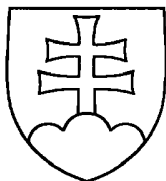


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA VYNÁLEZU

- (22) Dátum podania: 14.07.97
(31) Číslo prioritnej prihlášky: 196 30 557.8
(32) Dátum priority: 18.07.96
(33) Krajina priority: DE
(40) Dátum zverejnenia: 16.05.2000
(86) Číslo PCT: PCT/EP97/03740, 14.07.97

(21) Číslo dokumentu:

67-99

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl.7 :

G 01N 33/564

G 01N 33/573

A 61K 38/45

(71) Prihlasovateľ: Schuppan Detlef, Berlin, DE;
Dieterich Walburga, Erlangen, DE;

(72) Pôvodca vynálezu: Schuppan Detlef, Berlin, DE;
Dieterich Walburga, Erlangen, DE;
Ehnis Tobias, Erlangen, DE;

(74) Zástupca: Bušová Eva, JUDr., Bratislava, SK;

(54) Názov prihlášky vynálezu: **Imunologický spôsob na detekciu protilátok proti tkanivovej transglutamináze /tTG/, použitie tTG v diagnostike a kontrole terapie a orálny farmaceutický prostriedok obsahujúci tTG**

(57) Anotácia:
Detekcia protilátok v telesných kvapalinách imunitnou reakciou tkanivovej transglutaminázy /tTG/ so zlúčeninami obsahujúcimi tTG, jej antigénne štruktúry, imuno-reaktívne sekvencie alebo jej analógy. Spôsob sa môže použiť v diagnostike a pri kontrole terapie ochorení, spojených s imunitnou reakciou proti tTG, zlúčeninám obsahujúcim tTG a jej antigénnym štruktúram, imuno-reaktívnym sekvenciám alebo ich analógom. Ďalej je opísané použitie tTG a uvedených substancií v diagnostike a kontrole terapie, v diagnostike a kontrole terapie chronických zápalových ochorení alebo autoimunitných ochorení, v diagnostike a kontrole terapie sprue alebo celiakie.

01-74-99-Če

Imunologický spôsob na detekciu protilátok proti tkanivovej transglutaminázie /tGT/, použitie tGT v diagnostike a kontrole terapie a orálny farmaceutický prostriedok obsahujúci tGT

Oblasť techniky

Predkladaný vynález sa týka spôsobu na detekciu protilátok v telesných kvapalinách pomocou imunitnej reakcie s tkanivovou transglutaminázou /tGT/, jej antigénnymi štruktúrami, imunoreaktívnymi sekvenciami alebo ich analógami a so zlúčeninami obsahujúcimi tGT, jej antigénnymi štruktúrami imunoreaktívnej sekvencie alebo ich analógami. Spôsob sa môže použiť v diagnostike a pri kontrole terapie ochorení spojených s imunitnou reakciou proti tGT, zlúčeninám obsahujúcim tGT a jej antigénnym štruktúram, imunoreaktívnym sekvenciám alebo ich analógom. Preto je vynález tiež zameraný na použitie tGT a vyššie uvedených substancií v diagnostike a kontrole terapie, výhodne v diagnostike a kontrole terapie chronických zápalových ochorení alebo autoimunitných ochorení a výhodne v diagnostike a kontrole terapie sprue alebo celiakie. Vynález sa tiež týka orálneho farmaceutického prostriedku, ktorý obsahuje tGT, zlúčeniny obsahujúce tGT a antigénne štruktúry, imunoreaktívne sekvencie alebo ich analógy ako aktívne zložky a ktorý môže byť použitý na liečbu ochorení spojených s imunitnou reakciou proti týmto substanciam, pretože orálne podanie vyššie uvedených zlúčenín vyvoláva imunitnú toleranciu.

Predkladaný vynález je založený na objave, že tkanivová

transglutamináza /tTG,EC 2.3.2.13/ je autoantigén pri sprue alebo celiakii.

Na základe vyššie uvedeného objavu bola vyvinutá imunologická metóda podľa predkladaného vynálezu na detekciu protilátok proti tTG a zlúčenín obsahujúcich tTG.

Doterajší stav techniky

Celiakia je ochorenie sliznice tenkého čreva, ktorého prvé prejavy sú obyčajne počas pozdneho detského a kojeneckého veku. Ak sa zodpovedajúci klinický obraz neobjaví pred dospelosťou, tak sa toto ochorenie volá netropická sprue. Preto oba tieto termíny označujú rovnaké ochorenie. Sprue doprevádza zápalové zmeny na sliznici a celková malabsorpcia, ktorá vzniká v dôsledku týchto zmien. Vo väčšine prípadov je prítomná morfológická a klinická odpoveď na liečbu bezlepkovou diétou.

Dobre známym patogénnym faktorom sú glutény z pšenice, jačmeňa, raže a v určitom rozsahu aj prosa, pokiaľ glutény z rastlín s nižším stupňom fylogenetickú príbuznosti, ako je kukurica, ryža a sója, sú nepatogénne. U týchto gluténov je úloha patogénneho činidla pripísaná prolamínom rozpustným v alkoholoch, hlavne α -gliadínu.

Preto sa sprue vyskytuje hlavne v krajinách, v ktorých sa pšenica používa ako hlavný zdroj potravy /Európa, USA, Austrália/ a jej incidenciou je napríklad 0,14/1000 novorodených detí v Dánsku, 0,7/1000 v Španielsku, 1/100 v Taliansku, 0,45/1000 v Nemecku a 2,42/1000 vo Švédsku.

No novšie výskumy ukázali, že subklinické príznaky, t.j. morfológické zmeny bez masívnych príznakov sú častejšie, ako sa dosiaľ predpokladalo. Tak ukázala štúdia, urobená v Taliansku v roku 1994 incidenciu 3,28/1000 medzi deťmi školského veku. Riziko latentnej sprue je u ďalších detí týchto pacientov až 50 %.

Predominantne latentná sprue je často doprevádzaná polymorfnou dermatózou, t.j. dermatitis herpetiformis, pri ktorej sú pozorované charakteristické subepidermálne malé pluzgieriky s granulórnymi depozitami IgA vo vrcholoch dermálnych papíl. Biopsie tenkého čreva ukazujú nepravidelnú, viac alebo menej poškodenú sliznicu.

Iné dobre určené asociácie sú medzi sprue a inzulín-dependentným diabetes mellitus, ochoreniami štítnej žlázy a selektívnej IgA deficiencie.

Okrem mnohých ďalších sprievodných klinických príznakov sprue, ako je anémia, ktorá bola okrem iného prisúdená malabsorpcii vitamínu B₁₂ a deficiencie vitamínu K, ktorá je dôvodom na vyššiu krvácanosť, má zvláštny význam značne zvýšené riziko na gastrointestinálne maligné nádory. Až u 15% pacientov so sprue sa obyčajne vo veku nad 50 rokov vyvinie neoplastické ochorenie a približne v 50 % sa jedná o črevné T-bunečné lymfómy a v ďalších 25 % sa jedná o tumory hrtana, orofaryngu a tenkého čreva.

Terapia sprue zahŕňa celoživotné dodržiavanie bezlepkovej diéty, pri ktorej musia byť vylúčené nielen výrobky obsahujúce glutén z pšenice, ale tiež z jačmeňa, žita

a prosa. Pre pacientov toto predstavuje ťažké obmedzenie ako diétnych zvykov, tak sociálnych interakcií.

Ak je diagnóza a terapia sprue urobená včas, potom má dobrú prognózu. Na raz vzniknuté komplikácie nie sú často kompletne reverzibilné. Naopak, u nerozpoznaného a neliečeného ochorenia môže dôjsť v dôsledku malabsorpcie k vzniku závažných príznakov. Nakoniec je tu zvýšené riziko vzniku črevných lymfómov a iných malignít gastrointestinálneho traktu.

V súčasnosti predstavuje biopsia tenkého čreva najlepší štandard v diagnostike sprue a pri sledovaní pri bezlepkovej diéte, ale stále dôležitejšími sa stávajú neinvazívne diagnostické metódy založené na imunologických markeroch. Pretože v sére pacientov trpiacich sprue sú prítomné protilátky triedy IgA a IgG, ktoré sú namierené proti gliadínu a proti autoantigénu endomýzia, čo je špecifické pojivové tkanivo, ktoré okrem iného obsahuje kolagény I, III a V, elastické vlákna, nekolagénne proteíny ako je fibronektín a proteoglykány, môže byť sérum testované na IgG a IgA protilátky proti gliadínu pomocou ELISA a na IgG a IgA protilátky proti endomýsiu pomocou nepriamej fluorescencie. Pokiaľ protilátky proti gliadínu nie sú dostatočne špecifické pre sprue, vysoká senzitivita a špecificita /97- 100%/ je popísaná pre IgA Ab proti endomýsiu. No pre detekciu pomocou imunofluorescencie sú potrebné vzorky z pažeráka primátov. V súčasnej dobe sa robia pokusy o detekciu protilátok proti endomýsiu z pupočníkového materiálu.

V roku 1984 opísali Maury a Teppo /Ancient 1984, 20: 892

-894/ 90 kDa glykoproteín bohatý na mannózu/20 %obsahu cukru/ ako zložku normálnej kože a sliznice tenkého čreva. Boli schopní identifikovať cirkulujúce IgG imunikomplexy schopné detekovať uvedený proteín u 10 z 20 pacientov s celiakiou a u 7 z 12 pacientov postihnutých herpetiformnou dermatitídou /ochorením, ktoré je považované za epidermálny príznak celiakie/. Opísaný kDa glykoproteín je charakterizovaný tým, že má 90 % obsah mannózy, kým tTG je neglykosylovaný aj napriek prítomnosti 6 glykosilačných miest /Ichinose et al., J. Biol. Chem., 1990, 265: 13411- 13414/.

V roku 1986 vyšetrovali Maury et al., /viď Gut, 1986, 27: 147 - 152/ uvedené protilátky ELISA testom so sérom pacientov postihnutých celiakiou a kontrolným sérom. Sérum od pacientov s celiakiou vykazovalo signifikantne vyššie hladiny protilátok / $p < 0,001$ / ako kontrolné sérum. Uvedené zvýšené hladiny poklesli na normálne hodnoty po bezlepkovej diéte. Nepreukázala sa žiadna korelácia s anti-retikulínovými protilátkami.

Pri včasnej diagnostike a prísnom dodržiavaní bezlepkovej diéty môže byť ochorenie udržiavané v remisii a tak môže byť tiež zvýšené riziko malignít u pacientov udržiavané v normálnych hodnotách. Preto existuje značná potreba vývoja vhodného detekčného testu pre sprue. Pretože skupina jedincov s latentnou sprue tiež patrí do skupiny s vysokým rizikom, mali by byť všetci rizikovní jedinci /hlavne vzdialení príbuzní/ a nakoniec, všetky školopovinné deti, ako sa teraz uvažuje v Taliansku, vyšetrovaní pomocou senzitivneho, špecifického, ľahko zrealizovateľného a lacného testu.

No doteraz zlyhali skriningové programy v dôsledku nasledujúcich problémov:

- invázivné biopsie z duodena u bezpríznakových oôb sú neprijateľné a nadmerne nákladné,

- ELISA detekcia pomocou protilátok proti gliadínu je sotva použiteľná pre jej nízku špecificitu,

- imunofluorescenčná detekcia protilátok proti endomýziu triedy IgA, ktorá je urobená na pažeráku primátov, je tiež nákladná ako normálna skriningová metóda. Okrem toho, hodnotenie je subjektívne a neumožňuje identifikáciu pacientov so sprue majúcich deficienciu IgA /2 % pacientov/.

Preto doteraz neexistuje neinvázivný, špecifický, kvantitatívny, rýchly, ľahký a lacný prijateľný detekčný test pre sprue/celiakiu a na kontrolu liečby týchto ochorení.

Podstata vynálezu

Tento problém je vyriešený v predkladanom vynáleze. Na základe prekvapivého zistenia, že tkanivová transglutamináza /tTG, EC 2.3.2.13/ je autoantigénom pri sprue, bola vyvinutá imunologická technika podľa nároku 1 až 6 na detekciu protilátok proti tTG a zlúčeninám obsahujúcich tTG z telesných kvapalín, hlavne zo séra, kde táto metóda umožňuje nielen diagnostiku sprue alebo celiakie, ale tiež ochorení doprevádzaných imunitnou reakciou proti tTG, zlúčeninám obsahujúcich tTG, jeho antigénne štruktúry, imunoreaktívne sekvencie alebo analógy.

Tkanivová transglutamináza patrí do triedy transglutamináz. TG /EC 2.3.2.13/ sú enzýmy, katalyzujúce prenos acylovej skupiny závislý na Ca^{2+} , γ -karboxamidových skupín peptidovou väzbou viazaných glutamínových zvyškov, ktoré pôsobia ako donory acylovej skupiny. Primárne proteínové lyzínové zvyšky pôsobia ako akceptory acylovej skupiny, takže prenosom vzniká ϵ -(γ - glutamyl) lyzínová väzba. Substrátová špecificita TG s ohľadom na donory acylovej skupiny je veľmi vysoká /v závislosti od aminokyselinovej sekvencie/, pokiaľ existuje vynímočne veľké spektrum akceptorov /Folk J.E., Annu.Rev.Biochem., 1980, 49: 517-531/. Tvorené kovalentné peptidové väzby sú vysoko stabilné a rezistentné na proteázy, čo vedie k zvýšenej rezistencii skrížene viazaných proteínov na chemické, enzymatické alebo fyzikálne vplyvy.

Taktiež rozšírený výskyt rôznych TG v rôznych orgánoch, tkanivách a plazme a intersticiálnej tekutine koreluje s výskytom transglutamizami modifikovaných proteínov v krvných zrazeninách, bunčných membránach, rohovatejúcej vrstve epidermis, vlasoch, nechtoch a extracelulárnej matrix /Greenberg C.S.et al., FASEB J. 1991, 5: 3071 - 3077/.

Opísané transglutaminazy môžu byť rozdelené podľa ich fyzikálnych vlastností, ich lokalizácie v tele a podľa ich primárnej štruktúry.

Tkanivová TG /tTG/ je tiež označovaná ako bunčná, erytrocytárna, endoteliálna, cytoplazmatická, pečeneňová alebo typ II TG, a to je monomer majúci molekulovú hmotnosť 75 - 85 kDa.

Kompletná aminokyselinová sekvencia obsahujúca 687 zvyškov bola odvodená z cDNA. Na proteínovej úrovni tu existuje 84% homológie medzi ľudským enzýmom a enzýmom myších makrofágov a 81 % homológie medzi ľudským enzýmom a enzýmom morčiat. Často nemá výmena nukleotidov, medzi týmito druhmi žiaden vplyv na aminokyselinovú sekvenciu. Aktívne centrum je vysoko konzervované, s vyznačenou homológiou proteínu medzi tromi druhmi /49 z 51 zvyškov je identických / a s vysokým stupňom homológie proteínu /75%/ s a-podjednotkou faktoru XIII /viď Gentile V.et al., J Biol. Chem., 1991, 266: 478 - 483, Greenberg C.S. et. al., FASEB J. 1991, 5: 3071 - 3077/.

Tu nie je prítomný ani signálny peptid, ani glykosilácia a aj napriek prítomnosti mnohých cysteínových zvyškov tu nie sú disulfidové mostíky. Pomocou fluorescenčnej hybridizácie bol gén pre ľudskú transglutaminázu lokalizovaný na chromozóm 20q12 /Gentile, V.et al., Genomics, 1994, 20:295 - 297/. Hoci mechanizmus uvoľňovania enzýmu stále nie je známy, existuje jasný dôkaz, že tTG so svojím intracelulárnym výskytom má významnú funkciu v extracelulárnej matrix /ECM/. Okrem toho, nie je pravdepodobné, že by intracelulárna koncentrácia Ca^{2+} , potrebná pre aktivitu tTG sa dosiahla za fyziologických podmienok, pokiaľ dostatočne vysoké koncentrácie Ca^{2+} sa vyskytujú extracelulárne /Gentile V. et al., J.Cell. Biol., 1992, 119: 463 - 474/.

Niekoľko výskumov určilo asociáciu tTG s fibronektinom-proteínom ECM. Okrem fibronektínu môžu byť molekly ECM ako je nidogén, N-termálny peptid prokolagénu III, kolagén V a XI, osteonektín, čo je glykoproteín asociovaný s mikrofibrilami, drmatan-sulfátový proteoglykán s vysokou molekulovou hmotnosťou a galectín 3 lektín, identifikované ako špecifické

substráty pre tTG.

Dôkazy o významnej úlohe tTG pri hojení rán boli tiež získané z imunifluorescenčných štúdií na kultivovaných WI38 bunkách /pľúcne embryonálne fibroblasty/, ktoré nevykazujú extracelulárnu tTG aktivitu za normálnych podmienok, ale existuje u nich extracelulárna depozícia enzýmu pri arteficiálnej tvorbe rán. Pravdepodobne pasívnym uvoľnením enzýmu z poranených buniek nasleduje nekovalentná väzba na ECM, hlavne na fibronektín a fibrilárne kolagény a enzým je aktívny počas niekoľkých hodín /Upchurch, H.F.et al., J Cell Physiol. 1991, 149: 375 - 382/. V krysom modeli, tiež po tvorbe poranení bolo detekované 5 denné zvýšenie aktivity tTG /Bowness, J.M.et al., Biochem. Biophys. Acta, 1988, 967: 234 - 240/. Tiež pri inkubácii lyzátu ľudských erytrocytov s plazmou môže byť detekovaná silná afinita uvoľnenej tTG k fibronektínu /Loraud,L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988, 85: 1057 - 1059/. Všetky objavy ukazujú, že väzba tTG na ECM má centrálnu úlohu v skorej fáze hojenia rán a hlavne, že spôsobuje stabilizáciu fibrínu spolu s faktorom XIII, čo tvorí ochrannú vrstvu a stabilný adhézivný substrát okolo poškodených buniek prostredníctvom skríženej väzby extracelulárnych proteínov. Doteraz nebol pri stavovcoch detekovaný žiaden enzým schopný štiepenia tTG katalyzovaných, enormne stabilných skrížených väzieb.

Na základe zistení, že tTG je autoantigénom pri sprue, je vynález tiež zameraný na použitie tTG, zlúčenín obsahujúcich tTG, jeho antigénne štruktúry, imunologické sekvencie a analógy pri diagnostike a kontrole terapie ochorení, spojených s imunologickou reakciou proti uvedeným

zlúčeninám. Konkrétne môžu byť týmto spôsobom diagnostikované akútne zápalové ochorenia ako je pneumónia, glomerulonefritída, vírusová hepatitída alebo chronické zápalové ochorenia ako je Crohnova choroba, Colitis ulcerosa alebo autoimunitné ochorenia ako je autoimunitná hepatitída, Sjogrenov syndróm, Wegenerova granulomatóza, reumatoidná artritída, idiopatická orgánová fibróza, ako je napríklad pľúcna fibróza. Hlavne je výhodný detekčný test pre diagnostiku a kontrolu terapie sprue. Pretože tento test môže byť urobený rýchlo a lacno, umožňuje vyšetrenie populácie na prítomnosť protilátok proti tTG.

tTG použitý podľa predkladaného vynálezu môže byť zvieracieho, syntetického alebo rekombinantného pôvodu a to isté platí pre zlúčeniny obsahujúce tTG, ktoré môžu byť navyše kombinovaného pôvodu /napríklad zvierací tTG spolu so syntetickým peptidom/. Podľa predkladaného vynálezu sú zlúčeniny obsahujúce tTG chemické zlúčeniny tTG alebo jeho analógov s proteínmi. Podľa predkladaného vynálezu sú tTG analógy alebo analógy týchto zlúčenín obsahujúcich tTG všetky antigénne štruktúry, ktoré reagujú s protilátkami proti tTG alebo zlúčeninám obsahujúcich tTG, napríklad syntetické peptidy. Imunoreaktívne sekvencie sú fragmenty tTG alebo zlúčenín obsahujúcich tTG, ktoré sú vyrobené proteolýzou syntézou alebo genetickým spracovaním, rovnako ako varianty získané výmenou aminokyselín.

Imunologická detekcia podľa predkladaného vynálezu je urobená podľa dobre známych techník. Tak môže byť pre detekciu protilátok u pacienta použitá akákoľvek priama /napríklad za použitia senzorového čípu/ alebo nepriama technika.

Pri priamych technikách je väzba detekovanej protilátky na antigén určená prostredníctvom zmeny fyzikálnych alebo chemických vlastností, takže nie sú potrebné následné kroky detekcie, využívajúce značené väzbové druhy protilátok.

Podľa predkladaého vynálezu je výhodné detekovať protilátky proti tTG pomocou imunotestu, výhodne imunotestu na pevnej fáze s priamym alebo nepriamym naviazaním reakčného činidla na ľahko detekovateľnú označenú substanciu. Výhodnejšie môže byť detekcia urobená s použitím ELISA alebo RIA alebo imunofluorescenčného testu. Techniky použité pri takýchto metódach detekcie sú odborníkom v odbore dobre známe.

V ELISA je napríklad antigén, v tomto prípade tTG, naviazaný priamo alebo nepriamo na nosič ako je napríklad polystyrén. Po inkubácii s detekovanou protilátkou, napríklad zo séra pacientov, sú protilátky naviazané na antigén detekované priamo alebo nepriamo pomocou substancií s naviazaným enzýmom. Týmito substanciami môžu byť protilátky, fragmenty protilátok alebo vysokoafinitné ligandy, ako je avidín, ktorý sa viaže na biotínovú značku. Ako enzýmy možno použiť napríklad peroxidázu, alkalickú fosfatázu, β -galaktosidázu, ureázu alebo glukózooxidázu. Naviazané enzýmy a tak aj naviazané protilátky, môžu byť kvantifikované, napríklad pomocou pridania chromogénneho substrátu.

V RIA je antigén, napríklad tTG, naviazaný podobne priamo alebo nepriamo na nosič, ako je napríklad polystyrén. Po inkubácii s detekovanou protilátkou, napríklad zo séra pacientov, sú protilátky naviazané na antigén, detekované

pomocou rádioaktívne označených substancií, napríklad substancií označených I^{125} . Týmito substanciami môžu byť protilátky, fragmenty protilátok alebo vysokoafinitné ligandy, ako je avidín, ktorý sa viaže na biotínovú značku. Naviazaná rádioaktivita môže byť kvantifikovaná pomocou vhodného meracieho prístroja.

V imunofluorescenčnom teste sú protilátky naviazané na antigén detekované podľa rovnakého princípu pomocou fluorescenčného činidla označených substancií, napríklad substancií označených fluoresceín-izotiokyanátom /FITC/. Týmito substanciami môžu byť protilátky, fragmenty protilátok alebo vysokoafinitné ligandy, ako je avidín, ktorý sa viaže na biotínovú značku. Množstvo naviazaného fluorescenčného farbiva je potom kvantifikované pomocou vhodného meracieho prístroja.

Podľa predkladaného vynálezu je tiež možno detekovať protilátky u pacienta v aglutinačnom teste alebo v teste gélovej difúzie. Tieto detekčné testy sú tiež odborníkom v odbore dobre známe. Tak v teste gélovej difúzie je roztok antigénu alebo protilátok, napríklad umiestnený do tesne susediacich jamôk agaru alebo agarozových platní. V tomto prípade môže byť roztok antigénu napríklad roztok tTG a roztok protilátky môže byť napríklad krvné sérum. Keď substancie difundujú preč zo svojich jamiek, tvoria sa koncentračné gradienty od jamiek. Ak prekrývajúce sa koncentrácie protilátky a antigénu v géli spadajú do špecifických pomerov a roztok protilátky obsahuje protilátku proti antigénu, potom sa v géli tvoria detekovateľné zrazeniny.

V aglutinačnom teste sú častice nesúce antigén /napríklad tTG/, vyrobené napríklad z latexu alebo polystyrénu, krížene viazané s protilátkami, napríklad zo séra. Tvorené agregáty môžu byť detekované napríklad pomocou turbidimetrickej analýzy.

Podľa predkladaného vynálezu je hlavne výhodné realizovanie detekcie v sére pacientov so sprue pomocou IgA-špecifickej alebo IgG špecifickej ELISA. Bolo zistené, že novo vyvinutá detekcia IgA protilátok v sére pacientov so sprue pomocou ELISA založenej na tTG sa vynímočne dobre hodí na diagnostiku a kontrolu terapie sprue vďaka svojej vysokej senzitivite a špecificite. Táto skutočnosť je tiež jasná pri sledovaní liečených pacientov /pokles titru počas terapie/. Porovnávanie dát z ELISA podľa predkladaného vynálezu s imunofluorescenčným hodnotením tretích osôb /detekcia IgA anti-endomýzium/ vykazuje dobrú konformitu. Nezhody sa vyskytujú hlavne pri nízkom titre protilátok, no sú dôsledkom toho, že nepriama fluorescencia bola doposiaľ považovaná za vrcholný štandard. Okrem iného je toto spôsobené subjektivitou hodnotenia a nešpecifickými súbežnými reakciami, ktoré sa vyskytujú pri tejto skoršej v odbore známej techniky.

Zodpovedajúca detekcia založená na protilátkach iných tried, napríklad IgG protilátkach, je vhodná na identifikáciu sprue u pacientov s deficitom IgA a na vyšetovanie iných ochorení spojených s imunitnou reakciou proti tTG.

Iné vylepšenie tejto detekčnej techniky je dosiahnuté pri použití prečistenej tTG od morčiat, ľudskej tTG, sekvencií alebo analógov získaných proteolýzou alebo genetickým

spracovaním, rovnako ako pri použití syntetických imunogénnych tTG peptidov v testovacom systéme. ELISA na diagnostiku a sledovanie iných ochorení spojených s imunitnou reakciou proti tTG bude opísaný v príklade 3.3.

Vynález je tiež zameraný na orálny farmaceutický prostriedok podľa nároku 10 na liečbu ochorení spojených s imunitnou reakciou proti tTG, zlúčením obsahujúcim tTG, jeho antigénnym štruktúram, imunoreaktívnym sekvenciám alebo analógom. Výhodne je prostriedok na orálne podanie tableta alebo kapsula, kedy je orálna tolerancia vytvorená podávaním tTG, zlúčením obsahujúcich tTG alebo jeho antigénnych štruktúr, imunoreaktívnych sekvencií alebo analógov. Na jednej strane je uvedená orálna tolerancia dosiahnutá orálnym podávaním autoantigénu a na druhej strane tu existuje takzvaný "príbuzný efekt": ak je autoantigén indukujúci ochorenie neznámy, potom môže byť v niektorých prípadoch v orálnej terapii použitý iný antigén kontaktujúci imunitný systém v cieľovom orgáne. Tento antigén je potom schopný lokálnej stimulácie supresorových T buniek špecifických pre antigén, čo vedie k potlačeniu systémovej imunitnej odpovede. Len vyššie dávky antigénu indukujú anergiu autoreaktívnych T buniek.

Orálna tolerancia je praktický spôsob na liečbu rôznych autoimunitných ochorení.

Farmaceutické činidlo podľa predkladaného vynálezu je výhodne použité pri liečbe sprue, ale môže sa tiež použiť pre iné chronické zápalové črevné ochorenia a autoimunitnú hepatitídu.

Podľa predkladaného vynálezu sú tTG zlúčeniny, obsahujúce

tTG, jeho antigénne štruktúry, imunoreaktívne sekvencie alebo analógy v dávke 0,01 - 100 mg/kg telesnej hmotnosti.

Farmaceutické činidlá podľa predkladaného vynálezu môžu prípadne obsahovať farmaceuticky prijateľné pomocné činidlá, ako sú plnidlá, klzné činidlá, činidlá podporujúce rozpadavosť, pojivá alebo činidlá upravujúce uvoľňovanie, ako sú bežne používané vo farmácii. Pomer farmaceutických pomocných činidiel môže byť rôzny, podľa vybraného obsahu aktívneho činidla a v každom prípade je od 0,1 % do 20 % hmotnosti.

Konkrétne, výhody doiahnuté pomocou predkladaného vynálezu je možno pozorovať v detekčnom teste pre sprue a na kontrolu terapie sprue, kde tento test je neinvázivný, vysoko špecifický a je zameraný priamo na činidlo spojené s ochorením. Ďalej je hlavná výhoda tohto vyvinutého testu je tá, že je rýchly, ľahký a lacný, rovnako ako to, že existuje možnosť štandardizácie medzi rôznymi laboratóriami. Preto test umožňuje účinné vyšetrenie populácie na prítomnosť protilátok proti tTG.

Také potenciálne kvantitatívne hodnotenie je pre objektivitu dát získaných v teste, lepšie v porovnaní s hodnotením pomocou imunofluorescencie, ktoré obsahuje subjektívnu zložku. Okrem toho, imunofluorescenčné hodnotenie je, hlavne pri nízkych titroch, ovplyvnené nežiadúcim spôsobom nešpecifickými súbežnými reakciami. Pri použití špecifického autoantigénu v teste môžu byť v najvyššej možnej miere eliminované nešpecifické reakcie na materiáli, získanom z pažeráka primátov alebo pupočníka.

Pretože test je použiteľný na triedu IgA protilátok, rovnako ako na iné triedy protilátok, sú tiež identifikovaní pacienti s deficitom IgA. Detekcia založená na protilátkach proti tTG je tiež vhodná na identifikáciu, vyšetovanie a kontrolu terapie iných ochorení spojených s imunitnou reakciou proti tTG.

Tiež je možné - dôsledkom identifikácie tTG ako autoantigénu pri sprue - použiť tento autoantigén alebo jeho imunoreaktívne epitopy /sekvencie, analógy alebo syntetické peptidy produkované proteolýzou alebo genetickým spracovaním/ v orálnej terapii sprue a iných ochorení spojených s imunitnou reakciou proti tTG.

Príklady realizácie vynálezu

Príklad 1 - Izolácia a charakterizácia autoantigénu

1.1. Imunofluorescencia, APAAP farbenie

Farbenie bolo robené na rôznych bunčných líniách fixovaných v 100 % metanoeu počas 2 minút pri - 20 °C.

Pri imunofluorescentnej detekcii boli prípravky inkubované so sérom od pacientov so sprue a s kontrolným sérom v príslušnom poradí, boli premyté a urobila sa detekcia pomocou TRITC-značenej králičej protilátky proti ľudskému IgA /Schuppan et al., J.Biol.Chem. 1990, 265: 8823 - 32/.

Značenie APAAP bolo urobené po inkubácii buniek so sérom od pacientov so sprue, po premytí a následnej detekcii pomocou APAAP komplexu /Cordell, J.L.et.al., J.Histochem. Cytochem. 1984, 32: 219 - 229/.

V týchto testoch vykazujú HT1080 /bunky ľudského fibrosarkomu/, WI138 /ľudské pľúcne embryonálne fibroplasty/, Hep1 a Hep2 /bunky hepatocelulárneho karcinómu/ rovnaké pozitívne cytoplazmatické signály zo sérami od pacientov, pokiaľ normálne séra alebo séra dopredu ošetrované ľudským IgA nevykazujú žiadne označenie. Ľudské fibroplasty predkožky, ľudské radbomyosarkomové bunky /RD/ krysie Ito/krysi Morris hepatómvej a psey MDCK bunky vykazovali len veľmi slabé až negatívne reakcie.

1.2. Metabolické značenie buniek a imunoprecipitácia autoantigénu

Charakterizácia a izolácia autoantigénu bola urobená pomocou HT10780 buniek.

Bunky boli kultivované s L-alanyl-L-glutamínom, 10 % fetálnym telacím sérom /FCS, Gibco/, 100 U/ml penicilínu a 100 µg/ml streptomycínu /Seromed/ v Dulbecco modifikovanom Eagle médiu /DMEM, Gibco/ pri 37⁰C a 8 % CO₂. Pre metabolické značenie boli bunky prenesené na kultivačné platne o priemere 5 cm a po dosiahnutí asi 90 % konfluencie boli uchovávané v médiu bez metionínu a FCS a potom bolo médium nahradené 3 ml média bez FCS, ktoré obsahovalo ³⁵S-metionín /0,2 mCi. Expre³⁵S³⁵S, NEN-Dupont/. Po 16 - 20 hodinách inkubácie bol odstránený supernatant. Bunky boli premyté fosfátovým pufrom

/PBS, Seromed/ a potom boli lyzované v 3 ml lyzačného pufru /50 mM tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,5 % Tritón X-100, 0,5 % IGEAL CA-630 neionického detergentného činidla /Sigma/, Complete^R inhibítora proteas /Boehringer/, pH 7,5/. Potom bola urobená imunoprecipitácia pomocou CNBr-aktivovanej Separóza 4B /Pharmacia/ ako v médiu, tak v lyzáte buniek.

Aktivácia a väzba na Separózu bola urobená podľa návodu výrobcu. Po napučaní a premytí v 1 mM HCl, pH 2,5 bola Separóza aktivovaná CNBr inkubovaná s králičou protilátkou proti ľudskému IgA /Dianova, 2,4 mg protilátky na ml Separózy/ v 0,1 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl, pH 8,3 pri 4⁰ C cez noc. Nenaviazané protilátky boli odstránené premytím vo väzobnom pufri a neobsadené väzobné miesta boli nasýtené pridaním 1 M etanolamínu, pH 9,0, pri izbovej teplote, 2 hodiny. Potom bola Separóza premytá 3x striedavo /každý raz 10x objemom/ 0,1 M octanom sodným, 0,5 M NaCl, pH 4,0 a 0,1 M Tris-HCl, 0,5 M NaCl, pH 8,0 a potom nasledovala inkubácia Separózy so sérami od pacientov so sprue a od zdravých osôb, vo väzobnom pufri /50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, pH 8,0 / pri teplote 4⁰ C cez noc. Nadbytok sérových protilátok bol odstránený trojitým premytím väzobným pufrom.

Každý raz bol 1 ml HT1080 média alebo lyzátu buniek /približne 5 x 10⁴ buniek/ metabolicky značených buniek inkubovaný s 50 µl C14B Separózy /Pharmacia/ počas 30 minút pri izbovej teplote, na odstránenie nešpecificky sa viažúcich proteínov. Po centrifugácii /10000 x g, 5 minút, 4⁰ C / bol každý supernatant inkubovaný za trepania pri 4⁰ C cez noc s 50 µl Separózy, na ktorú boli dopredu naviazané IgA od pacientov a kontrolných osôb.

Pelety separózy boli potom premyté každý raz 3 x 1 ml premývacieho pufru /10 mM Tris-HCl, 1 % IGEAL CA-630 /Sigma/, 0,5 % deoxycholátu sodného, 0,1 % laryl síranu

sodného. Complete^R /Boehringer/ pH 8,0 / a potom 1 ml 10 mM Tris-HCl pH 8,0. Potom boli pelety umiestnené do SDS testovacieho pufru, boli inkubované počas 5 minút pri 95 °C za redukčných alebo neredukčných podmienok, bola urobená separácia na 10 - 12,5 % SDS polyakrylamidovom géli /Lammi. U.K., Nature 1970, 227: 680 - 685/ a bola urobená detekcia pomocou autorádiografie /obr. 1/.

V ďalšom vyšetrowaní bolo zistené, že proteín s vysokou molekulovou hmotnosťou naviazaný v médiu je fibronektín, ktorý okrem iného je nešpecificky naviazaný na Separózu.

No s bunkami asociovaný proteín o hmotnosti 80 kDa môže byť vyvráňaný týmto spôsobom zo všetkých 30 doteraz použitých sér od pacientov so sprue, no nemôže byť vyvráňaný z 15 kontrolných sér, včítane normálnych sér, sér od pacientov s Colitis ulcerosa a Sjorgenovým syndrómom. Z tejto skutočnosti bol vyvodený záver, že tento proteín predstavuje základný autoantigén pri sprue.

Pomocou proteínového farbenia gélov pomocou dusičnanu strieborného /Henkenshoven, J. et al., Electroforesis 1985, 6: 103 - 112/ , bol tenký proteínový prúžik priradený k autorádiograficky viditeľnému 85 kDa prúžiku.

1.3. Izolácia a prečistenie 85 kDa autoantigénu

Na izoláciu väčšieho množstva autoantigénu bolo kultivované celkom 65 kultivačných platní /každá 175 cm²/ s HT1080 bunkami. Krátku dobu pred dosiahnutím konfluencie bolo médium nahradené médiom bez FCS a potom nasledovala inkubácia

počas ďalších 16 - 20 hodín v CO₂ inkubátore. Lýza a imunoprecipitácia, v príslušnom poradí, boli urobené technikami opísanými vyššie. Sepharosová peleta bola inkubovaná v celkovo 4,5 ml SDS testovacieho pufru s 2 % DL-ditiotreitolom /Sigma / počas 5 minút pri 95 °C na oddelenie naviazaných proteínov a potom bola vyšetrovaná v analytickom SDS polyakrylamidovom géli.

Na ďalšie prečistenie autoantigénu bola imunozrazenina separovaná pomocou vylučovacej elektroforézy nasledujúcim spôsobom, pri použití Prep Cell /Model 491 BIO-RAD /: 4,5 ml proteínovej zmesi bolo umiestnené na vrchol okrúhleho gélu /vonkajší priemer : 3 cm/ ktorý sa skladal z 6,5 cm separačného gélu / 8 % polyakrylamid, pH 8,8 / a 1,5 cm odberového gélu /4 % polyakrylamid, pH 6,8 / a bola urobená separácia pomocou elektroforézy. Jednotlivé proteíny boli odoberané vo vymývacom pufré /25 mM Tris-HCl, 0,1 M glycín, 0,01 % SDS, pH 8,3 / ako frakcia po 1,2 ml /0,8 ml/min/. Eluované frakcie boli vyšetrované v SDS-PAGE a frakcie obsahujúce požadovaný proteín boli kombinované a koncentrovali sa na celkový objem približne 1 ml pomocou ultrafiltrácie /Amicon Centriprep-50, pri 1000 x g /.

1.4. Trávenie autoantigénu proteázou

Z niekoľkých testovaných proteáz bola určená endoproteináza Asp-N /sekvenčnej čistoty, Boehringer Mannheim / ako vhodná proteáza pre fragmentáciu, pretože umožňuje významným spôsobom reprodukovateľný charakter štiepenia s relatívne dobre separovateľnými fragmentami. Koncentrácia enzým/substrát bola upravená na 1 : 100 a trávenie bolo urobené počas 30 minút pri 37 °C.

1.5. Prenos na PDVF membránu

Po trávení prečisteného antigénu boli peptidové fragmenty separované na preparatívnom 10% Tricine géli /Schagger, H. et al., Anal. Biochem. 1987, 166: 368 - 379/, /obr. 2/ a boli prenesené pri 4⁰C na PVDF membránu /polyvinylidendifluorid, ImmobilonTM, Millipore/ semi-suchou "fastbolt" technikou pri použití elektródových platní obsahujúcich grafit /Fastblot B32/33, Biometra/. Na anódovú dosku boli umiestnené nasledujúce vrstvy: 1/ filtračný papier namočený v anódovom pufri 1 /300 mM Tris-HCl, 20% metanol, pH 10,4/, 2/ filtračný papier namočený v anódovom pufri 2 / 30 mM tris-HCl, 20 % metanol, pH 10,4/, 3/ PVDF membrána aktivovaná v metanole a uvedená do rovnováhy v anódovom pufri 2, 4 / Tricine gél, 5/ dva filtračné papiere namočené v katódovom pufri /25 mM Tris-HCl, 40 mM kyselina -amino-n-ka-prónová, 20 % metanol, pH 9,4/, 6/ katódová doska. Prenos bol urobený počas 35 minút pri 180 mA.

Potom bola PVDF membrána farbená v 0,1 % Coomassie Blue Serva R-250, 50 % metanolu počas 5 minút, bola odfarbená 50 % metanolom, 10% kyselinou octovou, bola dôkladne premytá destilovanou vodou a bola sušená vzduchom. Charakteristické prúžiky tráveného autoantigénu o 10 kDa, 16 kDa a 25 kDa boli starostlivo vystrihnuté a bolo urobené prvé sekvencovanie na N konci.

1.6. Edmanova degradácia

/Podľa Edman a Henschen: Needleman, S.B., Protein Sequence Determination, Springer Verlag, Berlín, 1975, 232 - 279/.

Sekvencovanie za použitia Applied Biosystems 4778-Seqenator viedlo k zisku troch aminokyselinových sekvencií, ktoré boli porovnávané so Swiss Prot 31 databázou /pomocou PC/GENES, IntelliGenetics/. Z tohto porovnávania mohlo byť s minimálnym nesúladoň urobené priradenie troch fragmentov k ľudskej tkanivovej transglutamináze /tTG, EC 2.3.2.13, proteín glutamín γ -glutamyltransferáza/. Dôkazy sú uvedené pomocou "jednopísmenného kódu"; X znamená neidentifikované:

t- Transglutamináza: 28 - REKLVVRRGQPF
10 kDa fragment : REKLVVRRGQPF /S/

t-Transglutamináza: 581 - DLYLENPEIKIRILG
14 kDa fragment : DLYLENPEIXIXILG

t-Transglutamináza: 438 -DITHTYKYPE
16 kDa fragment : DITLTYQYP /V/

Žiadna nejednoznačná sekvencia nemohla byť priradená k 25 kDa fragmentu, pretože tento fragment bol peptidovou zmesou.

Príklad 2- Potvrdenie tkanivovej transglutaminázy /tTG/
ako autoantigénu pri sprue

2.1. Imunoprecipitácia morčacej tTG

Pretože je komerčne dostupná a má homológiu sekvencie /> 80%/ s ľudskou tTG, bola tTG z pečene morčiat /Sigma/ najskôr separovaná gélovou elektrofoézou, na overenie jej čistoty. Okrem ďalších niekoľko iných proteínov predstavuje tTG, približne s 50%, jeden z hlavných prúžikov.

Hoci sa ľudská tTG majúca 687 aminokyselín líši od morčacieho proteínu majúceho 690 aminokyselín len mierne,

vykazujú tieto dva proteíny značne odlišné migračné charakteristiky v SDS polyakrylamidovom géli. Pokiaľ proteín zvieracieho pôvodu sa objaví v 75 - 80 kDa, ako sa očakáva, ľudský proteín má významne pomalšiu migráciu zodpovedajúcu molekulovej hmotnosti 85 kDa, ako je opísané v literatúre /Gentile, V. et al., J.Biol.Chem. 1991, 266: 487 - 483/, aj napriek zjavne chýbajúcej N-glykosylácii.

Reaktivita ľudskej autoprotílátky zo séra pacientov so sprue z morčacej tTG bola testovaná v imunoprecipitačnom teste. V tomto teste sa 4 µg tTG /Sigma/ v 500 µl lyzačného pufri a 0,5 % hovädzí sérový albumín mixovali pri 4⁰C cez noc s IgA od pacientov so sprue naviazaným na 4B Separózu, premyli sa, uviedli sa do varu v SDS testovacím pufri za redukčných podmienok a separovali sa na 10 % polyakrylamidovom géli /cf., 4.1.2./ Tu sa vyskytovalo špecifické vyzrážanie očakávaného prúžika /m.h. 80 kDa/, ale žiadne vyzrážanie kontaminujúcich zložiek.

2.2. Potvrdenie tTG ako autoantigénu vo Wester blot teste

Po separácii 2 µg morčacej tTG na SDS géli a po prenose do nitrocelulózy bola škvrna blokovaná v PVS, 2 % nízkotučnom odstredenom mliečnom prášku, 0,3 % Tween 20, pH 7,3, pri 4⁰C cez noc. Potom nasledovala 1 hodinová inkubácia so sérom od pacientov so sprue /1/200/ v rovnakom pufri, tri kroky premytia a jedn hodinová inkubácia s králičími protílátkami proti ľudskému IgA s naviazanou alkalickou fosfatázou / 1/500 /. Škvrnny boli premyté v PBS a vyvíjali sa Nitro Blue Tetrazolium a 5-bróm-4-chlór-3-indolyfosfátu ako substrátu

/Blake, M.S- et al., Anal. Biochem. 1984, 136: 175 - 179/.

75 - 80 kDa prúžik dával jednoznačne pozitívny signál so sérom od pacientov so sprue, čo je ďalším dôkazom, že sérum pacientov so sprue obsahuje protilátky triedy IgA proti tTG, pokiaľ kontrolne séra nedávali žiaden signál.

2.3. Potvrdenie tTG ako endomyziálneho autoantigénu pomocou nepriamej fluorescencie

Tkanivové rezy z pažeráka od primátov /Euroimmun, Germany/ boli použité v nepriamej detekcii IgA protilátok proti endomýziu v sére od pacientov so sprue a pri preukázaní ich inhibície tTG. Po pre-inkubácii 10 μ l séra od pacientov riedeného 1/320 v PBS s 0,5 alebo 10 μ g tTG od morčiat /Sigma/ a 10 μ g BSA /Sigma/ počas 1 hodiny pri teplote miestnosti bola ich inkubácia s uvedenými rezmi hrtana urobená počas 1 hodiny pri teplote miestnosti v zvlhčenej atmosfére. Sérum od pacientov so sprue / 1/320 / a sérum od zdravých jedincov / 1/50 / bolo použité ako pozitívna a negatívna kontrola, v príslušnom poradí. Po trojitom premytí rezov v PBS/0,2 % BSA a sušenie vzduchom bola urobená detekcia autoantigénu TRITC-značenou králičou protilátkou proti ľudskému IgA /Dianova/, ktorá bola riedená 1/50 v PBS, počas 1 hodiny pri teplote miestnosti. Nadbytok protilátky bol odstránený postupným premytím PBS/0,2 % BSA, PBS a destilovanou vodou.

Sérum od pacientov vykazovalo jasné farbenie ECM protilátkami triedy IgA, kde toto farbenie bolo inhibované pridaním stúpajúcich koncentrácií tTG, ale nie pre-inkubáciou s BSA. Kontroly využívajúce séra od zdravých jedincov nevykazovali akékoľvek farbenie rezov pažeráka.

Príklad 3 - Vývoj ELISA špecifického pre sprue s IgA
protiľátkami pre diagnostiku a sledovanie
sprue

1 µg morčacej transglutaminázy /Sigma T-5398/ a 100 µl PBS bolo pipetou vnesené do každej jamky polystyrénových mikroplatin /Greiner Labortechnik, 96 jamiek/ a bola urobená inkubácia počas 2 hodín pri 37 °C za mierneho rotačného pohybu. Nenaviazaná tTG bola odstránená premytím v PBS / 3 x 200 µl / a voľné väzobné miesta v jamkách boli blokované 1% hovädzím sérovým albumínom /Sigma / v 250 µl PBS pri 4 °C cez noc. Po premytí PBS /0,1 % Tween 20 / 3 x 200 µl / boli jamky inkubované s postupnými riedeniami séra v PBS / 0,1 % Tween 20 / 100 µl / počas hodiny pri teplote miestnosti za mierneho rotačného pohybu, boli premyté PBS /0,1 % Tween 20 / 3 x 200 µl / a potom bola urobená inkubácia králičou protiľátkou proti ľudskému IgA konjugovanou s peroxidázou /Dianova / 1/400 v 100 µl PBS/Tween 20/ počas 1 hodiny pri teplote miestnosti. Po premytí PBS / 3-krát/ bola urobená minútová inkubácia pri teplote miestnosti v tme, pomocou 200 µl 0,1 M citrátového pufru, 17,6 mM H₂O₂, 5,5 mM o-fenyléndiamínhydrochloridu /Sigma/, pH 4,2 a následná detekcia vytvoreného zafarbenia v ELISA čítači / MRX, Dynatech, Laboratories / pri 450 nm.

20 sér od pacientov so sprue bolo testované pred a po liečbe bezlepkovou diétou, t.j. v aktívnej a neaktívnej fáze ochorenia. Bolo zistené, že test je vysoko senzitívny, s dobrou koreláciou s hodnotami aktívnej fáze sprue. Terapeutický úspech ako výsledok dodržiavania diéty sa odrazil v znížení IgA protiľátok proti tTG. Vysoká senzitivita bola jasná pri nízkej extincii / základnej hladiny/ kontrolných sér od zdravých jedincov, od pacientov s

colitis ulcerosa, pečňovou cirhózou, rôznymi nádormi, Sjorgenovým syndrómom atď. /obr. 3/.

3.2. Vývoj ELISA využívajúceho protilátky iných tried na diagnostiku a sledovanie sprue, napríklad protilátkami IgG

Pretože asi 2 % pacientov so sprue má deficit IgA, boli séra testované na senzitivitu a špecificitu IgG protilátok proti tTG. ELISA test bol urobený rovnakým spôsobom ako v 3.1., len protilátka proti ľudskému IgA s naviazanou peroxidázou /Dianova/ bola nahradená protilátkou proti ľudskému IgG /Dianova /. S prihliadnutím na ich senzitivitu zodpovedali hodnoty od pacientov so sprue pred a po bezlepkovej diéte hodnotám získaným pri použití IgA protilátok.

Niektoré z kontrolných sér vykazovali mierne zvýšené hodnoty, čo zodpovedá zisteniam získaným skôr, že špecificita protilátok proti endomýziu je redukovaná v nepriamej imunofluorescencii triedy IgG /obr. 4 /.

3.3. Vývoj ELISA testu pre diagnostiku a sledovanie iných ochorení spojených s imunitnou reakciou proti tTG, napríklad protilátkami triedy IgG

ELISA test bol urobený rovnakým spôsobom ako v 3.2.

Séra od pacientov s chronickými zápalovými alebo autoimunitnými ochoreniami /Colitis ulcerosa /C.U./, Crohnova choroba, akútna autoimunitná hepatitída / vykazovala mierne až stredne zvýšené hodnoty.

Tak je pomocou IgG špecifického ELISA testu na autoprotiľátky proti tTG možná diagnostika a kontrola terapie u pacientov trpiacich chorobami spojenými s imunitnou reakciou proti tTG.

Príklad 4 - Nová funkcia tkanivovej transglutaminázy /tTG/ v skríženej väzbe gliadínu

Hoci je pre reakcie katalyzovanej tTG dostupné široké spektrum akceptorov acylovej skupiny, len niekoľko molekúl môže pôsobiť ako donor acylovej skupiny. V in vitro pokuse môže byť stanovená tTG sprostredkovaná inkorporácia rádioaktívne označeného putresceínu do gliadínu a tak funkcia gliadínu ako donorového substrátu tTG. V 160 μ l pufri /0,1 M Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5mM CaCl₂ pH 7,5 / boli 1 μ g substrátu /gliadínu alebo kontrolných proteínov ako je albumín, / 2 μ Ci /³H/-putresceínu a 1 μ g tTG / z morčiat, Sigma/ inkubované počas 2 hodín pri 37. °C. Reakcia bola ukončená pridaním 100 μ l 50% kyseliny trichlórovej /TCA/ a proteíny boli zrážané pri 4 °C cez noc. Po centrifugácii boli pelety premyté 10 % TCA, boli rozpustené v SDS testovacom pufre a buď boli separované v SDS-PAGE, alebo boli použité pri scintilačnom odčítaní. Pokiaľ žiadna inkorporácia putresceínu nemohla byť určená pri kontrolách, vykazoval gliadín jasnú inkorporáciu /³H/-putresceínu ako pri scintilačnom odčítaní, tak v SDS-PAE, čo je dôkazom, že gliadín je výborným substrátom pre tTG.

Skratky:

Ab : protilátka

APAAP: alkalická fosfatáza anti-alkalická fosfatáza

BSA: hovädzí sérový albumín

cm: centimeter

DMEM: Dulbeccovo modifikované Eagle médium

EC: enzýmové spracovanie

ELISA: enzýmovo viazaný imunosorbentný test

ECM: extracelulárny matrix

FCS: fetálne telacie sérum

h: hodina

H₂O₂: peroxid vodíka

HLA: ľudské lymfocytárne antigény

IEL: intraepitelové lymfocyty

Ig: imunoglobulín

kDa: kilodalton

M: mol

mA: miliampér

MHC: hlavný histokompatibilný komplex

min: minúta

mM: milimól

M_R: relatívna molekulová hmotnosť

ug: mikrogram

ul: mikroliter

PAGE: polyakrylamidová élová elektrofosforéza

PBS: fosfátový pufer

PLA₂: fosfolipáza A₂

PVDF: polyvinylidendifluorid

SDS: dodecyl síran sodný

TCA: kyselina trichlóroctová

TGF: transformujúci rastový faktor

Tris: Tris/hydroxymetyl/amínometán

tTG: tkanivová transglutamináza

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Spôsob pre imunologickú identifikáciu celiakie, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že anti-tTG protilátky v telesných kvapalinách sú detekované imunoreakciou s tkanivovou transglutaminázou /tTG/, so zlúčeninami obsahujúcimi tTG, s jej antigénnymi štruktúrami, jej imunoreaktívnymi sekvenciami alebo analógami.

2. Spôsob podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sú detekované ľudské IgA alebo IgG protilátky.

3. Spôsob podľa nároku 1 alebo 2 v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že tTG alebo zlúčeniny obsahujúce tTG sú ľudského, zvieracieho, syntetického alebo rekombinantného pôvodu.

4. Spôsob podľa akéhokoľvek z nárokov 1 až 3 v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že detekcia je urobená pomocou známeho imunotestu, výhodne s priamym alebo nepriamym naviazaním jedného reaktantu na dobre detekovateľnú značiacu substanciu.

5. Spôsob podľa nároku 4, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že detekcia je urobená na pevnej fáze.

6. Spôsob podľa nároku 4, v y z n a č u j ú c i s a

t ý m, že detekcia je urobená pomocou ELISA, RIA alebo imuno-
fluorescenčného testu.

7. Použitie tTG, zlúčenín obsahujúcich tTG, ich antigénnych štruktúr, ich imunoreaktívnych sekvencií alebo analógov v diagnostike a kontrole terapie autoimunitných ochorení.

8. Použitie podľa nároku 8 pre diagnostiku a kontrolu terapie celiakie.

9. Orálny farmaceutický prostriedok obsahujúci tTG, zlúčeniny obsahujúce tTG, jej anigénne štruktúry, jej imunoreaktívne sekvencie alebo analógy a voliteľne farmaceuticky prijateľné pomocné činidlo na liečbu celiakie.

10. Použitie zlúčenín obsahujúcich tTG, ich antigénnych štruktúr, ich imunoreaktívnych sekvencií alebo analógov na výrobu orálnych farmaceutických prostriedkov na liečbu celiakie.