P02 00552

Apoptózist indukáló hatóanyagok alkalmazása (auto)immun betegségek kezelésében

K I V O N A T

A találmány tárgya a molekuláris biológiára alapuló technikák szakterületére esik. A találmány tárgyát közelebbről (auto)immun betegségek és/vagy gyulladásos rendellenességek kezelése és kockázatának diagnózisa képezi. A találmány tárgya még közelebbről apoptózis indukálása olyan sejtekben, amelyek (auto)immun betegségekkel asszociáltak vagy kapcsolatosak.

A találmány szerinti megoldás autoimmun rendellenességek terápiájában és diagnózisában hasznosítható.

Aktaszámunk: 94989-480/PÁ

P02 00552 KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

Apoptózist indukáló hatóanyagok alkalmazása (auto)immun betegségek kezelésében

A találmány tárgya a molekuláris biológiára alapuló technikák szakterületére esik. A találmány tárgya a jövőben esetlegesen kialakuló betegségek kockázatának diagnosztizálási területéhez is sorolható.

A találmány tárgyát közelebbről (auto)immun betegségek és/vagy gyulladásos rendellenességek kezelése és kockázatának diagnózisa képezi. Amennyiben a leírásban a továbbiakban e betegségek bármelyikét említjük, beleértjük a másikat is, hacsak ezt kifejezetten ki nem zárjuk. A találmány tárgya még közelebbről apoptózis indukálása olyan sejtekben, amelyek (auto)immun betegségekkel asszociáltak vagy kapcsolatosak.

Az autoimmun betegségek olyan súlyos betegségek csoportját alkotják, amelyet gyulladásos rendellenességek, például Crohn-betegség, krónikus hasnyálmirigy-gyulladás, cukorbetegség néhány formája, fekélyesedő vastagbélgyulladás és reumatoid artritisz jellemez [Bischoff és mtsai., (1996); Firestein, (1995), (1998); Liblau és mtsai., (1995)]. A betegségcsalád legfontosabb képviselőinek egyikeként a reumatoid artritiszt (RA) írjuk le részletesen, mint a találmány szerinti megoldás tipikus alkalmazását.

RA az ízületeket, de más szerveket is megtámad. A betegség a felnőtt populáció 1-2%-át megtámadja világszerte.

Aktaszámunk: 94989-480/PÁ

Nőket nagyobb gyakorisággal támadja meg, mint a férfiakat, a nemek aránya 3:1. A klinikai spektrum, valamint a betegség lefolyása jelentősen különbözhet. Enyhe megbetegedés esetén az ízületi gyulladás korlátozott ideig lehet jelen, és az ízületek nem károsodnak. Ez a lefolyás viszonylag ritka. A legtöbb páciensben a betegség aktivitása folyamatosan magas vagy változó mértékű. Ez kapcsolódhat a betegség rosszabb kimenetelével, rokkantsággal és ízületek károsodásával [Van Zeben és mtsai., (1994)].

RA fokozott halálozási kockázattal asszociált [Wolfe, (1990)]. Az ízületek károsodása az RA korai szakaszában elkezdődik. A lepusztulás az RA kezdete utáni első 2 évben a leggyorsabb. A közelmúltban nyilvánvalóvá vált, hogy a lepusztulás folyamatosan súlyosbodik az azt követező években [Sharp és mtsai., (1991); Van der Heijde és mtsai., (1992)].

Az RA etiológiája felderítetlen maradt, bár az RA patofiziológiája dinamikus kutatási területnek számít [Breedveld, (1998)]. Ezen drámai betegség oka egyszerűen úgy magyarázható, hogy a gyulladást és a szövetpusztulást limfociták ízületi hártyába való beáramlása iniciálja. Ezek plazmasejteket, masztocitákat, makrofágokat, és különösen fibroblaszt-szerű szinoviocitákat stimulálnak arra, hogy gyulladást okozó mediátorokat, például alfa-tumornekrózis-faktort és interleukin-1-et termeljenek. Ezek a mediátorok mátrix-lebontó aktivitásokat képesek indukálni, amelyek végül ízületi károsodáshoz vezetnek. Ezen aktivitások közé tartozhat fibroblaszt-szerű szinoviociták (a továbbiakban

FLS-ként rövidítjük) aktiválása kollagenáz-termelésre, csont- és porcfelszívódás (reszorpció) indukciója, valamint kemokinek és adhéziós molekulák és HLA-molekulák fokozott mértékű expressziója, amelyek mind az immunválasz további stimulálásához vagy a sejtek ízületi térbe való, további beáramlásához vezetnek [Breedveld, (1998)].

A közelmúltban adatok jelentek meg arra vonatkozóan, hogy FLS irreverzibilisen megváltozott RA-ban, és egy autonóm folyamat lehetővé tette, hogy aktiválva maradjanak még azután is, hogy kikerültek a gyulladt ízületi közegből. A sejtek továbbra is képesek voltak vándorolni és behatolni további exogén stimuláció nélkül, bár csökkent mértékben a stimulált helyzethez képest [Firestein, (1995)]. Bár a sejtosztódás lehet az egyik mechanizmusa az FLS felhalmozódásának, szabályozatlan sejtosztódásra és DNS-szintézisre utaló bizonyítékot találtak az intimában (érbelhártyában). A találmány tárgyát képezi apoptózis indukálása ezekben a sejtekben, amely hasznos a betegség következményeinek leküzdésében. Ha a proliferáció mértéke ténylegesen viszonylag alacsony, akkor a sejtpusztulás sebességének abnormalitásai hozzájárulhatnak az érbelhártya hiperpláziájához ízületihártya-gyulladásban. Az apoptózis mértékét reumás ízületi hártyában csak a közelmúltban vizsgálták [Firestein és mtsai. (1995), (1995a)]. Az apoptózis jellemzői: sejtek összezsugorodása, szegmentálódás sejtek zsugorodásával, a sejtmag szegmentálódása, DNS kondenzálódása és hasadása domén-méretű fragmensekre, azt követően a sejtek többségében internukleoszómás degradáció. Végül, az apoptózison átment

sejtek membránba zárt apoptotikus testekre esnek szét, amelyeket gyorsan bekebeleznek a szomszédos sejtek fagocitózis útján. Ezért az apoptózis sokkal kisebb mértékű szövetpusztítást okoz, mint a nekrózis, amely a sejtpusztulás nemfiziológiai típusa [Wyllie és mtsai., (1980); Arends és Wyllie, (1991)].

Bár abnormális, csökkent mértékű apoptózis mechanizmusa RA-ban nem teljesen ismert, úgy tűnik, hogy defektív p53-funkció kimagasló szerepet játszik szinoviociták túlélésében és pusztulásában [Conway és mtsai., (1995)]. Mountz és munkatársai (1994) leírták, hogy a defektív apoptózis kapcsolatba hozható más autoimmun betegségekkel, például szisztémás lupusz eritematózussal, érgyulladás (vasculitis) szindrómáival, Behcet-szindrómával és gyulladásos bélbetegséggel. Ezért a találmány tárgyát képező, RA és más (auto)immun betegségek kezelésére szolgáló terápiás megközelítésben megkerüljük az ilyen sejtekben lévő apoptózis-blokkolást, (alternatív) apoptotikus folyamatsor indukálásával.

A találmány tárgya tehát apoptózist indukáló ágens alkalmazása gyulladásos rendellenességek és/vagy immunológiai betegségek kezelésére szolgáló gyógyszer előállítására. A találmány tárgya apoptózist indukáló ágens alkalmazása különösen autoimmun betegségek kezelésére szolgáló gyógyszer előállítására. A fentebb említett, valamennyi rendellenesség/betegség esetén a károsodás olyan károsodást jelent, melyet közvetlenül vagy közvetve bizonyos sejtalkészlet okoz (például RA-ban FLS), amely valamilyen módon

kikerült a kontroll alól (túlzott mértékű proliferáció vagy más aktivitás, vagy szabályzott sejtpusztulás hiánya, vagy nekrózis vagy hasonló). Ezért hasznos, hogy apoptózis indukálása lehetővé váljon ilyen sejt-alkészletben úgy, hogy ilyen sejteket apoptózist indukáló ágens hatásának teszünk ki. Az apoptózis előnyösebb a nekrotikus sejtpusztulásnál, mivel kevesebb bomlástermékhez vezet (lásd fentebb). A találmány szerinti megoldásban bármilyen módszer alkalmazható, amely apoptotikus aktivitást biztosít a célsejtekben. Azonban előnyösen az apoptotikus aktivitást fehérjeszerű anyag biztosítja, melyet olyan gén kódol, melyet a célsejtbe juttatunk gént célba juttató hordozó alkalmazásával. Gént célba juttató hordozót a leírásban úgy definiálunk, mint bármilyen olyan hordozót, amely képes gént célba juttatni sejtbe, amely lehet akár virális, akár nem-virális eredetű. A gént úgy kell célba juttatni, hogy képes legyen fukcionálisan expresszálódni a célsejtben.

Az apoptózist indukáló ágenst vagy a gént célba juttató hordozót tartalmazó gyógyászati készítmény hasonló olyan gyógyászati készítményekhez, amelyek bizonyos célsejt-populációkban sejtpusztulást indukáló, másféle ágenseket tartalmaznak. Gént célba juttató hordozókra, például adenovírusokra sok formát leírtak már sokan mások, amelyek gének célba juttatására szolgáltak bizonyos számú sejtbe, ezért ilyen formák további kidolgozására itt nincsen szükség. Más, gént célba juttató hordozót tartalmazó formák összeállíthatók ezek analógiájára, vagy a szakirodalomban leírtak szerint.

Abból a célból, hogy ki tudjunk kapcsolni a találmány szerinti, gént célba juttató hordozók bármilyen nemkívánatos hatását, előnyösen „öngyilkos" gént adunk a hordozók genetikai információjához. Tehát a találmány tárgyát képezi olyan alkalmazás, amelyben a gént célba juttató hordozó továbbá öngyilkos gént tartalmaz. Természetesen előnyös, ha a gén indukálható promóter vezérlete alatt van. Ismert öngyilkos gének lehetnek timidin kinázokat kódoló gének vagy más citotoxikus, fehérjeszerű anyagok.

A találmány szerinti, gént célba juttató hordozók nemkívánatos hatásainak további csökkentése céljából előnyös, ha a gént célba juttató hordozó tropizmussal rendelkezik (vagy ez biztosítva van vele) célsejtjei irányában, ami azt jelenti, hogy nagyobb kötési és/vagy belépési affinitást mutat a célsejtek felé, mint a többi sejt felé. Ezt egyszerűen úgy érhetjük el, hogy olyan gént célba juttató hordozót szelektálunk, amely tropizmussal rendelkezik, vagy ilyen tropizmust létrehozunk a gént célba juttató hordozóban, amely tropizmus olyan organizmusból vagy anyagból származik, amely fokozott affinitással rendelkezik a célsejt irányában. Ha nem áll rendelkezésre ilyen organizmus vagy anyag, elő lehet azt állítani olyan random szekvenciák fág-„display" szkrínelésével vagy más szkrínelési technika alkalmazásával, amelyek affinitással rendelkeznek a célsejtek irányában. Ha a gén célba juttató hordozót úgy állítjuk elő, hogy eltérő célsejt irányában rendelkezik tropizmussal, mint eredeti tropizmusa, akkor ezt gyakran célzott génterápiának hívjuk. Tehát a találmány tárgyát képezi

olyan alkalmazás is, amelyben a gént célba juttató hordozó tropizmussal rendelkezik hematopoetikus sejtek, vagy előnyösen fibroblaszt-szerű szinoviociták irányában. A találmány alternatív tárgyát képezi a találmány szerinti alkalmazás, amelyben a gént célba juttató hordozó célsejtre irányító eszközzel van ellátva, a célsejtre irányító eszköz speciálisan fibroblaszt-szerű szinoviocitákra irányít. A találmány szerinti, gént célba juttató hordozó előnyösen rekombináns adenovírus. Rekombináns adenovírusok jól ismertek a génterápia területén, és további kidolgozásukra itt nincsen szükség. Előállításukra és alkalmazásukra szolgáló, biztonságos módszereket számos közleményben leírtak.

A találmány szerint előnyös, apoptózist indukáló ágens apoptin vagy funkcionális fragmense, származéka vagy ekvivalense. Az apoptin csirkeanémia-vírusból származó fehérje, és lentebb részletesebben tárgyaljuk. Funkcionális származékon olyan fehérjét értünk, amelyben számos aminosav módosítva van, vagy hozzá van adva az eredetihez anélkül, hogy az aktivitást befolyásolná (ez azt jelenti, hogy még indukál apoptózist, de más mértékben, nagyobb vagy kisebb mértékben). Természetesen ugyanez érvényes a fragmensekre vagy fragmensek származékaira. Funkcionális ekvivalensek az apoptin más organizmusokban előforduló megfelelőit (csirkeanémia-vírusból származó 3. fehérje) jelentik. Az apoptin nagyon fontos előnye más apoptózist indukáló ágensekkel szemben, hogy szignifikáns mértékben nem mutat aktivitást normál sejtekben, míg a találmány szerinti megoldásban kimutatjuk, hogy (auto)immun betegségekben szerepet játszó,

abnormális sejtekben fejti ki hatását.

Szintén előnyös, hogy az apoptin-expresszió indukálható legyen.

A találmány tárgya továbbá annak a valószínűségnek a tesztelése, hogy a sejtek abnormálissá válnak (auto)immun betegségekben. Ebben a tesztben apoptotikus aktivitást juttatunk olyan sejtekbe, amelyekről feltételezzük, hogy képesek abnormálissá válni, például apoptint vagy származékát vagy fragmensét kódoló génnel, és azután a sejteket stresszsznek, például ozmotikus stressznek, hősokknak, fertőző stressznek, UV-nek, stb. vetjük alá. Azok a sejtek, amelyek hajlamosak az abnormalitásra, a kezelés után apoptózison mennek keresztül. Azok a sejtek, amelyek nem hajlamosak erre, többnyire változatlanok maradnak. Így annak a valószínűségét lehet vizsgálni, hogy egy egyénben kialakulhat-e (auto)immun betegség a jövőben.

Csirkeanémia-vírusból (CAV-ból) származó apoptin-fehérje csirkeredetű transzformált sejtekben *in vitro* apoptózist képes indukálni [Noteborn és mtsai., (1994); Noteborn és Koch, (1995); Noteborn és mtsai., Noteborn és Van der Eb, (1998)]. Az apoptin kisméretű fehérje, csak 121 aminosav hosszúságú, amely inkább bázikus, és prolinban, szerinben és treoninban gazdag [Noteborn és mtsai., (1991)].

Az apoptin, és apoptin-szerű aktivitással rendelkező más fehérjék humán malignus és transzformált sejtvonalakban is képesek apoptózist indukálni, de nem-transzformált humán sejtekben nem képesek apoptózist indukálni [Danen-Van Oorschot és mtsai., (1997); Noteborn és mtsai., (1998a)].

Kimutatták, hogy az apoptin-indukált apoptózis funkcionális p53 hiányában végbemegy [Zhuang és mtsai., (1995a)], és Bcl-2, Bcr-Abl [Zhuang és mtsai., (1995); (1995b)], BAG-1-jelű Bcl-2-asszociált fehérje, valamint marhában előforduló himlő vírusából származó CrmA-fehérje [Noteborn és mtsai., (1996); Danen-Van Oorschot és mtsai., (1997a); Danen-Van Oorschot és mtsai., (1998)] nem képes blokkolni.

Az apoptin *in vitro* nem indukál apoptózist normál, diploid nyirok-, dermális, epidermális, endotél vagy sima-izom-sejtekben. Ha azonban normál sejtekben koexpresszálunk apoptint és transzformáló fehérjét, például SV40-ből származó, nagy T-antigént, a sejtek apoptózison mennek keresztül. Ezek az adatok azt mutatják, hogy az apoptin-indukált apoptózis nem-kialakult, tumorkeltő szituációkban is lezajlik [Noteborn és mtsai., (1998b)]. A vizsgált transzformált sejtekben, amelyek mind átmentek apoptin-indukált apoptózison, az apoptin a sejtmagban helyezkedik el [Noteborn és mtsai., (1998)]. Ezzel ellentétben, normál, nem-transzformált sejtek esetén az apoptint túlnyomórészt a citoplazmában találták meg [Danen-Van Oorschot, (1997)]. Azonban transzformáló fehérjével való koexpresszió lehetővé teszi, hogy az apoptin a sejtmagba jusson, ami apoptózis indukálását eredményezi [Noteborn és mtsai., (1998a)]. Az apoptin nem indukál apoptózist, és nem lokalizálódik rákra hajlamos egyénekből származó fibroblasztok sejtmagvaiban. Azonban UV-besugárzás után (ami abnormális SOS-választ vált ki ezekben a sejtekben, tranziensen transzformált állapotra emlékeztetve) az apoptin képes apoptózist indukálni ezekben

a sejtekben [Zhang és mtsai., (1999]. Másrészt egészséges egyedekből származó fibroblasztok nem adnak választ apoptin-indukált apoptózisra UV-kezelés esetén. Ez azt szemlélteti, hogy egy hajlam szükséges, amely indukció esetén aktiválja az apoptint.

A közelmúltban Noteborn és Pietersen (1998) leírták apoptint expresszáló, AdMLPvp3-jelű adenovírus-vektor előállítását és jellemzését. Ez a vektor lehetővé teszi apoptin hatékony *in vitro* valamint *in vivo* szintézisét. Kimutatták, hogy az apoptin megőrzi specifitását tumorkeltő/-transzformált sejtekre, ha adenovírus-vektorral bevisszük és expresszáljuk. Patkányokban végzett kísérletekben kimutatták, hogy az AdMLPvp3 biztonságosan beadható például intravénás injekcióval. Ismételt intravénás AdMLPvp3-dózisok is jól tolerálhatók, ami azt mutatja, hogy az apoptint expresszáló vírust súlyos mellékhatások nélkül be lehet adni. Ezeket az eredményeket megerősíti azt a tény, hogy előállítottak olyan transzgenikus egereket, amelyek sok sejtjükben apoptint termeltek [Noteborn és Zhang, (1998)]. AdMLPvp3 egyetlen intratumorális injekciója xonogén tumorba a tumornövekedés szignifikáns csökkenését eredményezte [Pietersen és mtsai., (1999)].

A belső specifitása és az együtt járó alacsony toxicitása apoptint szintetizálni képes, adenovírus-vektorokat ígéretes eszközzé teszi szilárd tumorok kezelésében.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány tárgya génterápia, amelyben lehetővé válik az apoptin, apoptózist indukáló fehérje előnyös tulajdonságai-

nak alkalmazása autoimmun betegségek, például RA kezelésére.

Ilyen gént célba juttató hordozó, amely független fertőző vektor; lehet például vírus vagy vírusból származó vektor, liposzóma vagy polimer, vagy hasonló, amely önmagában képes fertőzni, vagy bármilyen más módon képes genetikai információt célba juttatni például autoimmun betegségeket okozó vagy azokban szerepet játszó sejtekbe. A genetikai információ apoptin-szerű aktivitást kódoló nukleinsavmolekulát tartalmaz. A találmány tárgyát képezi olyan gént célba juttató hordozó is, amelynek apoptin-szerű apoptotikus aktivitást expresszáló képessége nagymértékben megnövelt. Tehát a találmány szerinti, gént célba juttató hordozó lehet például adenovírus, vagy retrovírus, parvovírus vagy más olyan DNS vagy RNS rekombináns vírus, amelyet célba juttató hordozóként lehet alkalmazni, vagy plazmovírus. A találmány tárgya továbbá olyan gént célba juttató hordozó, amely specifikus ligandummal vagy megcélzást biztosító molekulával vagy megcélzást biztosító molekulákkal is ki van egészítve, amely által a gént célba juttató hordozó specifikusan képes irányulni genetikai információjának célba juttatásakor a kiválasztott célsejtre. Ilyen megcélzást biztosító molekula lehet például virális „spike" fehérje, receptormolekula, vagy autoimmun betegségekkel kapcsolatos sejtek felszínén lévő receptorral vagy fehérjével reaktív ellenanyag.

A találmány tárgyát képezi olyan gént célba juttató hordozó is, melyet diagnózisban, azaz autoimmun betegségek,

például RA diagnózisában lehet alkalmazni. Ilyen gént célba juttató hordozót lehet alkalmazni *in vitro* diagnózisra, amelyben szövet vagy sejtmintákat vagy biopsziákat veszünk embertől vagy állattól. Ilyen mintákat azután elemezni vagy tesztelni lehet úgy, hogy megfertőzzük azokat, tenyészetben vagy közvetlenül, apoptin-szerű aktivitást expresszálni képes, gént célba juttató hordozóval. RA-val kapcsolatba hozható sejtek, például fibroblaszt-szerű szinoviociták, vagy más autoimmun betegségekkel kapcsolatba hozható sejtek apoptózison mennek keresztül apoptin szintézise esetén. Sőt, ha ezek a sejtek növekedési, szérum, citokin faktorokkal és/vagy más faktorokkal vannak stimulálva, a sejtek még „agresszívabb" növekedése indukálódik. Más módszerben, autoimmun betegségekkel kapcsolatosan, az apoptin sejtekben való nukleáris (sejtmagban való) lokalizációja felhasználható egy másik markerként RA-sejtek, vagy olyan sejtek diagnosztikai analízisére, amelyek más autoimmun betegségből származnak. Apoptin jelenlétét klasszikus (immuno)hisztokémiai technikákkal, azaz mikroszkópikusan vagy automatizált sejtosztályozó technikák alkalmazásával lehet kimutatni.

A találmány tárgyát különösen anti-autoimmun terápiák képezik. Autoimmun betegségekkel kapcsolatos sejteket például apoptin expresszáltatásával kezelünk úgy, hogy ezen sejteket gént célba juttató hordozókkal, például olyan adenovírus-vektorokkal közvetlenül fertőzzük, amelyek apoptin-szerű aktivitással rendelkező fehérjét kódoló szekvenciát tartalmaznak. Ennélfogva a találmány még egy másik előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány tárgyát

képezik gén célba juttató hordozók, például apoptint (amely potenciális anti-autoimmun ágens) expresszálni képes adenovírus-vektor. Továbbá, apoptin-expresszió autoimmun betegséggel kapcsolatos sejtekben közvetve sejtpusztulást okoz azokban az autoimmun betegséggel kapcsolatba hozható sejtekben is, amelyek nem expresszálnak apoptint. Ez az úgynevezett „by-stander" hatás még jobban javítja autoimmun betegségek apoptinnal való kezelését.

Az apoptin-szintézis nem indukál, vagy legalábbis nem detektálhatóan vagy nem szignifikánsan indukál apoptózist normál egészséges sejtekben, ami azt jelzi, hogy rekombináns apoptint tartalmazó hordozóval, például apoptin-szintézist szabályzó adenovírus-vektorral való *in vivo* kezelés toxicitása alacsony.

Apoptin expressziója autoimmun betegségekkel kapcsolatba hozható sejtekben akkor is megtörténhet, ha apoptint kódoló szekvenciát tartalmazó adenovírus-vektorokon kívül, más DNS- és/vagy RNS-vírusvektorral, például retrovírusokkal vagy parvovírusokkal fertőzünk sejteket [Lopez- Guerro és mtsai., (1997)]. Továbbá víruseredetű vektorrendszereket, például plazmovírusokat [Noguiez-Hellin, (1996)] lehet alkalmazni apoptin-indukált apoptózis indukálására autoimmun-betegséggel kapcsolatba hozható sejtekben.

A találmány szerinti megoldás autoimmun betegségek, például RA kifejlődésében szerepet játszó, esszenciális celluláris faktorok azonosítását is lehetővé teszi.

Diagnosztikai vizsgálati eljárás (auto)immun betegségekre való hajlam meghatározására

A leírásban bemutatott adatok lehetővé tesznek egy vizsgálati eljárás kifejlesztését annak meghatározására, hogy vajon ismeretlen celluláris/genetikai háttérrel rendelkező egyén hajlamos-e (auto)immun betegségekre, normál egészséges személyekhez viszonyítva. (Auto)immun betegségre hajlamos egyénből származó, normál diploid sejtek (például FLS) nem érzékenyek apoptin-indukált apoptózisra, de azokká válnak stressz-kezelés után, például kémiai, ozmotikus, hőstressz, fertőzés és/vagy besugárzás, például UV- vagy röntgen-sugárzás után. Az alábbi példában leírunk egy ilyen diagnosztikai vizsgálati eljárást, amelyben UV-besugárzás hatására alapul.

Primer sejteket (például FLS-t) izolálunk tesztelt egyénekből, és alkalmas tápközegben tenyésztjük azokat. Ezután a sejteket besugározzuk UV-vel, és azt követően apoptint kódoló plazmiddal transzfektáljuk azokat, és azután besugározzuk. Ezzel párhuzamosan, normál, egészséges egyénekből származó, diploid sejteket használunk kontrollként.

Közvetett, apoptin-specifikus Mab-re alapuló, immunfluoreszcenciás vizsgálati eljárás alkalmazásával a sejteket arra vonatkozóan analizáljuk, hogy jelen van-e apoptin a sejtmagban és/vagy átment-e apoptózison. Ha az apoptin pozitív/UV-kezelt sejtek között az apoptózison átment sejtek százalékos aránya szignifikánsan magasabb, mint a normál egyénekből származó, UV-kezelt sejtekben az apoptózison

átment sejtek százalékos aránya, akkor ez nyomós érv amellett, hogy az egyén, akiből a sejteket izoláltuk, hajlamos lesz (auto)immun betegségekre.

A találmány szerinti megoldást részletesebben tárgyaljuk az alábbi kísérleti rész alapján. Ez csak illusztráció célját szolgálja, és nem értelmezendő úgy, mint amellyel az igényelt oltalmi kört korlátoznánk.

KÍSÉRLETI RÉSZ

Sejtek és sejttenyésztési körülmények

Ad5 E1-transzformált, PER.C6-jelű, humán embrionális retina-sejtvonalat (HER) növesztettünk 5% CO_2-atmoszférában, 37°C-on, Dulbecco-féle módosított Eagle-tápközegben (DMEM), amely 10% magzati borjúszérummal (FCS) volt kiegészítve. A PER.C6-sejtvonalat Fallaux és munkatársaitól (1996) szereztük be. A sejttenyésztő tápközegeket, reagenseket és szérumokat a GIBCO Laboratories (Grand Island, NY) cégtől szereztük be. A műanyag tenyésztőtálcákat a Greiner cégtől szereztük be (Nurtingen, Germany).

Szinoviociták reumatoid artrítiszben (RA) szenvedő páciensektől származtak. A sejteket 10% FCS-t tartalmazó MDM-tápközegben növesztettük. Adenovirális fertőzés után a szinoviocitákat 10% FCS-vel vagy 40% normál humán szérummal kiegészített MDM-tápközegben tenyésztettük. A szinoviocitákat P. Goossens-től (Department of Rheumatology, Leiden University Medical Centre, LUMC, Leiden, The Netherlands) szereztük be.

Vírusok

AdMLPvp3-jelű rekombináns adenovírus-vektort alkalmaztunk apoptin virális expressziójára [Pietersen et al., (1999)]. Az AdMLPvp3-vektor E1A-enhanszert tartalmaz, adenovírusból származó, fő késői promóterhez (MLP) kapcsolva az apoptin-gén szabályzása céljából, amely csirkeanémia-vírusból (CAV) származó régiót tartalmaz [427-868. nukleotidok; Noteborn és mtsai., (1991)]. Kontroll adenovírusként AdCMVLacZ rekombináns adenovírust alkalmaztunk. Az AdCMVLacZ *E. coli*ból származó béta-galaktozidáz kódoló LacZ-gént tartalmaz, citomegalovírusból származó enhanszer/promóter vezérlete alatt [Pietersen és mtsai., (1999)].

Vírustechnikák

Plakk vizsgálati eljárásokat korábban leírtak szerint [Graham és Prevec, (1991)] hajtottunk végre. Röviden összefoglalva, adenovírus-készletekből sorozathígításokat készítettünk 2% lószérumot tartalmazó, 2 ml DMEM-ben, és hozzáadtuk azokat közel konfluens PER.C6-hoz, 6 tenyésztőhelyet tartalmazó tálcákban. 2 óra hosszáig, 37°C-on inkubáltuk, majd a tápközeget kicseréltük 0,85% agarózt (Sigma, USA), 20 mM HEPES-t (pH 7,4), 12,3 $MgCl_2$-ot, 0,0025% L-glutamint és 2% lószérumot (hőinaktivált 56°C-on, 30 percig) tartalmazó, F-15 esszenciális minimál-tápközegre (MEM).

Az adenovírus-lotokat kis méretben Fallaux (1996) által leírtak szerint állítottuk elő. Röviden összefoglalva, közel konfluens PER.C6, egyrétegű sejteket fertőztünk körülbelül 5 plakkformáló egységgel (pfu) sejtenként, 1%

lószérumot tartalmazó, foszfát-pufferolt sóoldatban (PBS). Szobahőmérsékleten, 1 óra elteltével az inokulumot kicseréltük friss tápközegre (DMEM/2% lószérum). A megközelítőleg teljesen felszabadult sejteket elkülönítettük, és 1 ml PBS/1% lószérumban összegyűjtöttük. A vírust a termelő sejtekből 3 ciklus hirtelen lefagyasztás/felolvasztással izoláltuk. A lizátumokat centrifugálással (3000 rpm, 10 percig) tisztítottuk, és -20°C-on tároltuk.

A PER.C6 által termelt rAdV-készleteket rekombináns-kompetens adenovírus jelenlétére szkríneltük PCR-analízissel, Ad5-ITR-régióból (5'-GGGTGGAGTTTGTGACGTG-3') és E1A-kódoló régióból (5'-TCGTGAAGGGTAGGTGGTTC-3') származó láncindító oligonukleotidok alkalmazásával, Noteborn és De Boer (1995) által leírtak szerint, Perkin Elmer PCR-berendezésben. Egy 600 bp méretű amplifikált fragmens jelenléte azt mutatta, hogy létezik replikáció-kompetens (E1-régiót tartalmazó) adenovírus az analizált víruskészletben [Pietersen és mtsai., (1999)].

Immunfluoreszcencia és DAPI-festés

Közvetett immunfluoreszcenciás vizsgálati eljárást Noteborn és munkatársai által leírtak szerint (1990) hajtottuk végre. Az apoptin jelenlétének kimutatása és fertőzött sejtekben celluláris lokalizációjának felderítése céljából a sejteket 80% acetonnal fixáltuk. A közvetett immunfluoreszcenciás vizsgálati eljárást 3-szor hígított, egérben apoptin ellen termeltetett, CVI-CAV-111.3-jelű, monoklonális ellenanyag (mAb) és 100-szor hígított, béta-galaktozidáz ellen termeltetett, LacZ-mAb (Boehringer Mannheim,

The Netherlands) alkalmazásával végeztük. Fluoreszcein-izotiocianáttal jelölt, kecskében termeltetett, anti-egér ellenanyagot (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA)) alkalmaztunk második ellenanyagként. Nukleáris (azaz sejtmagban lévő) DNS-t 1 µg/ml 2,4-diamino-2-fenil-indollal (DAPI), 2% 1,4-diaza-biciklo[2,2,2]-oktánnal festettünk glicerin/0,1 M Tris-HCl-ben (pH 8,0) [Telford és mtsai., (1992)].

TUNEL vizsgálati eljárás

Terminális, dezoxinukleotidil transzferázzal (Tdt) mediált, dUTP „nick end" jelölést (TUNEL) *in situ* sejtpusztulást detektáló reagenskészlet (Boehringer Mannheim, Germany) alkalmazásával végeztünk. A fertőzés után 24 órával a sejteket PBS-el mostuk, és 4% paraformaldehiddel PBS-ben (pH 7,4) fixáltuk 30 percig, szobahőmérsékleten. A sejtek permeabilizálása (0,1% Triton X-100, 0,1% nátrium-citrát, 2 percig, 4°C-on) után TUNEL-reakciókeverékkel (amely fluoreszcein-jelölt nukleotid polimereket és terminális dezoxinukleotidil transzferázt tartalmazott) inkubáltuk azokat 1 óra hosszáig, 37°C-on. PBS-el való mosás után a sejteket fluoreszcencia-mikroszkóp alkalmazásával analizáltuk.

Giemsa-festés és béta-galaktozidáz vizsgálati eljárások

A letapadt sejtek detektálása céljából, a sejteket megfestettük Giemsa-val. Fertőzés (kontroll álfertőzés) után a sejteket kétszer mostuk PBS-el és metanol:ecetsav 3:1-arányú keverékében fixáltuk 15 percig, szobahőmérsékle-

ten. A sejteket 30 percig inkubáltuk 3%-os Giemsa-oldatban (Merck, Darmstadt, Németország; 1 mM Na_2HPO_4-ben oldva, pH 7,0), szobahőmérsékleten. Festés után a sejteket négyszer mostuk ioncserélt vízzel, és levegőn hagytuk azokat megszáradni. Lac-Z által kódolt béta-galaktozidáz detektálása céljából, szövettenyészetben lévő sejteket fertőzés után 24 órával fixáltunk jéghideg 2%-os paraformaldehid/0,2%-os glutáraldehid-oldatban, jéghideg PBS-el mostuk (amely 2 mM $MgCl_2$-ot tartalmazott), és 3 ml reakciókeverékben [1 mg/ml X-gal (Boehringer Mannheim, Germany), 5 mM kálium-ferrocianid, 5 mM kálium-ferricianid, 2 mM $MgCl_2$ PBS-ben] inkubáltuk 37°C-on, 4-16 óra hosszáig [Sanes és mtsai., (1986)].

EREDMÉNYEK ÉS DISZKUSSZIÓ

In vitro modell reumatoid artritisz, humán autoimmun betegségre

Abból a célból, hogy apoptin RA-páciensekben való szintézisének lehetséges terápiás hatásait tanulmányozzuk, létrehoztunk egy *in vitro* modellt RA-ra. Ebből a célból fibroblaszt-szerű szinviocitákat (FLS) izoláltunk RA-ban szenvedő OH-páciensekből. A sejteket magzati borjúszérumot tartalmazó, „nem-stimulált" tápközegben, vagy 40% humán normál szérumot tartalmazó, úgynevezett „stimulált" tápközegben tenyésztettük. Különösen ez utóbbi tartalmaz citokineket vagy más stimuláló faktorokat, amelyek nagyon közel állnak az *in vivo* RA-szituációhoz.

Ezek a „stimulált" LFS-ek utánozzák az RA-ban fennálló körülményeket, amelynek egy másik nagyon fontos vonatko-

zása van. LFS abnormális *in vivo* és *in vitro* növekedése különböző celluláris faktorok szekrécióját váltja ki, amelyek saját, sőt más (például LFS) sejtek növekedését is stimulálják [Firestein, (1995)]. Azonban (tenyésztett), RA-val kapcsolatba hozható LFS szintén átment belső genetikai változásokon, amelyek már különbözővé tették azokat normál, egészséges sejtekhez viszonyítva.

Adenovírus-vektorok nagyon alkalmasak transzgén expressziójára RA-val kapcsolatba hozható LFS-ben

Jelenleg a leghatékonyabb rendszerben, amelynek alkalmazásával transzgén transzdukcióját el lehet érni a sejttípusok többségében, adenovírus-vektorokat alkalmaznak. Ezek a vektorok számos előnnyel rendelkeznek, amelyek különösen alkalmassá teszik azokat *in vivo* géntranszferre. Rekombináns adenovírus-vektorokat magas titerekig lehet növeszteni, képesek nem-mitotikus sejteket transzdukálni és nem integrálják genomjukat a gazdasejt DNS-ébe. Továbbá, adenovírus-vektorokat már alkalmaznak klinikai génterápiás kísérletekben.

Azt vizsgáltuk, hogy vajon rekombináns apoptint kódoló, adenovírus-vektor képes-e RA-LFS-sejteket hatékonyan transzdukálni. Ebből a célból ezeket az LFS-eket replikáció-deficiens AdLacZ-vel fertőztük (50 fertőzési egységgel), amely béta-galaktozidáz fehérjét kódol. Két nappal a fertőzés után az LFS-sejteket fixáltuk és béta-galaktozidáz-szintézisre analizáltuk. A fertőzött LFS-ek körülbelül 40%-a pozitív volt béta-galaktozidáz vizsgálati eljárásban. Más, béta-galaktozidázt expresszálni képes, rekombináns

adenovírus-vektorokkal fertőzött sejttípusokhoz hasonlítva, a transzdukció százalékos aránya ebben az esetben magas.

Ennélfogva levonhatjuk azt a következtetést, hogy adenovírus-vektor nagyon alkalmas transzgének előállítására RA-FLS-ben. Például apoptin expresszálására alkalmas adenovírus-vektort bemutatunk az 1. ábrán.

Szérummal stimulált RA-LFS AdMLP-vp3-al való fertőzése drámai mértékű sejtpusztulást eredményez

Ezután meghatároztuk az apoptin-szintézis citotoxikus hatását RA-FLS-ben. Ebből a célból a sejteket AdLacZ negatív kontroll vírussal, apoptint kódoló AdMLPvp3-al fertőztük (mindkét esetben 50 fertőzési egységgel) vagy álfertőztük. Ezt követően a sejteket „nem-stimuláló" vagy „stimuláló" tápközegben növesztettük. Három és hat nappal a fertőzés után a sejteket sejtsűrűségre analizáltuk Giemsa-festéssel.

Három és hat nappal a fertőzés után AdLacZ rekombináns adenovírus-vektorral fertőzött sejtek nem mutattak szignifikáns csökkenést a sejtsűrűségben azokhoz viszonyítva, amelyeket álfertőztünk. Ugyanazt figyeltük meg a „nem-stimulált" és a „stimulált" tápközeg esetén egyaránt.

Másrészt, AdMLPvp3 rekombináns vektorral fertőzött RA-FLS-t tartalmazó tenyésztőedényekben a sejtsűrűség azonban szignifikánsan csökkent. A fertőzés után már három nappal (két nappal a „stimulálás" után) majdnem valamennyi RA-FLS elpusztult. Nem-stimulált sejteket tartalmazó tenyésztőedényekben nem látszódott olyan szignifikáns csökkenés a sejtsűrűségben, melyet az AdMLP-vp3 fertőzése okozott vol-

na. Azonban hat nappal a fertőzés után az AdMLPvp3-al kezelt sejtek mennyisége is szignifikánsan csökkent az ál-kezelt RA-FLS-ekhez képest. A kísérlet eredményeit bemutatjuk a 2. ábrán, amelyen látható az AdLacZ-vel, AdMLPvp3-al való fertőzés vagy ál-kezelés RA-FLS-tenyészetek sejtsűrűségére kifejtett hatása.

Ezek az eredmények igazolják, hogy az apoptin-szintézis specifikusan képes sejtpusztulást kiváltani olyan FLS-ben, amely RA autoimmun betegségben szenvedő páciensből származik. Adenovírus-vektorokkal való fertőzés, mint olyan, nincsen szignifikáns citotoxikus hatással RA-FLS-re. Az apoptin már rendelkezik mérsékelten negatív hatással RA-FLS-sejtsűrűségre, ha azokat „nem-stimuláló" körülmények között növesztjük. Ezekben az adatokban az is benne van, hogy az RA-FLS különbözik humán normál sejtektől, Firestein (1995, 1997, 1998) és mások [Breedveld, (1997)] feltételezése szerint. Úgy tűnik, hogy ezt a különbséget az apoptin képes felismerni.

Az a tény, hogy az apoptin hatékonyabb sejtpusztító hatással rendelkezik, ha az RA-FLS szérum-stimulált, azt mutatja, hogy az apoptin még aktívabb lesz akkor, ha az FLS elkezd kiválasztani különböző faktorokat, például citokineket, kemokineket, stb., amelyek mind képesek fokozó hatást kifejteni sejtproliferációra [Firestein, (1997)], ami transzformálthoz sokkal hasonlóbb állapothoz vezet.

Az eredmények még érdekesebbek, ha figyelembe vesszük azt, hogy AdMLP-vp3-fertőzés apoptin-termelést vált ki RA-ból származó FLS-ek 30-40%-ában (immunfluoreszcenciás vizs-

gálati eljárással meghatározva, fertőzött FLS-tenyészetekben), miközben majdnem az összes FLS elpusztult. Nemcsak az apoptin-pozitív FLS-ek, hanem az apoptin-negatív sejtek is elpusztultak. Ez az eredmény azt mutatja, hogy az AdMLPvp3-kezelés „by-stander" hatást képes kifejteni. Az a legvalószínűbb, hogy az apoptin-indukált apoptózis következtében bekövetkező, növekedést stimuláló és/vagy apoptózist gátló faktorok mennyiségének drámai csökkenése az apoptin-negatív sejteket is elpusztítja.

Azt a következtetést vonhatjuk le, hogy az apoptin képes sejtpusztulást indukálni RA-FLS-ben, amelyet exogén és endogén faktorokkal még fokozni is lehet. Ez a jellemző tulajdonsága azt is lehetővé teszi, hogy az apoptint terápiás ágensként lehet alkalmazni RA és más autoimmun betegség kezelésére.

TUNEL-analízis igazolja, hogy AdMLP-mediált apoptin-szintézis apoptózist indukál RA-FLS-ben

AdMLPvp3-indukált sejtpusztulás természetének jellemzése céljából láthatóvá tettünk töréseket DNS-szálakban terminális dezoxinukleotidil transzferáz enzim és FITC-jelölt dUTP segítségével (TUNEL vizsgálati eljárás). RA-FLS-t fertőztünk AdMLP-vp3-al vagy AdLacZ-vel, és 24 óra múlva a sejteket 40%-os humán szérummal stimuláltuk. Egy nappal később a sejteket elkülönítettük, és megfestettük a transzgénre annak igazolása céljából, hogy a transzdukciós hatékonyság hasonló mértékű volt, és a párhuzamosan fertőzött tenyészeteket TUNEL vizsgálati eljárásnak vetettük alá. Bár az RA-FLS-ek 40%-a expresszált béta-galaktozidázt,

csak alkalmanként észleltünk egy-egy sejtben DNS-töréseket, melyet a TUNEL vizsgálati eljárás képes volt detektálni. Ezzel ellentétben úgy tűnt, hogy TUNEL-pozitív sejtek gyakorisága AdMLPvp3-fertőzés után ugyanabban a tartományban volt, mint az apoptin-pozitív sejtek gyakorisága fertőzés után.

Ennélfogva levonhatjuk azt a következtetést, hogy apoptin képes apoptózist indukálni olyan sejtekben, amelyek elvesztették saját képességüket (vagy csökkent mértékben rendelkeznek vele) arra, hogy apoptózison menjenek keresztül. Az a tény, hogy apoptin képes apoptózist indukálni ezekben az RA-LFS-sejtekben, azt jelzi, hogy *in vivo* apoptin-kezelés nagyon kismértékű mellékhatásokat okoz, például gyulladásos reakciókat.

Apoptin nukleáris (sejtmagban való) lokalizációja humán szérummal stimulált RA-FLS-ben

„Stimulált", RA-ból származó FLS-ben az apoptin celluláris lokalizációjának vizsgálata céljából a sejteket AdMLPvp3-al fertőztük 1 napig, szérummal stimuláltuk további 1 napig, és immunfluoreszcenciával analizáltuk, amelyben apoptinra specifikus, monoklonális ellenanyagot és DAPI-festést alkalmaztunk. Majdnem valamennyi apoptin-pozitív sejt tartalmazott apoptint a sejtmagban. Nagy mennyiségű apoptin-pozitív sejt már tartalmazott abnormálisan fényes DAPI-struktúrákat, amelyek nagyon késői apoptotikus körülményekre utalnak; konkrétan kondenzált kromatin/DNS-re. Ezek az eredmények ismét azt igazolják, hogy az apoptin-szintézis apoptózist indukál RA-FLS-ben.

Eddig valamennyi, celluláris állapotra vizsgált, apoptin-szenzitív sejtben azt apoptin a sejtmagban lokalizálódott [Noteborn és mtsai., (1998b]. A bemutatott adatok igazolják, hogy az apoptin-aktivitás RA-FLS-ben szintén korrelációban van nukleáris lokalizációjával.

Két másik RA-páciensből származó, szérummal stimulált LFS fertőzése AdMLP-vp3-al drámai mértékű sejtpusztulást eredményez

Annak vizsgálata céljából, hogy apoptin szintézise indukál-e apoptózist különböző RA-páciensekben, RA-val kapcsolatba hozható FLS-t kivettünk „E" és „Lo" jelű RA-páciensekből is. Ezen páciensekből származó, RA-val kapcsolatba hozható FLS forrása „Department of Rheumatology, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands".

Ebből a célból „E" és „Lo" jelű RA-páciensekből származó FLS-t fertőztünk apoptint kódoló AdMLPvp3-vel, nem-apoptotikus fehérjeként béta-galaktozidázt kódoló AdLacZ negatív kontroll-vírussal (mindkettő 50 fertőzési egység) vagy álfertőztük azokat. Ezt követően a sejteket „nem-stimuláló" vagy „stimuláló" tápközegben. Három nappal a fertőzés után (két nappal a szérummal való stimulálás után) a sejteket sejtsűrűségre analizáltuk DAPI-festéssel [Noteborn és mtsai., (1998b]. AdLacZ-jelű, rekombináns adenovírussal fertőzött, „nem-stimulált" valamint „stimulált" sejtek nem mutattak szignifikáns csökkenést a sejtsűrűségben, olyan sejtekhez hasonlítva, amelyeket álkezeltünk.

Ezzel ellentétben, mind az „E", mind a „Lo" jelű páciensekből származó, AdMLPvp3 rekombináns adenovírussal fertőzött, RA-FLS-ket tartalmazó tenyésztőedényekben a sejtsűrűség szignifikánsan kisebb volt. Az AdMLPpv3-al kezelt, nem stimulált sejteket tartalmazó tenyésztőedényekben a sűrűség kisebb volt, mint azokban, amelyeket AdLacZ-vel fertőztünk vagy ál-kezeltünk. Sőt, ez a hatás még szignifikánsabb volt azokban az esetekben, ahol az RA-FLS-t 40%-os normál humán szérummal stimuláltuk. Ezen kísérletekből származó eredmények, és az, amelyet OH-páciensből származó RA-FLS-re alapult, azt igazolták, hogy az apoptin-szintézis speciálisan sejtpusztulást okoz olyan FLS-ben, amely autoimmun RA-ban szenvedő, különböző páciensekből származott. Adenovírus-vektorokkal való fertőzés, mint olyan, nincs szignifikáns hatással az RA-FLS-sejtsűrűségre. Ezek a tulajdonságok megerősítik a fentebb leírt állítást, hogy az apoptin terápiás ágens RA és más, autoimmun betegségek kezelésére.

AdApt-Apoptin adenovírus-vektor előállítása

Az AdMLP-vp3-jelű adenovírus-vektor apoptin-gén expresszióját vezérli, adenovírus fő késői promóter (MLP) vezérlete alatt. Az új AdApt-jelű adenovírus-vektor citomegalovírusból (CMV) származó promótert tartalmaz, amely szintén optimálisan lett adaptálva a helper PER.C6-sejtvonalhoz.

Annak vizsgálata céljából, hogy lehetséges-e apoptint termeltetni CMV szabályzása alatt lévő adenovírus-vektor alkalmazásával, előállítottuk az AdApt-Apoptin-t. Ebből a

célból a pCMV-vp3-plazmid BamHI-fragmensét [Noteborn, (1996)] 6,1 kb méretű, AdApt transzfervektor (IntroGene, Leiden, The Nethtelands) BamHI-hasítóhelyébe klónoztuk. Szekvenciaanalízissel és restrikciós enzimes emésztésekkel meghatároztuk a CMV szabályzása alatt lévő apoptin-gén helyes orientációját. Ezt a transzfervektort pAdApt-Apoptinnak neveztük. Adenovírus-transzfervektor negatív kontrolljaként kiválasztottunk olyan plazmidokat, amelyek az apoptin-gént helytelen orientációban tartalmazzák, a CMV-promóterrel szemben, és elneveztük AdApt-AS-nek. Ezután előállítottunk CMV-promóter vezérlete alatt, apoptint expresszálni képes rekombináns adenovírusokat. Továbbá, előállítottunk apoptin-gént a CMV-promóterhez képest ellenkező orientációban tartalmazó, kontroll adenovírust is. Ebből a célból PER.C6-sejteket (IntroGene, Leiden, The Netherlands) kotranszfektáltunk pAd5A1fII-ITR (E1-, E3+) adenovírus-vektorplazmiddal és pAdApt-Apoptin vagy pAdApt-AS transzferplazmiddal. Miután a transzfektált PER.C6 citopatogén hatásait megfigyeltük, a rekombináns adenovírus-vektorokat tartalmazó tápközeget elkülönítettük és plakk-tisztítottuk [Noteborn és Pietersen, (1998)]. A különböző plakk-tisztított, apoptint kódoló AdApt-Apoptin-ból és AdApt-AS kontroll vektorból származó, rekombináns adenovírus-„batch"-eket PCR-analízissel vizsgáltuk „helyes" orientációban lévő apoptin-gén jelenlétére, a „rossz" orientációval szemben, sorrendben [Pietersen és mtsai., (1999)]. Valamennyi analizált (vektortípusonként összesen legalább 10) rekombináns adenovírus „batch" tartalmazta a várakozásnak megfelelő

apoptin-gént. PCR-el végzett RCA-analízis [Pietersen és mtsai., (1999)] kimutatta, hogy egyik analizált "batch"-ben sem keletkezett replikáció-kompetens adenovírus. Végül, apoptin-fehérje termelődését vizsgáltuk AdApt-fertőzött humán HepG2-sejtek felhasználásával, közvetett immunfluoreszcenciával, 111.3 monoklonális ellenanyag alkalmazásával [Noteborn és Pietersen, (1998)]. Ezek a sejtek majdnem mindegyikéről kimutattuk, hogy apoptin-fehérjét termeltek, és a fertőzés után nagyon hamar apoptotikussá váltak. Ez azt a tényt jelzi, hogy a termelődött apoptin teljesen aktív apoptózis indukálószereként. A várakozásnak megfelelően, AdApt-As-el fertőzött egyik sejt sem festődött a monoklonális ellenanyaggal és nem lett apoptotikus. Konklúzióként levonhatjuk, hogy az a tény, hogy képesek vagyunk apoptin termeltetni különböző rekombináns adenovírus-vektorokkal, akár adenovirális MLP, akár CMV-promóter szabályzása alatt, azt jelzi, hogy apoptint bármilyen adenovírus-vektorban lehet termeltetni a vírusvektor-termelés korlátozása nélkül.

„E"-jelű RA-páciensből származó, szérummal stimulált RA-FLS fertőzése AdApt-Apoptinnal sejtpusztulás szignifikáns indukcióját eredményezte a fentebb, AdMLP-vp3 rekombináns adenovírus-vektorra leírtak szerint. Ennélfogva azt a következtetést vonhatjuk le, hogy AdMLP-vp3 rekombináns adenovírus-vektor mellett más, apoptint-gént expresszálni képes adenovírus-vektort is lehet alkalmazni, például AdApt-Apoptin rekombináns adenovírust lehet alkalmazni adenovírus-vektorként, autoimmun betegségek, például RA elleni terápia alapjaként.

48047

rAd-apoptinra alapuló diagnosztikai vizsgálati eljárás autoimmun betegségekre

Autoimmun betegséggel kapcsolatba hozható sejtek markere az apoptin-indukált apoptózis reszponzivitása. Különösen akkor, ha ezeket a sejteket autoimmun betegségekkel kapcsolatos faktorokkal, például bizonyos citokinokkal és növekedési faktorokkal stimuláljuk, akkor ez programozott sejtpusztulást fog eredményezni, melyet apoptin szintézise indukál. Továbbá, másik marker az apoptin celluláris lokalizáltsága, amely eltér autoimmun betegséggel kapcsolatba hozható, apoptin-szenzitív sejtek esetén, normál, egészséges sejtekhez viszonyítva.

Ha sejteket apoptint expresszálni képes hordozóval, például apoptin szintézisét szabályozni képes, rekombináns adenovírussal megfertőzzük, és analizáljuk az apoptin celluláris lokalizációját és/vagy az apoptózis indukcióját ezekben a sejtekben, ki tudjuk mutatni, hogy az a páciens, amelyből a sejt származott, szenved-e autoimmun betegségben vagy nem. Különösen (szérum)-stimulálás esetén fokozódik szignifikánsan az apoptin sejtmagban való felhalmozódása és az apoptózis indukciója.

Például, a sejteket apoptint expresszálni képes adenovírussal és párhuzamosan kontroll adenovírussal, például AdLacZ-vel fertőzünk. A sejteket citoplazmában vagy sejtmagban (autoimmun betegséggel kapcsolatba hozható sejtek) lévő apoptinra vizsgáljuk, például apoptinra specifikus monoklonális ellenanyagokra, például 111.3-ra alapuló, immunfluoreszcens vizsgálati eljárással [Danen-Van Oorschot

és mtsai., (1998)]. Továbbá vagy helyette meghatározható az apoptotikus sejtek százalékos aránya.

Ha az apoptotikus sejtek százalékos aránya szignifikánsan magasabb apoptint szintetizáló sejtekben, exogén kontroll fehérjét, például β-galaktozidázt tartalmazó sejtekhez viszonyítva, akkor ezek a sejtek olyan páciensekből származnak, amelyek autoimmun betegségben szenvednek.

Diagnosztikai vizsgálati eljárás autoimmun betegségeket okozó faktorok azonosítására

Autoimmun betegséggel kapcsolatos sejtek belső változásai mellett, ezen sejtek által, és legvalószínűbb módon más, (immun)sejtek által szekretált, különböző faktorok növelik az autoimmun betegség, például RA súlyosságát.

Ezért, a fentebb leírt, autoimmun betegségekkel kapcsolatba hozható sejtek azonosítására szolgáló, diagnosztikai vizsgálati eljárást olyan faktorok azonosítására is lehet alkalmazni, amelyek RA vagy más autoimmun betegség klinikai tüneteit okozó sejtek „agresszivitását" kiváltják és/vagy fokozzák.

Ilyen faktorral való kezelés esetén a sejtek, például humán (RA) fibroblaszt-szerű szinoviociták átfogó apoptin-indukált apoptózison mennek keresztül és/vagy megkötik az apoptin sejtmagvaikban.

Az apoptin-indukált apoptózis transzformálthoz hasonló állapotot jelez autoimmun betegségekkel kapcsolatos sejtekben

Az a tény, hogy az apoptin apoptózist képes indukálni („stimulált") RA-FLS-ben, azt mutatja, hogy ezek a sejtek

transzformált állapotban vannak. Eddig az apoptinról nem bizonyosodott be, hogy normál, nem-transzfektált, humán vagy más emlősszervezetből származó sejtekben apoptózist képes indukálni [Danen-Van Oorschot és mtsai., (1997); Noteborn és mtsai., (1998b); Zhang és mtsai., (1999)]. Ezek az adatok megerősítik azt a tényt, hogy apoptin különböző szöveteiben expresszáló, transzgenikus egér normálisnak néz ki. Egyik szervében sem látszik fokozott mértékű apoptózis sejteiben szintetizálódott apoptin következtében [Noteborn és Erkeland, nem közölt eredmények].

Azonban abnormális, stresszel kapcsolatos folyamatok UV-indukciója normál, rákra hajlamos szindrómákkal rendelkező egyénekből származó, nem-transzformált sejtekben képessé teszi az apoptint apoptózis indukálására ezekben a sejtekben [Zhang és mtsai., (1999)] tranziens időszak alatt. Apoptin nem indukál apoptózist egészséges egyének UV-kezelt sejtjeiben. Az apoptin inkább RA-FLS-ben képes mérsékelt apoptózist indukálni. Például RA-FLS szérummal való stimulálása fokozza az apoptin-indukált apoptózis mértékét i.e. RA-FLS-ben. Úgy tűnik, hogy ezek az RA-FLS-ek már különböznek normál egészséges sejtektől, de „stimulálás" után még abnormálisabbak (transzformáltak) lesznek. Ezek a tulajdonságok azokra emlékeztetnek, amelyeket leírtak rákra hajlamos egyénekből származó, UV-kezelt sejtekre [Zhang és mtsai., (1999)]. Mindkét esetben celluláris folyamat változott meg, melyet "normál" körülmények között képes kezelni a sejt, de specifikus stimulusok abnormális celluláris folyamatokat eredményeznek, amely rák vagy

autoimmun betegségek felgyorsult kifejlődéséhez vezet.

Reumatoid FLS gyakran úgy néz ki és úgy viselkedik, mint a normál fibroblasztok, amely ahhoz a elképzeléshez vezetett, hogy inkább környezetükre adnak választ, minthogy független agresszorként (transzformálva lennének) viselkednének. Azonban néhány töredékes bizonyíték rendelkezésre áll arra vonatkozóan, hogy transzformált sejtek tulajdonságait is képesek mutatni. Például általában műanyaghoz vagy extracelluláris mátrixhoz való letapadás szükséges ahhoz, hogy normál fibroblasztok proliferálni tudjanak és hosszabb ideig túléljenek. Transzformált sejtek azonban szuszpenzióban, félszilárd tápközegben képesek növekedni, szilárd felszínnel való érintkezés nélkül. Miközben FLS tipikusan olyan körülmények között növekszik és fejlődik jól, amely lehetővé tesz letapadást, bizonyos körülmények között képesek proliferálni lekötéstől független módon [Lafyatis és mtsai., (1989)]. Továbbá leírták számos onkogén gén, például c-myc expresszióját tenyésztett FLS-ben [Gay és Gay, (1989)]. Növekedési faktorok, például béta tumornövekedési faktor és más citokinek nagyobb mértékű endogén felszabadulását is leírták FLS-re [Bucala és mtsai., (1991); Remmers és mtsai., (1990); Geiler, (1994); Firestein (1995) és (1995a)]. Néhány esetben nem-funkcionális p53-tumorszupresszort kapcsolatba hozták RA-val [Aupperle és mtsai., (1998)]. Bár mutáns p53 nem onkogén, megakadályozza apoptózis indukálását apoptintól különböző, endogén vagy exogén ágensek alkalmazásával.

Valamennyi adat alátámasztja, hogy FLS irreverzibilisen megváltozik RA-ban, és azt, hogy egy autonóm folyamat lehetővé teszi, hogy aktiválódva maradjon még az ízületi gyulladt környezetből való kivétel után is [Firestein, (1995)]. Bizonyítékaink vannak arra vonatkozóan, hogy apoptin képes felismerni ezeket a transzformálthoz hasonló autoimmun állapotokat, amely lehetővé teszi ilyen betegségekben fontos szerepet játszó, celluláris faktorok azonosítását.

Az 1. ábrán vázlatosan bemutatjuk az AdMLP-vp3-jelű rekombináns adenovírus lényeges részeit, amely apoptint kódoló gént tartalmaz adenovirális fő késői promóter szabályzása alatt.

A 2. ábrán vázlatosan bemutatjuk az apoptin-indukált citotoxikus hatást reumatoid artrítiszben szenvedő páciens ízületi hártyájából származó, tenyésztett, fibroblaszt-szerű szinoviocitákban (FLS). 1,5 x 10^4 sejtet tenyésztettünk 24 tenyésztőhelyet tartalmazó edényekben, 24 óra hosszáig, AdLAcZ-jelű, béta-galaktozidázt expresszáló rekombináns adenovírussal (LacZ), apoptin kódoló AdMLP-vp3-al (Apoptin) fertőztük vagy álfertőztük (NON). Az FLS-t normál körülmények között (NST) növesztettük, vagy 1 nappal a fertőzés után 40% normál humán szérummal (ST) stimuláltuk, FLS agresszívabb növekedését indukálva, amely az *in vitro* RA-szituációra emlékeztetett. Végül, hat nappal az adenovírus- vagy átfertőzés után, az egyrétegű sejteket fixáltuk és GIEMSA-oldattal festettük. (+: élő/letapadt sejtek mennyiségét jelzi; -: túlélt/letapadt sejtek mennyiségét jelenti).

4014

HIVATKOZÁSOK JEGYZÉKE

1. Arends, M.J., and Wyllie, A.H. 1991. Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. International Rview of Experimental Pathology 32, 223-254.

2. Aupperle, K.R., Boyle, D.L., Hendrix, M., Seftor, E.A., Zvaifler, N.J., Barbosa, M., and Firestein, G.S. Regulation of synoviocyte proliferation, apoptosis, and invasion by the p53 tumor-suppressor gene. (1998) American J. Pathology 152, 1091-1098.

3. Bischoff, J.R. , *Kirn,* D.H. , Williams, A. , Heise, C. , Horn, S., Muna, M., Ng, L., Nye, J., Sampson-Johannes, A., Fatteay, A., and McCormick. An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. (1996) .Science 274, 373-376.

4. Breedveld, F. New insights in the pathogenesis of Rheumatoid arthritis. (1998) The J. of Rheumatology 25, 3-7.

5. Bucala, R., Ritchlin, C., Winchester, R., Cerami, A. Constitutive production of inflammatory and mitogenic cytokines by rheumatoid synovial fibroblasts. (1991) .J. Experimental Medicine 173, 569-574.

6. Conway, J.G., Wakefield, J.A., Brown, R.H., Marron, B.E., Sekut, L., Stimpson, S.A., McElroy, A., 25 Menius, j.A., Jeffreys, J.J., Clark, R.L., McGeehan, G.M., and Conolly, K.M. Inhibition of cartilage and bone " destruction in adjuvant arthritis in the rat bya matrix

metalloproteinase inhibitor. (1995) J. Experimental Medicine 182, 449-457.

7. Danen-Van Oorschot, A.A.A.M., Den Hollander, A., Takayama, S., Reed, J.C., Van der Eb, A.J., and Noteborn, M.H.M. Bag-1 inhibits p53-induced apoptosis but not apoptin-induced apoptosis. (1997) Apoptosis 2, 395-402.

8. Danen-Van Oorschot A.A.A.M., Fischer D., Grimbergen 35 J.M., Klein B., Zhuang S.-M., Falkenburg J.H.F., Backendorf C., Quax P.H.A., Van der Eb A.J., Noteborn M.H.M. Apoptin induces apoptosis in human transformed and malignant cells but not in normal cells. (1997a) Proceedings National Academy Sciences, USA 94: 5843-5847.

9. Danen-van Oorschot, A.A.A.M., van der Eb, A.J., and Noteborn, M.~.M. Apoptin-induced apoptosis: antitumor potential? (1998) .In: Proceedings of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences Pharmaceutical Intervention in apoptotic pathways, pp 199-212.

10. Gay, S. and Gay, R.E. Cellular basis and oncogene expression of rheumatoid joint destruction. (1989) . Rheumatology International 9, 105-113.

11. Geiler, T. , Kriegsmann, J. , Keyzer, G.M. , Gay, R.E., Gay, S. A new model for rheumatoid arthritis generated by engraftment of rheumatoid synovial tissue and normal human cartillage into SCID mice. (1994) Arthritis Rheumatology 37, 1664-1671.

12. Fallaux, F. (1996) Gene Therapy for haemophilia A: Towards the use of adenoviral vectors? PhD Thesis, Leiden University, The Netherlands.

13. Firestein, G.S. Invasive fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. (1995) Arthritis and Rheumatism 39, 1781-1790.

14. Firestein, G.S. Apoptosis *in* rheumatoid arthritis synovium. (1995a) .J. Clinical Investigations 96, 1631-1638.

15. Firestein, G.S. Rheumatoid arthritis: Etiology and Pathogenesis of Rheumatoid arthritis. (1997) Textbook of Rheumatology, 5th edition. Eds. Kelley, Harris, Ruddyand Sledge. Chapter 54, pp 851-897.

16. Firestein, G.S., Novel therapeutic strategies involving animals, arthritis, and apoptosis. (1998) Current opinion in Rheumatology 10, 236-241.

17. Graham, F.L., and Prevec, L. (1991) Manipulation of adenovirus vectors. In: Methods in Molecular Biology. Volume 7: Gene Transfer and Expression Protocols. E.J. Murray, ed. The Humana Press, Clifton, N.J., USA, pp 109-128.

18. Lafyatis, R., Remmers, E.F., Roberts, A.B., Yocum, D.E., Sporn, M.B., and Wilder, R.L. Anchorage-independent growth of synoviocytes from arthritic and normal joints: stimulation by exogenous platelet-derived growth factor and inhibition of by transforming growth factor beta and retinoids. (1989) J. Clinical Investigations 83, 1267-1276.

19. Liblau, R.S., *Singer,* S.M., McDevitt, H.O. Th1 and Th2 CD4+ T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases. (1995} Immunol Today 16, 34-38.

20. Lopez-Guerro, J.A., Rayet, B., Tuynder, M., Rommelaere, J., and Dinsart, C. (1997) Constitutive activation of U937 promonocytic cell clones selected for their resistance to parvovirus H-1 infection. Blood 89, 1642-1653.

21. Mountz, J.D., Wu, J., Cheng, J., Zhou, T. Autoimmune disease: a problem of defective apoptosis. (1994) Arthritis and Rheumatism 37, 1415-1420.

22. Noguiez-Hellin, P., Robert-LeMeur, M., Salzmann, J.L., and Klatzmann, D. (1996) Plasmoviruses: nonviral/viral vectors for gene therapy. Proceedings National Academy Sciences USA 93, 4175-4180.

23. Noteborn, M.H.M. Apoptin induces apoptosis in human transformed and malignant cells but not in normal cells 20 as essential characteristic for the development of an anti-tumor therapy. 1996. PCT application WO 96/41191.

24. Noteborn, M.H.M. and De Boer, G.F. (1995) .Patent USA/no US 030, 335.

25. Noteborn, M.H.M., Danen-van Oorschot, A.A.A.M., and van der Eb, A.J. Chicken Anemia virus: Induction of apoptosis by a single protein of a single-stranded DNA virus (1998) Seminars in Virology 8, 497-504.

26. Noteborn, M.H.M., Danen-van Oorschot, A.A.A.M., and van der Eb, A..J. The Apoptin® gene of chicken anemia virus in the induction of apoptosis in human tumorigenic

cells and in gene therapy of cancer. (1998a) Gene Ther. Mol. Biol. Vol. 1, 399-406.

27. Noteborn, M.H.M., De Boer, G.F., Kant, A., Koch, G., Bos, J., Zantema, A., and Van der Eb, A.J. Expression of 35 avian leukemia virus env-gp85 in Sp,odoptera frugiperda cells using a baculovirus expression vector. (1990) J. General Virology 71, 2641-2648.

28. Noteborn M.H.M., De Boer G.F., Van Roozelaar D.J., Karreman C., Kranenburg O., Vos J.G., Jeurissen S.H.M., Hoeben R.C., Zantema A., Koch G., Van Ormondt H., Van der Eb A.J. Characterization of cloned chicken anemia virus DNA that contains all elements for the infectious replication cycle. (1991) J. Virology 65, 3131-3139.

29. Noteborn, M.H.M., Koch, G., Chicken anemia virus infection: molecular basis of pathogenicity. Avian Pathol. 24 (1995), 11-31.

30. Noteborn, M.H.M. and Pietersen, A.M. A gene delivery vehicle expressing the apoptosis-inducing proteins VP2 and/or apoptin. 1998. PCT application no PCT/NL98/00213

31. Noteborn M.H.M., Todd D., Verschueren C.A.J., De Gauw H.W.F.M., Curran W.L., Veldkamp S., Douglas A.J., McNulty M.S., Van der Eb A.J., Koch G. A single chicken anemia virus protein induces apoptosis. (1994) J. Virology 68, 346-351.

32. Noteborn, M.H.M. and van der Eb, A.J. Apoptin induced apoptosis; potential for antitumor therapy. (1998) Drug Resistance Updates 1, 99-103.

33. Noteborn, M.H.M. and Zhang, Y.-H. Methods and means for 20 determining the transforming capability of agents, for determining the predisposition of cells to become transformed and prophylactic treatment of cancer using apoptin-like activity. (1998) PCT application no PCT/NL/98/0725.

34. Noteborn, M.H.M., Zhang, Y.-H., and van der Eb, A.J. (1998b) Apoptin specifically causes apoptosis in tumor cells and after UV-treatment in untransformed cells from cancer-prone individuals: A review, Mutation Research 400, 447-455.

35. Pietersen, A.M., Van der Eb, M.M., Rademaker, H.J., Van den Wollenberg, D.J.M., Rabelink, M.J.W.E., Kuppen, P.J.K., Van Dierendonck, J.H., Van Ormondt, H., Masman, D., Van de Veld~, C.J.H., Van der Eb, A.J., Hoeben, R.C., and Noteborn, M.H.M. Specific tumor-cell killing with adenovirus vectors containing the Apoptin gene (1999) Gene Therapy, in press.

36. Remmers, E.F., Lafyatis, R., Kumkumian, G.K., Case, J.P., Roberts, A.B., Sporn, M.B., and Wilder, R.L. Cytokines and growth regulation of synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis and rats with streptococcal cell wall arthritis. (1990) Growth Factors 2, 1.79-188.

37. Sanes, J.R., Rubenstein, J.L., Nicolas, J.F. Use of a recombinant retrovirus to study post-implementation cell lineage in mouse embryos. (1986) EMBO J. 5, 3133-3142.

38. Sharp, J.T., Wolfe, F., Mitchell, D.M., and Bloch, D.A. The progression of erosions and joint space narrowing scores in theumatoid arthritis during the first twenty-fiv years of disease. (1991) Arthritis and rheumatism 34, 660-668.

39. Telford, W.G., King, L.E., Fraker, P.J. Comparative evaluation of several DNA-binding dyes in the detection 15 of apoptosis-associated chromatin degradation by flow cytometry. (1992) Cytometry 13, 137-143.

40. Van der Heyde, D.M., Van Leeuwen, M.A., Van Riel, P.L., Koster, A.M., Van't Hof, M.A., Van Rijswijk, M.H., and Van der Putte, L.B. Bian~ual radiographic assessments of hands and feet in a three-year prospective following patients with early rheumatoid arthritis. (1992) . Arthritis and Rheumatism 35, 26-34.

41. Van Zeben, D. Hazes, J.M., Zwlnderman, A.H., Vandenbroucke, J.P., and Breedveld, F.C. The severity of rheumatoid arthritis: a 6-year follow-up study of younger 8 women with symptoms of recent onset. (1994) J. Rheumatology 21, 1620-1625.

42. Wyllie, A.H. , Kerr, J.F.R., Currie, A.R. (1980) Cell death: The significance of apoptosis. International Review of Cytology 68, 251-306.

43. Wolfe, F. 50 years of antirheumatic therapy: the prognosis of rheumatoid arthritis. (1990) J. Rheumatology 17 (suppl 22), 24-32.

44. Zhang, Y., Abrahams, P., van der Eb, A.J., Noteborn, 35 M.H.M. (1999) Viral Protein Apoptin induces

apoptosis in UV-C-irradiated cells from individuals with various hereditary cancer-prone sydromes. In press.

45. Zhuang S.-M., Landegent J.E., Verschueren C.A.J., Falkenburg J.H.F., Van Ormondt H., Van der Eb A.J., Noteborn M.H.M. Apoptin, a protein encoded by chicken anemia virus, induces cell death in various human hematologic malignant cells *in vitro*. (1995) Leukemia 9 S1, 118-120.

46. Zhuang S. -M. , Shvarts A. , Jochemsen A. G. , Van Oorschot A.A.A.M., Van der Eb A.J., Noteborn M.H.M. Differential sensitivity to Ad5 EIB-21kD and Bcl-2

proteins of apoptin-induced versus p53-induced apoptosis. (1995a) Carcinogenesis 16: 2939-2945.

47. Zhuang S.-M., Shvarts A., Van Ormondt H., Jochemsen A.-G., Van der Eb A.J., Noteborn M.H.M. Apoptin, a protein derived from chicken anemia virus, induces a p53-independent apoptosis in human osteosarcoma cells. (1995b) Cancer Research 55, 486-489.

48047

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Apoptózist indukáló ágens alkalmazása gyulladásos rendellenességek kezelésére szolgáló gyógyszer előállítására, amely apoptózist indukáló ágens hatását (auto)immun betegségekben szerepet játszó vagy azokkal kapcsolatos, abnormális sejtekben fejti ki.

2. Apoptózist indukáló ágens alkalmazása immunológiai betegségek kezelésére szolgáló gyógyszer előállítására, amely apoptózist indukáló ágens hatását (auto)immun betegségekben szerepet játszó vagy azokkal kapcsolatos, abnormális sejtekben fejti ki.

3. Apoptózist indukáló ágens 2. igénypont szerinti alkalmazása immunológiai betegségként autoimmun betegségek kezelésére szolgáló gyógyszer előállítására.

4. Apoptózist indukáló ágenst expresszálni képes gént tartalmazó, gént célba juttató hordozó alkalmazása gyulladásos rendellenességek kezelésére szolgáló gyógyszer előállítására, amely apoptózist indukáló ágens hatását (auto)immun betegségekben szerepet játszó vagy azokkal kapcsolatos, abnormális sejtekben fejti ki.

5. Apoptózist indukáló ágenst expresszálni képes gént tartalmazó, gént célba juttató hordozó alkalmazása immunológiai betegségek kezelésére szolgáló gyógyszer előállítására, amely apoptózist indukáló ágens hatását (auto)immun betegségekben szerepet játszó vagy azokkal kapcsolatos, abnormális sejtekben fejti ki.

6. Gént célba juttató hordozó 5. igénypont szerinti alkalmazása immunológiai betegségként autoimmun betegségek kezelésére szolgáló gyógyszer előállítására.

7. Az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti alkalmazás, amely szerint a gént célba juttató hordozó öngyilkos gént is tartalmaz.

8. A 7. igénypont szerinti alkalmazás, amely szerint az öngyilkos gén indukálható.

9. A 4-8. igénypontok bármelyike szerinti alkalmazás, amely szerint a gént célba juttató hordozó tropizmussal rendelkezik hematopoetikus sejtek irányában.

10. A 4-8. igénypontok bármelyike szerinti alkalmazás, amely szerint a gént célba juttató hordozó tropizmussal rendelkezik fibroblaszt-szerű szinoviociták irányában.

11. A 4-10. igénypontok bármelyike szerinti alkalmazás, amely szerint a gént célba juttató hordozó célsejtre irányító eszközzel van ellátva, speciálisan fibroblaszt-szerű szinoviocitákra irányító eszközzel.

12. A 4-11. igénypontok bármelyike szerinti alkalmazás, amely szerint a gént célba juttató hordozó rekombináns adenovírust tartalmaz.

13. Az 1-12. igénypontok bármelyike szerinti alkalmazás, amely szerint az apoptózist indukáló ágens apoptint vagy funkcionális fragmensét, származékát vagy ekvivalensét tartalmazza.

14. Az 1-13. igénypontok bármelyike szerinti alkalmazás, amely szerint az apoptózist indukáló ágens indukálható.

15. Eljárás olyan sejtek jelenlétének meghatározására, amelyekről valószínűsíthető, hogy (auto)immun betegséget okoznak, *azzal jellemezve*, hogy a feltételezett sejtekbe beviszünk apoptin-szerű aktivitást, és a sejteket stressznek, például ozmotikus stressznek, hősokknak, fertőző stressznek, UV vagy kémiai stressznek vetjük alá, és meghatározzuk az apoptózis mértékét.

16. Eljárás autoimmun betegség jelenlétének meghatározására egy egyedben, *azzal jellemezve*, hogy autoimmun betegséggel együttjáró sejteket tartalmazó mintát veszünk az egyedből, a sejtekbe apoptin-szerű aktivitást juttatunk, és meghatározzuk az apoptózis mértékét.

A meghatalmazott:

DANUBIA

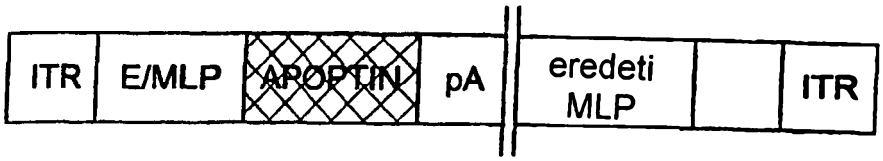
Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

dr. Pethő Árpád

szabadalmi ügyvivő

44 oldal leírás
1 oldal rajz
45 oldal

Rekombináns AdMLPvp3



- Ad5/E1-deletált: replikáció deficiens
- E1a-enhanszer + fő késői promóter

1. ábra

Ad-vektor	RA-ból származó FLS mennyisége	
	NST	ST
LacZ	+++	++++
Apoptin	+/-	-/-
NoN	++++	+++++

2. ábra