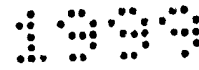


P9602559



KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

4A⁴

75735

62.941/SZE

KIVONAT

Eljárás humán immunállapot szuppresszor komponens meghatározására
és eszköz annak kivitelezésére

Ivan Nikolaevich GOLOVISTIKOV, MOSZKVA, Oroszország,

Leonid Yazonovich KACHARAVA, TBILICI, Georgia

A bejelentés napja: 1995. 03. 16.

Elsőbbsége: 1994. 03. 18. (94008170) RU

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/RU95/00046

A nemzetközi közzététel száma: WO 95 125 956

A találmány tárgya eljárás a humán immunállapot egy szuppresszor komponensének meghatározására, ami abban áll, hogy perifériális vért vesznek, ebből mononukleáris sejtek (MNC) szuszpenzióját állítanak elő, majd az említett szuszpenziót két egyforma részre osztják, az egyik részben levő MNC-eket szuppresszor aktivátor nélkül tenyésztik, a második részben levő MNC-eket egy szuppresszor aktivátorral tenyésztik, az MNC-eket kimossák a tenyészközegből, blokkolják a szaporodást, egy normál donorból újonnan izolált MNC-eket ^{nek} adva mindegyik előzőekben említett MNC részhez, fitohemagglutininnel egyenlő arányban serkentve teszt tenyészetek előállítására céljából, ezeket ^{ik} tenyésztve, majd tovább ^{ik} értékelve a szaporodást az említett teszt tenyészetekben és meghatározva ^{zár} a szuppressziós értékeket az említett teszt tenyészetekben levő szaporodási szintek arányai alapján.

Fedvák

P9602559



62.941/SZE

S.B.G. & K.
Nemzetközi
Szabadalmi Iroda
H-1062 Budapest, Andrásy út 113.
Telefon: 34-24-950, Fax: 34-24-323

**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY**

A

Eljárás humán immunállapot szuppresszor komponens meghatározására
és eszköz annak kivitelezésére

Ivan Nikolaevich GOLOVISTIKOV, MOSZKVA, Oroszország,

Leonid Yazonovich KACHARAVA, TBILIC¹²I, Georgia

Feltalálók: Ivan Nikolaevich GOLOVISTIKOV, MOSZKVA, Oroszország,

Leonid Yazonovich KACHARAVA, TBILIC¹²I, Georgia,

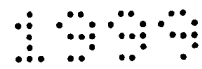
Khallar Abdumuslimovich ALIKHANOV, MOSZKVA, Oroszország

A bejelentés napja: 1995. 03. 16.

Elsőbbsége: 1994. 03. 18. (94008170) RU

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/RU95/00046

A nemzetközi közzététel száma: WO 95/25956



A jelen találmány tárgya gyógyászati készítmény, pontosabban eljárás T-szuppresszor aktivitás diagnosztikai kiértékelésére, a humán immunállapot szuppresszor komponensének meghatározására, és ezek végrehajtására.

Ismert a méhlepény eredetű β -I glikoprotein, amely a trofoblasztos β -I-glikoprotein (TBG) analógja, amelyet a hematopoiotikus vérsejtek növekedését és szaporodását serkentő anyagként használnak [5,169,835 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentés, c1. A61K 35/50, (1989)].

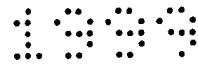
Mindazonáltal ezt az ismert vegyületet nem használták humán immunállapot szuppresszor komponensének meghatározására.

A TBG alkalmazása ismert a terhesség diagnosztizálására és lefolyásának prognosztizálására [L.G. Sotnikova, I.N. Golovistikov és munkatársai: "The Role of β -I-glikoprotein Trophoblast in Diagnosing and Prognosticating Pregnancy", Metodicheskije Recommendatsii, Moszkva (1984)]. Mindazonáltal az említett munkában nem ismertetik a TBG alkalmazásának lehetőségét a humán immunállapot egy szuppresszor komponensének diagnosztizálására.

Ismert egy eljárás az immunállapot egy szuppresszor komponensének meghatározására, ami abban áll, hogy perifériális vért veszünk, majd ebből tiszta limfociták szuszpenzióját állítjuk elő, szuppresszió-aktivátoros és ilyen aktivátor nélküli teszt tenyészetek készítéséhez, majd kiértékeljük a szaporodási szinteket [Dutton R.W.: "Inhibitory and Stimulatory Effects of Concanavalin A on the Response of Mouse Spleen Cells Suspension to Antigen", J. Exp. Med. 138, 1496-1505 (1973)].

Ehhez a módszerhez azonban egy nehezen hozzáférhető anyagra, a Concanavalin A-ra van szükség mint szuppresszor aktivátorra.

Ismert egy eljárás a humán immunállapot egy szuppresszor komponensének meghatározására, ami abban áll, hogy perifériális vért veszünk, ebből mononukleáris sejtek (MNC) szuszpenzióját állítjuk elő, majd az említett szuszpenziót két egyforma

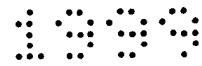


részre osztjuk, az egyik részben levő MNC-eket szuppresszor aktivátor nélkül tenyésztjük, a második részben levő MNC-eket egy szuppresszor aktivátorral tenyésztjük, az MNC-eket kimossuk a tenyészközegből, blokkoljuk a szaporodást, egy normál donorból újonnan izolált MNC-eket adva mindegyik előzőkben említett MNC részhez, fitohemagglutininnel egyenlő arányban serkentve teszt tenyészetek előállítása céljából, ezeket tenyésztve, majd tovább értékelve a szaporodást az említett teszt tenyészetekben és meghatározva a szuppressziós értékeket az említett teszt tenyészetekben levő szaporodási szintek arányai alapján [By Lien Shov, Stanley A. Schwartz és Robert A. Good: "Suppressor Cell Activity after Concanavalin A treatment of Lymphocytes from Normal Donors", J. Exp. Med. 143(5), 1100-1110 (1976)].

Azonban az említett módszerhez is szükség van az előzőkben említett nehezen hozzáférhető anyagra, a concanavalin A-ra.

A jelen találmány tárgya egy olcsóbb eljárás a humán immunállapot egy szuppresszor aktivitásának meghatározására, egy könnyen elérhető készítmény alkalmazásával, amelynek immunkorrigáló aktivitása van, és nem okoz allergiás reakciókat.

Az említett célt úgy érjük el, hogy trofoblasztos β -I-glikoproteint (TBG) használunk a humán immunállapot szuppresszor komponensének meghatározására, és a humán immunállapot szuppresszor komponensének meghatározási módszere abban áll, hogy perifériális vért veszünk, ebből mononukleáris sejtek (MNC) szuszpenzióját állítjuk elő, majd az említett szuszpenziót két egyforma részre osztjuk, az egyik részben levő MNC-eket szuppresszor aktivátor nélkül tenyésztjük, a második részben levő MNC-eket egy szuppresszor aktivátorral tenyésztjük, az MNC-eket kimossuk a tenyészközegből, blokkoljuk a szaporodást, egy normál donorból újonnan izolált MNC-eket adva mindegyik előzőkben említett MNC részhez,



fitohemagglutininnel egyenlő arányban serkentve teszt tenyészetek előállítására céljából, ezeket tenyésztve, majd tovább értékelve a szaporodást az említett teszt tenyészetekben és meghatározva a szuppressziós értékeket az említett teszt tenyészetekben levő szaporodási szintek arányai alapján, a jelen találmány szerint trofoblasztos β -I-glikoproteint (TBG) alkalmazva 3-120 $\mu\text{g}/1$ ml MNC szuszpenzió dózisban.

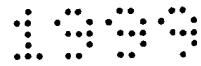
A mononukleáris sejtek (MNC) szuszpenzióját úgy állítjuk elő, hogy a sejteket egylépcsős Ficoll-urotrust gradiensen üleptjük, majd 48 óra hosszat tenyésztjük. A szaporodást az MNC-k mitomicin C-vel való kezelésével állítjuk le, majd mindegyik teszt tenyészetet 72 óra hosszat tenyésztjük.

A jelen találmány megvalósítása során első lépésként MNC szuszpenziót készítünk a Ficoll-urotrust egylépcsés gradiensen való centrifugálással (Boyum féle módszer) kapott sejtekből.

A perifériális vért a beteg karvénájából vesszük, majd egyszerre tesszük heparin oldatot tartalmazó csövekbe (1 ml vér = 20-30 heparin egység). A vért azután Hank féle oldatban 1:2 arányban hígítjuk (Ca^{2+} és Mg^{2+} nélkül), majd Ficoll-urotrust gradiensre rétegezzük (a sűrűség 1,078).

A centrifugálást 400 x g-vel végezzük 30 percig. Az interfázisban levő MNC diszperziót egy centrifugacsőbe tesszük, Ca^{2+} és Mg^{2+} nélküli Hank oldatot adunk hozzá, majd 3 centrifugálást végzünk egymás után (mindegyik 10 perc), hogy a sejteket kimossuk a Ficoll-urotrust oldatból. A harmadik centrifugálás után az MNC maradékot 1 ml 199-es táptalajban szuszpendáljuk, majd a mononukleáris sejtek számát Goryajev kamerával határozzuk meg.

A második lépésben az MNC-eket 2 egyenlő részre osztjuk, az első részt szuppresszor aktivátor nélkül tenyésztjük, a második részt a szuppresszor



aktivátorral tenyésztjük, és a trofoblasztos β -I-glikoproteint (TBG) használjuk az említett aktivátorként.

Az MNC-ket penicillines edényekben tenyésztjük, #14,5-ös gumidugókkal, 37 °C-on. A tenyésztő táptalaj RPMI-1640, 20% szérum IV (AB) csoporttal és 300 mg glutaminnal kiegészítve.

Mindegyik edény 5×10^6 sejtet tartalmaz 2,0 ml komplett táptalajban.

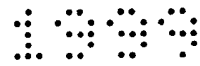
A TBG-t 3-120 μ g-os dózisban adjuk a tenyészetekhez a szuppresszor indukálására.

A sejteket 48 óra hosszat tenyésztjük. Az MNC-ket azután kimossuk a tenyésztő táptalajból, majd a szaporodást mitomicin C hozzáadásával (40 μ g/ml, 30 perc, 37 °C) állítjuk le. A sejteket háromszor mossuk jégbehűtött, 5% IV (AB) szérummal kiegészített 199-es táptalajjal. A sejtmaradékot felszuszpendáljuk, a sejtmag-tartalmú sejteket megszámláljuk, az életképes sejtek százalékát 0,1% tripánkék oldattal határozzuk meg, majd a kapott szuszpenziót a kívánt koncentrációra hígítjuk. Mindegyik műveletet külön végezzük el a kontroll sejtekkel és a TBG-vel serkentett sejtekkel, majd szilikon edényeket használunk a sejtek mosására.

A következő lépésben egy normál donorból újonnan izolálunk limfocitákat (ezeket a limfocitákat előre stimuláltuk fitohemagglutininnal (PHA), és reagáló teszt sejtekként használjuk őket), ezeket egyenlő arányban hozzáadjuk a kontroll és a TBG-vel kezelt limfocitákhoz ($0,5 \times 10^6$: $0,5 \times 10^6$ sejt/ml), ahhoz, hogy teszt tenyészeteket kapjunk. A tenyésztést 72 óra hosszat végezzük. Ezután kiértékeljük a teszt tenyészetek szaporodását N^3 -timidin alkalmazásával, majd a szuppressziót az okozott szaporodás-elmaradás alapján értékeljük ki.

A szuppressziós indexet (SI) az alábbi képlet alapján értékeljük ki:

$$SI = \left(1 - \frac{\text{impulzusszám/perc a TBG-tartalmú teszt-tenyészetben}}{\text{impulzusszám/perc a TBG nélküli teszt-tenyészetben}}\right) \times 100\%$$



Ahhoz hogy kiértékeljük a szuppresszor komponenst egy normál donorban, egy ismert módszer szerinti diagnosztikai vizsgálatot végeztünk [By Lien Shov, Stanley A. Schwartz és Robert A. Good: "Suppressor Cell Activity after Concanavalin A treatment of Lymphocytes from Normal Donors", J. Exp. Med. 143(5), 1100-1110 (1976)], valamint egy diagnosztikai vizsgálatot is végeztünk, a jelen találmány szerinti módszerrel, egy normál donorokból álló csoporton (100 fő). Az így kapott eredmények alapján a concanavalin A-val kapott T-szuppresszor aktivitás normál értéke $56,8\% \pm 4\%$, míg a jelen találmány szerinti módszerrel meghatározott érték $63,4\% \pm 4,7\%$.

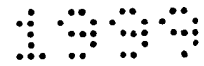
A jelen találmányt az alábbi példákon keresztül mutatjuk be.

1. Példa

V. beteg (30), a kórházba "disszeminált szklerózis, cerebromedulláris forma" diagnózissal vették fel, akut állapotban. A perifériális vérben concanavalin indukcióval a T-szuppresszor aktivitás 15% volt, amit a humán immunállapot szuppresszor komponensének meghatározására ismert módszerrel határoztunk meg. Ezzel egyidőben meghatároztuk a T-szuppresszor aktivitást ugyanannak a betegnek a vérében, a jelen találmány szerinti módszert alkalmazva (TBG indukcióval), és az így kapott érték 17% volt.

2. Példa

S. beteg (nő, 40), a kórházba "disszeminált szklerózis, cerebromedulláris forma" diagnózissal vették fel, akut állapotban. A perifériális vérben concanavalin indukcióval a T-szuppresszor aktivitás 16% volt, amit a humán immunállapot szuppresszor komponensének meghatározására ismert módszerrel határoztunk meg. Ezzel egyidőben meghatároztuk a T-szuppresszor aktivitást ugyanannak a



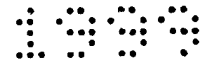
betegnek a vérében, a jelen találmány szerinti módszert alkalmazva (TBG indukcióval), és az így kapott érték 19% volt.

150, disszeminált szklerózisban és reumás arthritis-ben szenvedő beteget vizsgáltunk. Kimutattuk, hogy a jelen találmány szerinti módszerrel meghatározott T-szuppresszor aktivitás megegyezik az ismert módszerekkel kapott értékkel.

Ezzel megerősítettük, hogy a TBG nagyon hatékony eszköz a humán immunállapot szuppresszor komponensének meghatározására.

A humán immunállapot szuppresszor komponensének a jelen találmány szerinti módszerrel való meghatározási módszerének, valamint az ebben a módszerben használt egyéb eljárások előzőekben említett előnyei lehetővé teszik, hogy az említett módszert széles körben alkalmazzák mind tudományos célokra, mind a klinikai gyakorlatban.

Emellett meg kell még jegyezni, hogy a concanavalin alkalmazása az előzőekben említett betegségek kezelésében ellenjavallt, a toxicitása miatt, míg a TBG (amit a humán trofoblasztok termelnek) nem mutat toxicitást és nem okoz allergiás reakciókat. Ez lehetővé teszi, hogy az említett készítményt a gyógyászatban alkalmazzuk.



SZABADALMI IGÉNYPONTOK

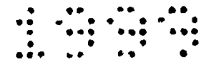
1. Eljárás a trofoblasztos β -I-glikoprotein (TBG) alkalmazására a humán immunállapot szuppresszor komponensének meghatározásában.

2. Eljárás a humán immunállapot szuppresszor komponensének meghatározására, azzal jellemezve, hogy perifériális vért veszünk, ebből mononukleáris sejtek (MNC) szuszpenzióját állítjuk elő, majd az említett szuszpenziót két egyforma részre osztjuk, az egyik részben levő MNC-eket szuppresszor aktivátor nélkül tenyésztjük, a második részben levő MNC-eket egy szuppresszor aktivátorral tenyésztjük, az MNC-eket kimossuk a tenyészközegből, blokkoljuk a szaporodást, egy normál donorból újonnan izolált MNC-eket adva mindegyik előzőekben említett MNC részhez, fitohemagglutininnel egyenlő arányban serkentve teszt tenyészetek előállítása céljából, ezeket tenyésztve, majd tovább értékelve a szaporodást az említett teszt tenyészetekben és meghatározva a szuppressziós értékeket az említett teszt tenyészetekben levő szaporodási szintek arányai alapján, trofoblasztos β -I-glikoproteint (TBG) alkalmazva az említett szuppresszor aktivátorként.

3. A 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a TBG-t 3-120 μ g/1 ml MNC szuszpenzió dózisban alkalmazzuk.

4. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az MNC szuszpenziót a sejtekből egy lépéses Ficoll-urotrust gradiensen végzett elválasztással állítjuk elő.

5. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az MNC tenyésztését 48 óra hosszat végezzük.



6. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szaporodást az MNC-k mitomicin C-vel való kezelésével állítjuk le.

7. A 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy minden teszt tenyészetet 72 óra hosszat tenyésztünk.

A meghatalmazott

ifj. Szentpéteri Ádám
Szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. & K. Nemzetközi
Szabadalmi Iroda tagja
H-1063 Budapest, Andrássy út 133.
06-1-460-1111

Szentpéteri Ádám