТИП МОЛЕКУЛЫ: кДНК

(XI) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: ПОСЛЕД. № 2

Met	Gly	Leu	Arg	Ala	Ala	Gln	Thr	Gly	Phe	Val	Val	Leu	Val	Leu	Leu
1				5				10				15			
Gln	Ser	Cys	Ala	Ala	Tyr	Lys	Leu	Ile	Cys	Tyr	Tyr	Thr	Ser	Trp	Ser
			20				25					30			
Gln	Tyr	Arg	Glu	Gly	Asp	Gly	Ser	Cys	Phe	Pro	Asp	Ala	Ile	Asp	Pro
		35				40					45				
Phe	Leu	Cys	Thr	His	Val	Ile	Tyr	Ser	Phe	Ala	Asn	Ile	Ser	Asn	Asn
	50					55				60					
Glu	Ile	Asp	Thr	Trp	Glu	Trp	Asn	Asp	Val	Thr	Leu	Tyr	Asp	Thr	Leu
65				70					75				80		
Asn	Thr	Leu	Lys	Asn	Arg	Asn	Pro	Asn	Leu	Lys	Thr	Leu	Leu	Ser	Val
			85				90					95			
Gly	Gly	Trp	Asn	Phe	Gly	Ser	Gln	Arg	Phe	Ser	Lys	Ile	Ala	Ser	Lys
			100				105					110			

Thr Arg Ser Arg Arg Thr Phe Ile Lys Ser Val Pro Pro Phe Leu Arg
 115 120 125

Thr His Gly Phe Asp Gly Leu Asp Leu Ala Trp Leu Tyr Pro Gly Trp
 130 135 140

Arg Asp Lys Arg His Leu Thr Thr Leu Val Lys Glu Met Lys Ala Glu
 145 150 155 160

Phe Val Arg Glu Ala Gln Ala Gly Thr Glu Gln Leu Leu Leu Ser Ala
 165 170 175

Ala Val Pro Ala Gly Lys Ile Ala Ile Asp Arg Gly Tyr Asp Ile Ala
 180 185 190

Gln Ile Ser Arg His Leu Asp Phe Ile Ser Leu Leu Thr Tyr Asp Phe
 195 200 205

His Gly Ala Trp Arg Gln Thr Val Gly His His Ser Pro Leu Phe Arg
 210 215 220

Gly Gln Glu Asp Ala Ser Ser Asp Arg Phe Ser Asn Ala Asp Tyr Ala
 225 230 235 240

Val Ser Tyr Met Leu Arg Leu Gly Ala Pro Ala Asn Lys Leu Val Met
 245 250 255

Gly Ile Pro Thr Phe Gly Arg Ser Tyr Thr Leu Ala Ser Ser Lys Thr
 260 265 270

Asp Val Gly Ala Pro Ile Ser Gly Pro Gly Ile Pro Gly Gln Phe Thr
 275 280 285

Lys Glu Lys Gly Ile Leu Ala Tyr Tyr Glu Ile Cys Asp Phe Leu His
 290 295 300

Gly Ala Thr Thr His Arg Phe Arg Asp Gln Gln Val Pro Tyr Ala Thr
 305 310 315 320

Lys Gly Asn Gln Trp Val Ala Tyr Asp Asp Gln Glu Ser Val Lys Asn
 325 330 335

RU 2189248 C2

Lys Ala Arg Tyr Leu Lys Asn Arg Gln Leu Ala Gly Ala Met Val Trp
340 345 350

Ala Leu Asp Leu Asp Asp Phe Arg Gly Thr Phe Cys Gly Gln Asn Leu
355 360 365

Ala Phe Pro Leu Thr Ser Ala Ile Lys Asp Val Leu Ala Glu Val
370 375 380

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕД. № 3

(I) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (А) ДЛИНА: 1152 пары оснований
- (Б) ТИП: нуклеиновая кислота
- (В) ЦЕПОЧЕЧНОСТЬ: одноцепочечная
- (Г) ТОПОЛОГИЯ: линейная

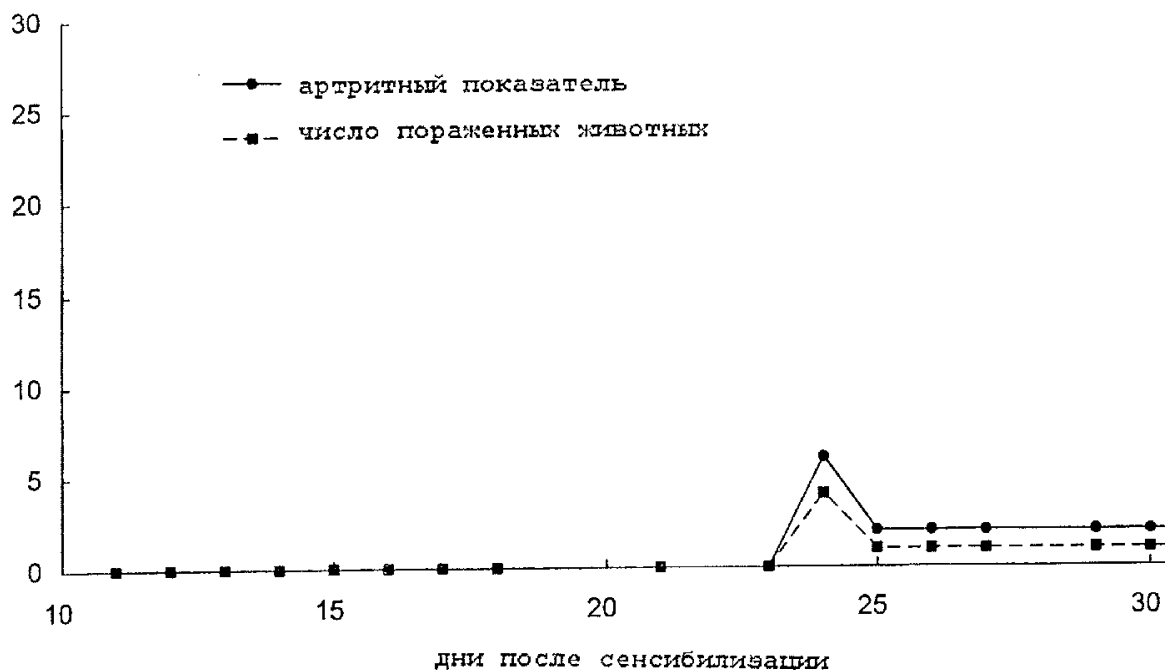
(II) ТИП МОЛЕКУЛЫ: кДНК

(XI) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: ПОСЛЕД. № 3

ATGGGGCTGA GGGCGGCTCA GACAGGTTTT GTGGTCCTGG TGCTGCTCCA GAGCTGTGCT	60
GCATACAAGC TGATCTGCTA CTACACCAGC TGGTCCCAGT ACCGGGAGGG TGATGGGAGC	120
TGCTTCCCAG ACGCCATCGA CCCCTTCCTG TGCACCCATG TCATCTACAG CTTTGCCAAC	180
ATAAGCAACA ATGAGATCGA CACCTGGGAG TGGAAATGACG TGACGCTCTA TGACACACTG	240
AACACACTCA AGAACAGGAA CCCCAACCTG AAGACCCTCC TATCTGTTGG AGGATGGAAC	300
TTCGGTTCTC AAAGATTTTC CAAGATAGCT TCCAAGACCC GGAGTCGCAG GACTTTCATC	360
AAGTCGGTGC CACCATTCTT GCGGACCCAT GGCTTTGATG GACTGGACCT AGCATGGCTC	420
TACCCCGGGT GGAGAGACAA GCGGCATCTC ACCACTCTGG TCAAGGAAAT GAAGGCTGAG	480
TTTGTAAGGG AAGCCCAAGC AGGCACAGAG CAGCTTCTGC TCAGTGCAGC AGTACCTGCA	540

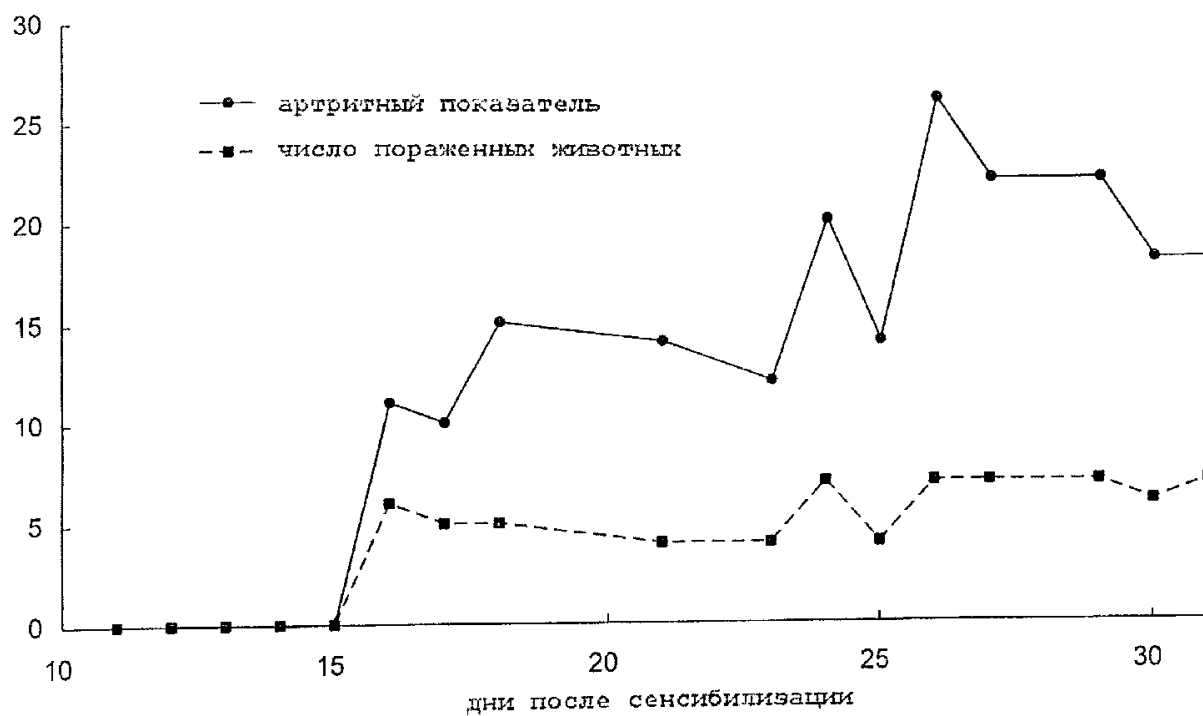
GGGAAGATTG CTATTGACAG AGGCTATGAC ATCGCCCAGA TATCCCGACA CCTGGACTTC	600
ATCAGCCTTT TGACCTATGA CTTTCACGGA GCCTGGCGCC AGACAGTCGG ACACCACAGC	660
CCCCTGTTTC GAGGCCAGGA AGATGCAAGT TCTGACAGAT TCAGTAACGC TGACTACGCT	720
GTGAGCTACA TGCTGAGGCT GGGGGCTCCA GCCAATAAGC TGGTGATGGG TATCCCCACT	780
TTTGGGAGGA GCTACACTCT GGCCTCTTCC AAGACAGATG TGGGAGCCCC CATCTCAGGG	840
CCAGGAATTC CAGGCCAGTT CACCAAGGAG AAAGGGATCC TTGCCTATTA TGAGATCTGT	900
GACTTCCTCC ACGGAGCCAC CACCCACAGA TTCCGTGACC AGCAGGTCCC STATGCCACC	960
AAGGGCAACC AGTGGGTGGC GTATGACGAC CAGGAGAGTG TCAAAAACAA GGCACGGTAC	1020
CTGAAGAACA GGCAGCTGGC TGGCGCCATG GTGTGGGCCC TGGACTTGGA TGACTTCCGG	1080
GGCACCTTCT GTGGGCAGAA CCTGGCCTTT CCTCTCACAA GTGCCATCAA AGATGTGCTT	1140
GCTGAGGTGT AG	1152

Артритный показатель для передней лапы
у толеризованных животных



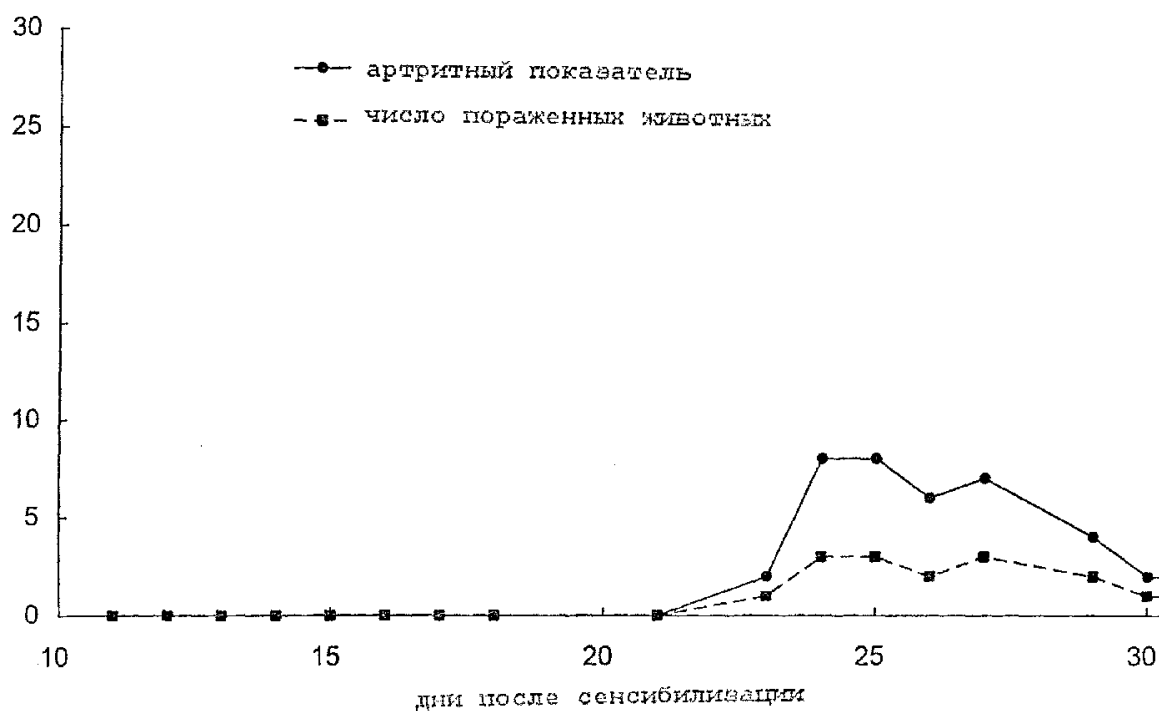
Фиг. 1Б

Артритный показатель для задней лапы
у нетолеризованных животных



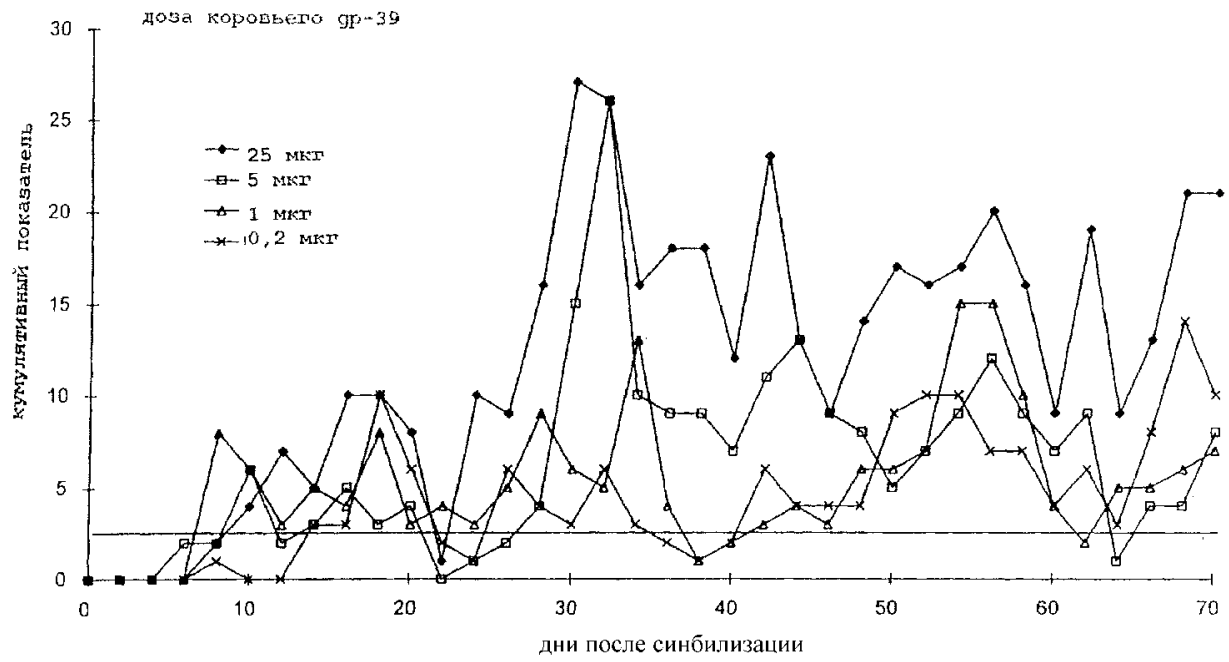
Фиг. 1В

Артритный показатель для задней лапы
у толеризованных животных



Фиг. 1Г

Артритный показатель для задних лап



Фиг. 2

RU 2189248 C2

RU 2189248 C2