

Reumatoid artritiszben szenvedő betegek széruma által fel-
ismert, citrullint tartalmazó szintetikus peptidek diag-
nosztikai és terápiás alkalmazásai

Kivonat

A találmány tárgyát citrullint tartalmazó peptidek képezik, melyek reumatoid artritiszben szenvedő betegek szérumában jelen lévő ellenanyagok immunogén determinánsait alkotják, és amelyekben az ellenanyagokkal történő kölcsönhatás létrejöttének előfeltétele legalább egy citrullin jelenléte.

A találmány tárgyát képezi a találmány szerinti peptidek előállítására szolgáló eljárás is. Ugyancsak a találmány tárgyát képezik a találmány szerinti peptidek citrullin aminosavaival specifikusan reagáló ellenanyagok; a találmány szerinti ellenanyagokkal történő immunizálással előállított anti-idiotípus ellenanyagok; valamint sejtfelismerő molekulaként a találmány szerinti peptideket vagy ellenanyagokat tartalmazó immunotoxin-molekulák.

A találmány tárgyát képezi továbbá a találmány szerinti molekulák alkalmazása reumatoid artritisz kezelésére vagy diagnózisára alkalmas gyógyászati készítmény vagy diagnosztikum előállítására.



Jelölés a ha a cu

2000. 11. 22.

Képviselő:

Danubia

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

B u d a p e s t

A

**Reumatoid artritiszben szenvedő betegek széruma
által felismert, citrullint tartalmazó szintetikus
peptidek diagnosztikai és terápiás alkalmazásai**

A találmány tárgyát citrullint tartalmazó peptidek képezik, melyek reumatoid artritiszben szenvedő betegek szérumában jelen lévő ellenanyagok immunogén determinánsait alkotják, és amelyekben az ellenanyagokkal történő kölcsönhatás létrejöttének előfeltétele legalább egy citrullin jelenléte.

A találmány tárgyát képezi a találmány szerinti peptidek előállítására szolgáló eljárás is. Ugyancsak a találmány tárgyát képezik a találmány szerinti peptidek citrullin aminosavaival specifikusan reagáló ellenanyagok; a találmány szerinti ellenanyagokkal történő immunizálással előállított anti-idiotípus ellenanyagok; valamint sejtfel-

ismerő molekulaként a találmány szerinti peptideket vagy ellenanyagokat tartalmazó immunotoxin-molekulák.

A találmány tárgyát képezi továbbá a találmány szerinti molekulák alkalmazása reumatoid artritisz kezelésére vagy diagnózisára alkalmas gyógyászati készítmény vagy diagnosztikum előállítására.

A reumatoid artritisz (RA) nagy jelentőségű, mozgáskorlátozottságot okozó ízületi betegség, amely szisztémás természetű, és ismeretlen etiológiájú. A betegség a populáció 1%-át érinti, a férfiak és nők érintettségének aránya 2:3. A morbiditást tekintve, az RA legfőbb jellemzője az ízületek eróziója, amely fájdalmat vált ki, deformitáshoz, és egyes esetekben súlyos rokkantsághoz vezet. A betegség súlyos formáiban a beteg életkilátásai akár 10 évvel is csökkennek. Az RA az autoimmun betegségek jellemzőit mutatja, azaz, a betegek szérumában különböző auto-ellenanyagok („autoantitestek”) vannak jelen, és állati modellekben patogén T-sejtek átvitelével betegség váltható ki. A betegség besorolását megnehezítheti, hogy annak határeset formái igen gyakoriak, továbbá, az ízületek gyulladása nem csak RA-ban fordul elő, hanem nem-autoimmun betegségekben, például oszteoartritiszben, reaktív artritiszben és köszvényben is.

Mivel a betegség korai diagnózisa adekvált korai kezelést tesz lehetővé, ami nagymértékben javíthatja az RA-betegek életminőségét, a reumatológus számára igen fontos, hogy megbízható diagnosztikai kritériumok álljanak rendelkezésre. Az RA diagnózisa kezdetben az általa kiváltott

klinikai tüneteken alapul. Az ilyen diagnózis szerológiai megerősítésének lehetősége nem kielégítően megalapozott, és főként reumatoid faktorok jelenlétének kimutatásán alapul. A Waaler-Rose-reakció vagy latexfixációs RF-teszt pozitívítása előrejelző értékű, és súlyosabb kimenetelű betegségre utal. Az RA-betegek jelentős része azonban RF-szeronegatív, másrészt, RF jelen lehet más reumás betegségek, például Sjögren-szindróma és szisztémás *lupus erythematosus*, továbbá néhány krónikus bakteriális és akut vírusos fertőzés, bizonyos parazitás megbetegedések, valamint krónikus gyulladásos betegségek esetében is, és azt kimutatták egészséges személyekből származó kontrollszérumokban is [Waller és munkatársai: (1964), Chen és munkatársai: (1987)]. Az RF viszonylag alacsony specifitása további vizsgálatokat tesz szükségessé egy második RA-specifikus ellenanyag kimutatására. A korábbiakban definiált antinukleáris ellenanyagok - például SSA, RA33 és RNP - előfordulása RA-ban alacsony szintű, és azok klinikai alkalmazhatósága RA diagnózisára egyelőre korlátozott [Hassfeld és munkatársai: (1993)]. Ezzel szemben, mind az anti-perinukleárisfaktor (APF), mind az antikeratin ellenanyagok (AKA) kimutatása használhatónak bizonyult ebben a vonatkozásban. Az APF-ek RA-betegek szérumában kimutatható IgG-ellenanyagok, amelyek tipikus immunfluoreszcens festődési mintázatot eredményeznek humán szájnyálkahártya-sejteken [Nienhuis és Mandema: (1964)]. Több tanulmány foglalkozik ezeknek a teszteknek diagnosztikai alkalmazhatóságával [Westgeest és munkatársai: (1987); Janssens és munkatársai: (1988); Vivino és Maul: (1989);

Youinou és munkatársai: (1992); Feltkamp és munkatársai: (1993)]. Az APF-ellenanyagok RA vonatkozásában kimutatott magas, 80-90%-os specifitása és jó, 50-99%-os szenzitivitása azt megfelelő diagnosztikai eszközzé teszi. Értéke különösen nyilvánvaló az RA-betegek mintegy harmadát kitevő csoportnál, ahol RF-aktivitás nem mutatható ki [Westgeest és munkatársai: (1987); Nesher és munkatársai: (1992)]. Az RA-betegek szérumában található második specifikus ellenanyag az AKA-autoantitest, amelyet először Young és munkatársai írtak le (1979), és amely fluoreszcens festődési mintázatot eredményez patkány nyelőcső epithelium elszarusodott rétegén. Annak ellenére, hogy azok célpontjait nem sikerült biokémiaailag jellemezni, az ellenanyagokat anti-keratin ellenanyagoknak tartják azon a vitatható alapon, hogy a stratum corneumot főként citokeratinok alkotják. Az ellenanyagok jelen vannak az RA-szérumok 36-59%-ában, és azok nagymértékben specifikusak RA-ra [Johnson és munkatársai: (1981); Miossec és munkatársai: (1982); Hajiroussou és munkatársai: (1985); Vincent és munkatársai: (1989)]. Az APF-hez hasonlóan, azok elsősorban IgG-osztályba tartoznak [Johnson és munkatársai: (1981), Kataaha és munkatársai: (1985); Vincent és munkatársai: (1990)], és mindkettő kimutatható RA-betegek szinoviális folyadékában [Youinou és munkatársai: (1985); Kirstein és munkatársai: (1989); Vivino és Maul: (1990)].

Nem régiben, a fillagrin elnevezésű humán epidermális proteint meggyőző bizonyítékok alapján az AKA- és APF-autoantitestekkel reagáló egyik fő célpontként azonosították

[Simon és munkatársai: (1993); Sebbag és munkatársai: (1995)]. Az ide vonatkozó első tanulmányban, a humán fillagrin neutrális/savas formájáról kimutatták, hogy 48 RA-szérumból álló mintacsoport 75%-ával reagál Western-blot-vizsgálatban [Simon és munkatársai: (1993)]. Újabb adatok szerint, 492 szérumminta - amely 279 RA-szérumot tartalmazott - vizsgálata azt mutatta, hogy több mint 50%-os diagnosztikus szenzitivitás érhető el anti-fillagrin-ellenanyagok kimutatásával, ennek megfelelő 95%-os specifitással.

A profillagrin - a fillagrin prekursora - egy hisztidinben gazdag oldhatatlan protein, amelynek molekulatömege +400 kDa. A protein 10-12, egyenként 324 aminosavból álló fillagrin ismétlődő egységet tartalmaz, amelyeket heptamer összekapcsoló („linker”) szekvenciák választanak el. A nagymértékben foszforilezett poliprotein az epidermisz granuláris rétegének keratohialin-szemcséiben tárolódik. Ezen sejtek végső differenciálódása során a profillagrin defoszforileződik, és proteolitikus úton feldolgozódik oly módon, hogy a linker kihasítódik, és funkcionális, 37 kDa méretű fillagrinmolekulák képződnek [Resing és munkatársai: (1989) (1993); Gan és munkatársai: (1990)]. Az elszarusodás korai stádiumában lévő sejtekben, ezek az egységek szerepet játszanak a keratin köztitermékét alkotó filamentumok aggregációjában, oly módon, hogy elősegítik az intermolekuláris diszulfidhidak kialakulását, és az elszarusodott sejtek intracelluláris fibrózus mátrixának képződését eredményezik [Dale és munkatársai: (1978); Lynley és Dale (1983); Harding és Scott (1983); Mack és munkatársai: (1993)]. A

filamentumok aggregációját követően, a peptidilarginin dezimináz enzim bázikus arginin aminosavakat citrullinná alakít, miáltal citokeratinok iránt alacsonyabb affinitást mutató molekula jön létre [Harding és Scott: (1983)]. Végül, a fillagrin proteolitikus hatás révén teljes egészében szabad aminosavakra, urokánsavra és karboxil-pirrolidonsavra bomlik, amely szerepet játszik az optimális nedves-ségtartalom megőrzésében és az UV-sugárzás elnyelésében [Scott és munkatársai: (1982)].

A tandem elrendezésű fillagrin egységek igen polimorfok: jelentős variabilitás mutatható ki egyes egyének közt a molekula aminosav-szekvenciájában, és egy adott egyén különböző fillagrinmolekulái közt is, ahol 15%-ot is elérő különbségeket figyeltek meg [McKinley-Grant és munkatársai: (1989); Gan és munkatársai: (1990); Markova és munkatársai: (1993)]. A legtöbb variáció egyetlen bázispárváltozásra vezethető vissza, de számos módosulás egyúttal a töltés megváltozásával is jár. A humán profillagrin génrendszer méretét tekintve is polimorf, mivel az egyes egyének közt allélikus különbségek figyelhetők meg az ismétlődő egységek számát tekintve (10, 11 vagy 12), ezáltal egy egyénben akár 24 különböző fillagrinmolekula is előfordulhat [Mc Kinley-Grant és munkatársai: (1989), Presland és munkatársai: (1992)]. Az aminosavvariációk és a defoszforileződés együttesen felelősek a kétdimenziós géleken megfigyelhető heterogenitásért; a molekulák savasodásának további oka az arginin módosulása citrullinná.

Mivel a humán szövetekből izolált természetes fillagrin alkalmazása az egyes tételek közti variabilitás, a munkaigényes preparatív izolálás és a tisztításra rendelkezésre álló kiindulási anyag korlátozottsága miatt gyakorlati szempontból nem előnyös, szintetikus peptideket és egy rekombináns proteint teszteltünk azzal a céllal, hogy RA kimutatására alkalmas diagnosztikai tesztreagenskészlet fejlesszünk ki. Rekombináns fillagrint az eukariota COS-sejtszrendszerben expresszáltattunk. Ez a megközelítési mód azonban nem tűnt előnyösnek, mivel a négy klónozott protein egyike sem reagált AFP-pozitív betegekből származó szérumokkal.

A találmány szerinti megoldás kidolgozása során célul tűztük ki olyan peptidek kifejlesztését, amelyek magas fokú reaktivitást mutatnak reumatoid artritiszben szenvedő betegekből származó szérumokban található ellenanyagokkal.

Célul tűztük ki továbbá a peptidek előállítására alkalmas eljárások kidolgozását.

Ezen felül, célul tűztük ki eljárások kidolgozását a peptidekkel specifikus módon reagáló ellenanyagok előállítására.

A találmány szerinti megoldás kidolgozása során célul tűztük ki továbbá eljárások kidolgozását az ellenanyagokkal specifikus módon reagáló, ezáltal a peptideket utánzó anti-idiotípus ellenanyagok előállítására.

A már említetteken felül, célul tűztük ki a peptideket tartalmazó gyógyászati készítmény kifejlesztését terápiás vagy diagnosztikai célra.

A találmány szerinti megoldás kidolgozása során célul tűztük ki továbbá reumatoid artritisz kimutatására alkalmas diagnosztikai reagenskészlet kifejlesztését.

Célul tűztük ki továbbá új fillagrin allélok és azoknak megfelelő aminosav-szekvenciák azonosítását.

Ezen felül, a találmány szerinti megoldás kidolgozása során célul tűztük ki biológiai próba kifejlesztését autoantigén és reumatoid artritiszre specifikus autoantitest közti kölcsönhatást módosító hatóanyagok azonosítására.

Ezen felül, célul tűztük ki az említett biológiai próbával azonosított, a fenti kölcsönhatást módosító hatóanyagok („modulátor”), valamint modulátort vagy modulátorok kombinációját tartalmazó készítmények előállítását.

Valamennyi fenti célkitűzés megvalósul a találmány alábbiakban ismertetett előnyös megvalósítási módjaiban.

Azonosítottuk a fillagrin immundomináns epitópjait, amelyek mind tartalmazták a citrullin elnevezésű ritka aminosavat. Szintetikus peptideket állítottunk elő, és azok alkalmasnak bizonyultak RA diagnózisára. Amikor reumatoid artritiszes betegekből származó humán szérumokat vizsgáltunk placentaextraktumot tartalmazó kétdimenziós blottokon, további specifikus reakciót adó foltokat találtunk. Az immunreaktivitást mutató foltokat azonosítottuk, és azokat - egyéb nem-azonosított peptideken felül - humán vimentinből, citokeratin-1-proteinből és citokeratin-9-proteinből származó peptidekként azonosítottuk. Ezek a proteinek valamilyen az intermedier rostproteinek családjába tartoznak. Mivel vimentin és citokeratinok citrullintartalmú formáiról

már eddig is ismert volt, hogy *in vivo* előfordulnak [Senshu és munkatársai: (1992); Senshu és munkatársai: (1995); Senshu és munkatársai: (1996)], valószínűsíthető, hogy azok reumatoid artritiszben szenvedő betegek szérumában található autoantitestek specifikus célpontjai.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány tárgyát képezik 50 aminosavnál kevesebb aminosavból álló peptidek, amelyek fillagrinvariáns vagy intermedier rostproteinek fragmentumait tartalmazzák, amelyekben legalább egy arginin citrullinnal van helyettesítve, amelyek képesek ellenanyagokkal reagálni, és amelyekben a citrullin jelenléte kulcsfontosságú a peptid és az ellenanyagok közti reakció létrejöttéhez, és a kölcsönhatásban részt vevő ellenanyagok reumatoid artritiszben szenvedő betegek szérumában találhatók.

A találmány egy további előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány tárgyát képezik vimentin, citokeratin-1 vagy citokeratin-9 bármely variánsából származó, kevesebb, mint 50 aminosavat tartalmazó peptidek, amelyek legalább egy citrullin aminosavat tartalmaznak, ahol a citrullin jelenléte kulcsfontosságú a peptid és reumatoid artritiszben szenvedő betegek szérumában található ellenanyagok közti reakció létrejöttéhez.

A találmány egy további előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány tárgyát képezi peptid és/vagy kémiai struktúra, amely a fenti peptidek valamelyikét tartalmazza összekapcsoló („linker”) molekulával fuzionáltatva. A találmány tárgyát képezik továbbá a fenti peptidek bármely

két tagjából felépülő tandem ismétlődő egységeket tartalmazó és/vagy abból álló peptidek, vagy a fenti peptidek legalább egyikét tartalmazó elágazó peptidek.

A találmány egy közelebbi előnyös megvalósítási módja szerint, ugyancsak a találmány tárgyát képezi eljárás a fenti peptidek bármelyikének klasszikus kémiai szintézissel történő előállítására, amely szerint, legalább egy arginin aminosavat citrullinnal helyettesítünk a kémiai szintézis bizonyos lépéseiben. Ezen felül, a találmány tárgyát képezi eljárás a fenti peptidek bármelyikének előállítására, amely szerint, az elsődleges aminosav-szekvenciát klasszikus kémiai szintézissel hozzuk létre, és az arginin aminosavakat a kémiai szintézist követően, peptidilarginin deziminázzal történő inkubációval derivatizáljuk citrullinná. Szintén a találmány tárgyát képezi eljárás a fenti peptidek bármelyikének előállítására, amely szerint: (i) megfelelő celluláris gazdaszervezetet olyan rekombináns vektorral transzformálunk, amelybe a peptidet kódoló szekvenciát tartalmazó polinukleinsav-szekvencia lett inszertálva a megfelelő szabályozó elemek irányítása alatt, úgy, hogy a peptid vagy a peptidet tartalmazó protein expresszálódjék és/vagy szekretálódjék; (ii) a transzformált celluláris gazdaszervezetet a protein vagy peptid expresszálódását és a peptidben jelen lévő argininek citrullinná történő részleges vagy optimális derivatizálódását lehetővé tevő körülmények mellett tenyésztjük; és (iii) a peptidet kinyerjük. A találmány tárgyát képezi továbbá eljárás a fenti peptidek bármelyikének előállítására, amely szerint: (i) megfelelő celluláris gaz-

daszervezetet olyan rekombináns vektorral transzformálunk, amelybe a peptidet kódoló szekvenciát tartalmazó polinukleinsav-szekvencia lett inszertálva a megfelelő szabályozó elemek irányítása alatt, úgy, hogy a peptid vagy a peptidet tartalmazó protein expresszáldójék és/vagy szekretáldójék; (ii) a transzformált celluláris gazdaszervezetet a protein vagy peptid expresszáldását lehetővé tevő körülmények mellett tenyésztjük; (iii) a proteint vagy peptidet kinyerjük; és (iv) a protein vagy peptid arginin aminosavat citrullinná derivatizáljuk. A találmány egy további előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány tárgyát képezi a fenti eljárások bármelyike, ahol a gazdaszervezet bakteriális gazdaszervezet vagy élesztő, vagy bármely egyéb eukariota sejt, amely előnyösen rekombináns baculovírussal lett transzformálva.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, ugyancsak a találmány tárgyát képezi a peptidekkel vagy citrullint tartalmazó intermedier rostproteinekkal specifikus módon reagáló ellenanyag, amely előnyösen monoklonális ellenanyag. Az említetteken felül, a találmány tárgyát képezi anti-idiotípus ellenanyag, amely a fenti ellenanyagok bármelyikével történő immunizációval lett előállítva, és amely anti-idiotípus ellenanyag specifikus módon reagál az ellenanyaggal, ezáltal utánozza az ellenanyaggal specifikus módon reagáló peptideket; az említett ellenanyag előnyösen monoklonális ellenanyag.

A találmány egy további előnyös megvalósítási módja szerint, szintén a találmány tárgyát képezi immunotoxin-

molekula, amely sejtfelismerő molekulaként a fenti peptidet vagy ellenanyagot tartalmaz toxinmolekulával vagy annak aktív fragmentumával kovalens módon kapcsoltnak, vagy az említettek közül áll.

A találmány egy további előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány tárgyát képezi a fenti peptidek, ellenanyagok, immunotoxin-molekulák, intermedier rostproteinek vagy azokat tartalmazó készítmények bármelyikének alkalmazása gyógyszerként. A fentieket alkalmazhatjuk gyógyszerként reumatoid artritisz kezelésére, vagy diagnosztikumként reumatoid artritisz diagnosztizálására. A találmány tárgyát képezi továbbá kezelési eljárás betegségek kezelésére, amely szerint, szisztémás hiporeszponzivitást váltunk ki az autoantigénnel szemben a fenti peptidek, ellenanyagok, immunotoxin-molekulák, intermedier rostproteinek vagy azokat tartalmazó készítmények bármelyikének orális (szájon át történő) beadásával, ezáltal megakadályozzuk a saját ellenanyag ellen irányuló ellenanyagok kóros termelődését. Szintén a találmány tárgyát képezi diagnosztikai reagenskészlet reumatoid artritisz kimutatására, amely a fenti peptidek, proteinek vagy ellenanyagok legalább egyikét tartalmaz, adott esetben szilárd hordozóhoz kapcsoltnak. Előnyösebben, a reagenskészlet a peptidek vagy ellenanyagok sorát tartalmazza, adott esetben autoimmun betegségekre jellemző egyéb epitópokkal kombinálva, ahol a peptidek, proteinek és/vagy ellenanyagok szilárd hordozó meghatározott helyéhez vannak hozzákapcsolva. Még előnyösebben, a szilárd hordozó membráncsík, és a polipeptidek párhuzamos

sávok formájában vannak ahhoz hozzákapcsolva. Nyilvánvaló, hogy bizonyos peptidek, proteinek vagy ellenanyagok nincsenek a szilárd hordozóhoz kapcsolva, hanem a kötőoldatban vannak jelen, és azok kompetítorként és/vagy reumatoid artritisztől eltérő autoimmun betegségben szenvedő betegek szérumában jelen lévő egyéb autoantitestek blokkolására szolgálnak, ezáltal csökkentik vagy kiküszöbölik az esetleges keresztreakciók és/vagy aspecifikus kötődés lehetőségét.

Epitóptérképezéssel azonosítottuk a reumatoid artritiszben szenvedő betegekben előforduló fillagrin immun-domináns eptiópjait (lásd 1. példa). Ezeket az epitópokat tovább jellemeztük arginin aminosavak derivatizálódásából származó citrullin aminosavak jelenlétére. A citrullin aminosavak jelenléte előfeltétele annak, hogy az epitópokat reumatoid artritiszben szenvedő betegek szérumában található ellenanyagok felismerjék. A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány tárgyát képezik természetes fillagrin variánsok ilyen peptidfragmentumai, amelyek reumatoid artritiszben szenvedő betegek szérumában jellemzően előforduló ellenanyagokkal reagálnak, és amelyeket poszt-transztlációs módosulás, közelebbről, argininek citrullinná történő derivatizálódása jellemez. Legalább egy citrullin jelenléte az előfeltétele annak, hogy a peptidfragmentumokat reumatoid artritiszben szenvedő betegek szérumában található ellenanyagok felismerjék.

Olyan szintetikus peptideket állítottunk elő, amelyekben arginin aminosavakat citrullinnal helyettesítettünk,

ezáltal természetes fillagrin variánsok epitópjait utánoztuk. Ezek a peptidek alkalmazhatónak bizonyultak reumatoid artritisz diagnosztizálására. A találmány egy további előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány tárgyát képezik reumatoid artritiszben szenvedő betegek immunrendszere által felismert saját proteinek immunogén determinánsait immunológiailag utánzó peptidek. Előre látható tehát, hogy egyetlen citrullin jelenléte elegendő lehet ahhoz, hogy az epitópokat reumatoid artritiszben szenvedő betegek szérumban található egyes ellenanyagok specifikus módon felismerjék.

A leírás szerinti értelemben „peptidnek” aminosavak polimerjét nevezzük, anélkül, hogy a termék méretét közelebbről meghatároznánk; a „peptid” meghatározás tehát egyaránt vonatkozik oligopeptidekre, polipeptidekre és proteinekre. A meghatározás a peptid poszt-expressziós módosításainak lehetőségét, például glikozilezést, acetilezést, foszforilezést és hasonlókat sem zárja ki. A meghatározás vonatkozik például egy vagy több aminosavanalógot (például természetben elő nem forduló aminosavakat, PNA-t, stb.) tartalmazó peptidekre; szubsztituált kötéseket tartalmazó polipeptidekre, valamint a technika állása szerint ismert egyéb, természetben előforduló vagy ott elő nem forduló módosításokat tartalmazó peptidekre.

Az „50 aminosavnál kevesebb aminosavat tartalmazó peptid” kifejezést tág értelemben használjuk a teljes immunreaktív protein lényegében csonkított, nagymértékben reaktív, citrullin aminosavak jelenlétével jellemzett domént



még tartalmazó változatának körülírására. Ezek a peptidek előnyösen 40, 30, 25, 20 vagy kevesebb aminosavból állnak.

„Immunogén determináns” azokat, az elsődleges aminosav-szekvenciát és az aminosavak másodlagos módosulásait magában foglaló, meghatározott három-dimenziós struktúrában elrendeződött kémiai csoportosulásokat értünk, amelyek együttesen meghatározzák a teljes antigén specifikus reaktivitását valamely, a peptid ellen termelt ellenanyaggal. Ilyen ellenanyag felismerhet eltérő kémiai csoportosulásokat is, amelyeket ekkor az immunogén determinánst „immunológiai utánpótló” determinánsoknak nevezünk.

Azt mondjuk, hogy másodlagos módosítások létrehozása szükséges vagy kulcsfontosságú vagy előfeltétele valamely ellenanyaggal történő reagálásnak, ha a másodlagos módosítások hiánya olyan peptidet eredményez, amelynek disszociációs konstansa az ellenanyaggal történő kölcsönhatás vonatkozásában legalább két nagyságrenddel, előnyösen három nagyságrenddel, még előnyösebben négy nagyságrenddel nagyobb, mint az ellenanyag és a másodlagos módosításokat tartalmazó peptid közti kölcsönhatás disszociációs konstansa.

A „keresztreakció” kifejezés vonatkozik egy antigén és valamely egyéb antigén ellen termelt ellenanyagok, vagy egy antigén és különböző betegségekben szenvedő betegek szérumában előforduló ellenanyagok közti reakcióra is.

A találmány egy közelebbi előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány tárgyát képezi citrullin aminosavat tartalmazó peptidek, amelyekben a citrullin jelenléte



kulcsfontosságú ahhoz, hogy azok nagy affinitással kölcsönhatásba lépjenek reumatoid artritiszben szenvedő betegek szérumában jellemzően jelen lévő ellenanyagokkal.

A találmány egy további előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány tárgyát képezik az alábbi aminosav-szekvenciák valamelyikének jelenlétével jellemzett peptidok:

HSASQDGQDTIRGHPGSS; vagy

HSGIGHGQASSAVRDSGHRGYS; vagy

DSGHRGYSGSQASDNEGH; vagy

HSTSQEGQDTIHGHRGS; vagy

GGQGSRHQQAR; vagy

QGSRHQQARDSSRHSTSQEGQDTIHGHRGS; vagy

QGSRHQQARDSSRHSASQDGQDTIRGHPGSS; vagy

HSGIGHGQASSAVRDSGHRGYSGSQASDNEGH;

ahol az argininek legalább egyike, előnyösen valamilyeni arginin citrullinná derivatizált, miáltal azok a fillagrin fő immunogén determinánsát utánozzák.

A találmány egy közelebbi előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány tárgyát képezik vimentin, citokeratin-1 vagy citokeratin-9 bármely variánsából származó, kevesebb, mint 50 aminosavból álló szekvenciát tartalmazó peptidok, amelyek legalább egy citrullin aminosavat tartalmaznak, ahol a citrullin jelenléte kulcsfontosságú a peptid és reumatoid artritiszben szenvedő betegek szérumában található ellenanyagok közti reakció létrejöttéhez.

A találmány tárgyát képezik továbbá molekuláris struktúrák, amelyek legalább egy részét a fenti peptid vagy el-

ellenanyag alkotja. Ilyen molekuláris struktúrák létrehozhatók a találmány szerinti peptidek és egyéb peptidekkel és/vagy proteinekkal és/vagy molekuláris struktúrákkal specifikus módon reagáló peptidek és/vagy proteinek és/vagy egyéb molekulák fuzionáltatásával, amelyek lehetővé teszik a fuzionált polipeptid és/vagy protein címkézését; és/vagy annak meghatározott szövet- vagy sejttípusokhoz kötődését; vagy lehetővé teszik a molekuláris struktúrák tisztítását, például 4, 5 vagy 6 egymást követő hisztidin aminosav jelenléte révén; vagy citotoxikusak T-sejtekre és/vagy B-sejtekre, mint például a koleratoxin; vagy jelölést tesznek lehetővé radioaktív vagy fluoreszcens vagy „immunogold” (immunarany) vagy enzimatis markerrel.

Bizonyos esetekben előnyös lehet, ha két vagy több peptidet egy peptidstruktúrában összekapcsolunk, vagy elágazó peptideket állítunk elő. A fenti megoldás egy előnye diagnosztikai alkalmazások vonatkozásában a technika állása szerint jól ismert. Amennyiben antigéneket alkalmazunk ellenanyagok jelenlétének kimutatására valamely vizsgálati eljárásban, az antigént tandem ismétlődő egységekként vagy elágazó formában tartalmazó peptidek alkalmazásával növelhetjük az ellenanyagok számára prezentált immobilizált antigén mennyiségét, ezáltal fokozhatjuk a vizsgálati eljárás érzékenységét. Az érzékenység exponenciálisan növelhető úgy, hogy az immobilizált antigéneket meghatározott koncentrációjú szolúbilis antigénekkal alkalmazzuk együtt, miáltal keresztkötéseket tartalmazó antigén-immunprecipitátumok képződését váltjuk ki. Egy második előny terápiás al-

kalmazás vonatkozásában jelentkezik. A saját antigén elleni autoimmun-komplexek lerakódása különböző szövetekben fontos lépés valamely kóros állapot kialakulása felé. Általánosságban elfogadott, hogy a fenti lerakódás fő oka az, hogy az antigén-immunkomplexeket, azok kis mérete miatt, a máj nem megfelelően távolítja el a vérből. A peptidek tandem ismétlődő vagy elágazó formáinak beadásával a képződő antigén-immunkomplexek mérete növelhető, kiürülésük fokozható, a komplexek lerakódása csökkenthető.

Ugyancsak a találmány tárgyát képezik a peptidek cirkularizált formái, amelyek előnyei a technika állása szerint jól ismertek, és abban nyilvánulnak meg, hogy a rögzített konformációjú peptid affinitása fokozott a lineáris peptidek sokkal véletlenszerűbben felcsavarodott formáihoz képest.

A találmány szerinti peptidek esetleges negatív sajátosságainak - például gyors peptidlebomlás, szolubilitás, citotoxikus hatás stb. - kompenzálására szakember képes konzervatív és nem-konzervatív aminosav-szubsztitúciók vagy természetben elő nem forduló aminosavakkal történő szubsztitúciók, stb. tervezésére. Ezek általánosságban a specifikus szekvencia kevesebb, mint 35%-át érintik. Ilyen peptidek lehetnek például szubsztituált kötéseket vagy a technika állása szerint ismert egyéb, természetben előforduló vagy természetben elő nem forduló módosításokat tartalmazó peptidek. Azokban az esetekben, amikor a találmány szerinti fillagrinpeptidek nagyon polimorfok, egy vagy több aminosavat előnyösen úgy változtathatunk meg, hogy jobban utánoz-

zuk a különböző epitópokat vagy a reumatoid artritiszben szenvedő betegek szérumában előforduló ellenanyagok által felismert epitópokat.

A találmány egy további előnyös megvalósítási módja szerint, szintén a találmány tárgyát képezik az általunk izolált, klónozott és szekvenált új allélikus variánsok, amelyek DNS-szekvenciáját a 6. ábrán, aminosav-szekvenciáját a 2. ábrán mutatjuk be. A találmány tárgyát képezi továbbá a találmány szerinti peptidek bármely analógja.

A leírás szerinti értelemben, a találmány szerinti proteinek vagy peptidek vonatkozásában, analógnak" nevezünk bármely proteint vagy peptidet, amely a bemutatott szekvenciával lényegében homológ aminosav-szekvenciájú, és amelyben egy vagy több aminosav biológiailag egyenértékű aminosavval lett konzervatív módon helyettesítve. Konzervatív szubsztitúció például hidrofób aminosavak, például izoleucin, valin, leucin vagy metionin helyettesítése más ilyen aminosavval; hidrofil aminosavak, például arginin és lizin, glutamin és aszparaginok, glicin és szerin helyettesítése egymással; bázikus aminosav, például lizin, arginin vagy hisztidin helyettesítése más ilyen aminosavval; vagy savas aminosav, például aszparaginsav vagy glutaminsav helyettesítése más ilyen aminosavval. A találmány szerinti megoldással összhangban megengedhető mutációkat foglaltunk össze az 1. táblázatban.

„Konzervatív szubsztitúción" értjük kémiai úton derivatizált aminosavak alkalmazását is valamely nem-derivatizált aminosav helyén, azzal a kikötéssel, hogy a létre-

jött protein vagy peptid biológiailag egyenértékű a találmány szerinti peptiddel vagy proteinnel.

A „kémiai úton derivatizált” kifejezést egy vagy több, funkcionális oldallánccal létrejött reakcióval kémiai úton derivatizált aminosavat tartalmazó protein vagy peptid; vagy szubsztituált kötéseket tartalmazó peptid; vagy a technika állása szerint ismert egyéb, természetben előforduló vagy ott elő nem forduló módosításokat tartalmazó peptid leírására használjuk. Ilyen derivatizált molekulák például, de anélkül, hogy igényünket a felsoroltakra korlátoznánk, a következők: olyan molekulák, amelyekben szabad aminosocsoportok úgy lettek derivatizálva, hogy amin-hidrokloridok, p-toluol-szulfonil-csoportok, karbобенzoxi-csoportok, t-butil-oxikarbonil-csoportok, klór-acetil-csoportok vagy formil-csoportok jöjjenek létre. Szabad karboxi-csoportokat derivatizálhatunk sókká, metil- és etil-észterekké, vagy más típusú észterekké vagy hidrazidokká. Szabad hidroxil-csoportokat derivatizálhatunk O-acil- vagy O-alkil-származékokká. A hisztidin imidazol-nitrogénje N-imibenzil-hisztidinné alakítható. Ugyancsak a találmány szerinti kémiai derivátumok (származékok) közé soroljuk azokat a proteineket vagy peptideket, amelyek a húsz ismert aminosav egy vagy több természetben előforduló aminosav-származékát tartalmazzák. Például, a prolin helyettesíthető 4-hidroxiprolinnal; a lizin helyettesíthető 5-hidroxilizinnel; a hisztidin helyettesíthető 3-metilszerinnel, a szerin helyettesíthető homoszerinnel; és a lizin helyettesíthető ornitinnel. Szintén a találmány tárgyát képezi bármely pro-

tein vagy peptid, amely egy vagy több aminosav-addíciót és/vagy -deléciót tartalmaz a bemutatott szekvenciákhoz képest, amennyiben a peptid biológiailag egyenértékű a találmány szerinti proteinekkel vagy peptidekkel.

Amino acids	Synonymous groups
Ser (S)	Ser, Thr, Gly, Asn
Arg (R)	Arg, His, Lys, Glu, Gln
Leu (L)	Leu, Ile, Met, Phe, Val, Tyr
Pro (P)	Pro, Ala, Thr, Gly
Thr (T)	Thr, Pro, Ser, Ala, Gly, His, Gln
Ala (A)	Ala, Pro, Gly, Thr
Val (V)	Val, Met, Ile, Tyr, Phe, Leu, Val
Gly (G)	Gly, Ala, Thr, Pro, Ser
Ile (I)	Ile, Met, Leu, Phe, Val, Ile, Tyr
Phe (F)	Phe, Met, Tyr, Ile, Leu, Trp, Val
Tyr (Y)	Tyr, Phe, Trp, Met, Ile, Val, Leu
Cys (C)	Cys, Ser, Thr, Met
His (H)	His, Gln, Arg, Lys, Glu, Thr
Gln (Q)	Gln, Glu, His, Lys, Asn, Thr, Arg
Asn (N)	Asn, Asp, Ser, Gln
Lys (K)	Lys, Arg, Glu, Gln, His
Asp (D)	Asp, Asn, Glu, Gln
Glu (E)	Glu, Gln, Asp, Lys, Asn, His, Arg
Met (M)	Met, Ile, Leu, Phe, Val

1. táblázat

Az alábbi táblázatban olyan aminosav-szubsztitúciókat foglaltunk össze, amelyek a fenti analógok („muteinek”) alapján szolgálhatnak

Az említetteken felül, az amino- vagy karboxi-terminushoz további aminosavakat vagy kémiai csoportokat adhatunk, miáltal „linker karokat” (összekapcsoló karokat) hozunk létre, amelyen keresztül a peptid kovalens módon hordozóhoz köthető. A „linker kart” legalább egy aminosav alkotja, és állhat akár 60 aminosavból, de leggyakrabban 1-10 aminosavból áll. A szilárd fázishoz vagy hordozóhoz történő kapcsolás természete lehet kovalens vagy nem-kovalens. Ilyen elrendezések a technika állása szerint jól ismertek. Az amino- vagy karboxi-terminushoz természetes aminosavakat, például hisztidint, ciszteint, lizint, tirozint, glutaminsavat vagy aszparaginsavat adhatunk, miáltal funkcionális csoportokat hozunk létre szilárd fázishoz vagy hordozóhoz történő kapcsoláshoz. Egyéb kémiai csoportokat, például biotint és tioglikolsavat is adhatunk azonban a végekhez, amelyek kívánt kémiai vagy fizikai sajáttságot kölcsönöznek a peptideknek. A peptidek végei ugyancsak módosíthatók, például N-terminális acetilezéssel vagy terminális karboxi-aminálással. Valamennyi esetben, a peptidnek előnyösen kis méretűnek kell lennie, amennyire csak lehetséges, miközben a nagyobb méretű peptid lényegében teljes szenzitivitását meg kell tartania.

A találmány szerinti peptidek - és közelebbről, a fragmentumok - előállíthatók kémiai szintézissel. A szintézist végezhetjük homogén oldatban vagy szilárd fázison. Például, homogén oldatban alkalmazhatjuk Houbenweyl által leírt szintézis technológiát [„Methode der organischen chemie“, 15/I és II, szerk.: Wunsch E., Thieme, Stuttgart (1974)]. A találmány szerinti polipeptidek előállíthatók továbbá szilárd fázison, Atherton és Shepard által leírtak szerint [„Solid Phase Peptide Synthesis“, IRL Press, Oxford (1989)]. A találmány szerinti peptidek különböző formáit úgy kaphatjuk meg, hogy az eredeti arginineket a klasszikus kémiai szintézis során citrullinnal helyettesítjük, vagy a peptidet a szintézist követően bármely eukariota eredetű peptidilarginin deziminázzal érintkeztetjük.

A találmány szerinti polipeptideket előállíthatjuk továbbá rekombináns DNS-technológiával, Maniatis és munkatársai által leírtak szerint [Maniatis és munkatársai: „Molecular Cloning, A Laboratory Manual“, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1982)], oly módon, hogy a találmány szerinti peptideket vagy a találmány szerinti peptidek egy részét kódoló polinukleinsav-szekvenciát inszertálunk megfelelő vektorba, és a vektorral megfelelő gazdaszervezetet transzformálunk. Ez a rekombináns expressziós vektor a fenti polinukleinsav-szekvenciát tartalmaz vagy annak részét tartalmazza prokariota, eukariota vagy virális transzkripciós és transzlációs szabályozó elemekkel funkcionálisan kapcsoltnak. Ezen felül, ez a szekvencia funkcionálisan kapcsolt lehet a találmány szerinti peptidek szekrécióját

lehetővé tevő szekvenciákkal. „Vektoron” plazmidot, kozmidot, fágot, vagy vírust vagy transzgenikus organizmust értünk. Közelebbről, alkalmazhatunk BCG-t vagy adenovírusvektorokat, valamint avipox (madárhimlő) rekombináns vírusokat.

A rekombináns peptid derivatizálható *in vitro* úgy, hogy az expresszáldott és/vagy szekretáldott peptideket bármely eukariota eredetű peptidilarginin deziminázzal érintkeztetjük; vagy *in vivo*, megfelelő gazdaszervezet megválasztásával, amely lehet például élesztő vagy bármely eukariota sejt, és előnyösebben, a baculovírus transzformációs rendszer alkalmazásával; vagy úgy, hogy a peptidet rekombináns peptidilarginin deziminázzal koexpresszáltatjuk.

Ebben az esetben is, a találmány szerinti peptidek előállítására a technika állása szerint ismert bármely, rekombináns peptidek tisztítására alkalmas tisztítási eljárást alkalmazhatjuk.

A találmány tárgyát képezi továbbá rekombináns expressziós vektor, amely a fenti polinukleinsavat vagy annak részét tartalmaz prokariota, eukariota vagy virális transzkripciós és transzlációs szabályozó elemekkel funkcionálisan kapcsoltnak.

Általánosságban, a rekombináns vektor vektorszekvenciát, megfelelő prokariota, eukariota vagy virális promóterszekvenciát, majd a peptidet kódoló nukleotidszekvenciát tartalmaz, ahol a rekombináns vektor lehetővé teszi a polipeptidek expresszáldását és/vagy szekretáldását prokario-

ta vagy eukariota gazdaszervezetben, vagy - amennyiben csupasz DNS-ként injektálják - élő emlősökben.

A rekombináns polipeptidek előállítására ugyancsak alkalmazhatjuk a technika állása szerint ismert bármely, rekombináns proteinek tisztítására alkalmas tisztítási eljárást.

„Vektoron” plazmidot, kozmidot, fágot, vagy vírust vagy transzgenikus organizmust értünk. Vakcina kifejlesztésre különösen előnyösen alkalmazhatunk BCG-t vagy adenovírus-vektorokat, valamint avipox rekombináns vírusokat.

Szintén a találmány tárgyát képezi eljárás a rekombináns polipeptidek előállítására, amely szerint:

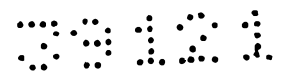
megfelelő celluláris gazdaszervezetet olyan rekombináns vektorral transzformálunk, amelybe a fenti polinukleinsav-szekvencia vagy annak része lett inszertálva megfelelő szabályozó elemek irányítása alatt;

a transzformált celluláris gazdaszervezetet az inszert expresszállódását és/vagy szekretálódását lehetővé tevő körülmények mellett tenyésztjük;

a polipeptidet kinyerjük.

A leírás szerinti értelemben, akkor mondjuk, hogy egy peptid „rekombináns úton lett expresszáltatva”, ha a találmány szerinti proteinek rekombináns expressziós eljárással lettek előállítva prokariota, vagy alacsonyabb vagy magasabb rendű eukariota gazdaszervezetben, az alábbiakban részletesen ismerttetettek szerint.

„Alacsonyabb rendű eukariotán” élesztő, gomba és hasonló gazdaszervezeteket értünk. Az alacsonyabb rendű



eukarioták rendszerint (de nem szükségszerűen) egysejtűek. Alacsonyabb rendű eukariotákként előnyösen élesztőt, közelebbről a felsorolt fajokhoz tartozó élesztőt alkalmazunk: *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Kluveromyces*, *Pichia* (például *Pichia pastoris*), *Hansenula* (például *Hansenula polymorpha*), *Yarrowia*, *Schwaniomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Zygosaccharomyces* és hasonlóké. A leggyakrabban alkalmazott élesztőgazdák és alkalmas gomba gazdaszervezetek a *Saccharomyces cerevisiae*, *S. carlsbergensis* és *K. lactis*.

„Prokariotán” olyan gazdasejteket értünk, mint az *E. coli*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Salmonella*, *Streptococcus*, *Bacillus subtilis* vagy *Streptomyces*. A találmány tárgyához tartoznak ezek a gazdaszervezetek is.

„Magasabb rendű eukariotán” magasabb rendű állatokból, például emlősökből, hüllőkből, rovarokból és hasonlókból származó gazdasejteket értünk. Magasabb rendű eukariota gazdasejtekként előnyösen kínai hörcsög petefészek sejtjeit (például CHO-sejtjeit), majom (például COS- és Vero-sejtjeit), főtális hörcsögvese (BHK-sejtjeit), malacvese (PK15), 13 jelzésű nyúl vese sejtjeit (RK13), a 143B jelzésű humán osteosarkóma sejtvonalat, a humán HeLa sejtvonalat és humán hepatóma sejtvonalat, például HepG2-sejtjeit, és rovarsejtvonalakat (például *Spodoptera frugiperda*) alkalmazunk. A gazdasejt jelen lehet szuszpenzióban vagy palackkultúrákban, szövettenyésztésben, szervtenyésztésben és hasonlókként. Más eljárás szerint, a gazdasejtek lehetnek transzgenikus állat sejtjei.

A leírás szerinti értelemben „rekombináns polinukleotidnak” vagy „nukleinsavnak” genomi, cDNS, félszintetikus vagy szintetikus eredetű polinukleotidot vagy nukleinsavat nevezünk, amely eredetileg vagy módosítás következtében: (1) nem kapcsolt valamennyi polinukleotiddal vagy annak egy részével, amellyel a természetben asszociált; (2) egyéb polinukleotiddal kapcsolt, mint amellyel a természetben; vagy (3) nem fordul elő a természetben.

Egysejtű entitásokként tenyésztett mikroorganizmusok vagy magasabb rendű eukariota sejtvonalak vonatkozásában „rekombináns gazdasejteken”, „gazdasejteken”, „sejteken”, „sejtvonalakon”, „sejttenyészeteken” és hasonló kifejezéseken olyan sejteket értünk, amelyek rekombináns vektor vagy más transzfer polinukleotid recipienseként alkalmazhatók, vagy amelyeket akként alkalmaztunk, és azok lehetnek az eredeti transzfektált sejt utódai is. Nyilvánvaló, hogy egyetlen szülői sejt utódai - morfológia vagy genomi vagy teljes DNS-összetétel tekintetében - nem feltétlenül teljesen azonosak az eredeti szülővel, természetes, véletlenszerű, vagy szándékosan előidézett mutációk miatt.

„Replikonnak” nevezünk bármely genetikai elemet, például plazmidot, kromoszómát, vírust, kozmidot, stb., amely polinukleotid-replikáció vonatkozásában autonóm egységként viselkedik a sejtben; például saját szabályozása alatt képes replikálódni.

„Vektornak” olyan replikont nevezünk, amely kívánt nyitott olvasási keret replikációját és/vagy expresszációját biztosító szekvenciákat is tartalmaz.

„Szabályozó szekvencián” olyan polinukleotid-szekvenciákat értünk, amelyek szükségesek az azokkal ligált kódoló szekvenciák expressziójához. Az ilyen szabályozó szekvenciák természete a gazdaszervezettől függ; prokariotákban, ilyen szabályozó szekvenciák általánosságban promótert, riboszóma-kötőhelyet, összeállítódási („*splicing*”) helyeket és terminátorokat foglalnak magukban; eukariotákban, ilyen szabályozó szekvenciák általánosságban promótereket, összeállítódási helyeket, terminátorokat és - egyes esetekben - enhanszereket foglalnak magukban. „Szabályozó szekvenciák” kifejezés minimálisan vonatkozik valamennyi olyan komponensre, amelynek jelenléte az expresszió előfeltétele; és vonatkozhat további komponensekre, amelyek jelenléte előnyös, például szekréciót irányító vezető szekvenciákra.

A leírásban „promóternek” konszenzus szekvenciákból felépülő nukleotidszekvenciát nevezünk, amely lehetővé teszi a RNS-polimeráz kötődését a DNS-templáthoz, miáltal mRNS-szintézis indul meg a szomszédos strukturális gén normális transzkripció kezdőhelyénél.

Akkor mondjuk, hogy a komponensek „funkcionálisan kapcsoltak”, ha azok csatlakoztatásuk révén olyan viszonyba kerülnek, amely lehetővé teszi, hogy a kívánt módon működjenek. Azt mondjuk, hogy valamely szabályozó szekvencia funkcionálisan kapcsolts egy kódoló szekvenciával, ha azok úgy vannak ligálva, hogy a kódoló szekvencia a szabályozó szekvenciákkal kompatibilis körülmények mellett expresszálódjék.

A találmány szerinti peptideket kódoló és a vektor-szekvenciába inszertált polinukleinsav szignálszekvenciával lehet összekapcsolva. A szignálszekvencia bármely eredetű lehet; emlős sejtekben történő expresszáltatáskor például az IgG vagy a szöveti plazminogén aktivátor (tpa) vezető szekvenciája, élesztősejtekben történő expresszáltatáskor pedig az α -szexfaktor szekvencia.

A találmány szerinti peptidek különböző vektorok alkalmazásával állíthatók elő. Tipikusan, alacsonyabb rendű eukariotákat, például élesztősejteket és glikozilezés vonatkozásában mutáns törzseket transzformálunk plazmidokkal, vagy transzformálunk rekombináns vírussal. A vektor replikálódhat a gazdasejtekben függetlenül, vagy integrálódhat a gazdasejt genomjába.

Magasabb rendű eukariotákat transzformálhatunk vektorokkal, vagy, fertőzhetünk rekombináns vírussal, például rekombináns vacciniavírussal. Olyan eljárások, amelyekkel DNS vacciniavírusba inszertálható, a technika állása szerint jól ismertek, és azok alapját képezheti például homológ rekombináció. A technika állása szerint, virális promóterszekvenciák, a találmány szerinti megoldással összhangban alkalmazható terminátor szekvenciák, poliadenilezési [poli(A)-szekvencia hozzáadását eredményező] helyek, enhanszer szekvenciák és amplifikációs szekvenciák széles skálája ismert, amelyek jelenlétére mind szükség van emlőssejtekben történő expresszáltatáshoz. Különösen előnyösen vacciniavírust alkalmazunk, mivel az akadályozza a gazdasejt-eredetű proteinek expresszállódását. A vacciniavírus

alkalmazásának további jelentős előnye, hogy lehetővé teszi például a találmány szerinti peptidek expresszációását az élő rekombináns vaciniavírussal immunizált egyedekben vagy sejtekben. Humán egyedek vakcinázására különösen előnyösen az avipox és az „Ankara Modified Virus” (AMV) vírust alkalmazzuk vektorként.

Ismertek továbbá *Autographa californica* nukleáris polihedrózis vírus (AcNPV) baculovírusból származó, rovarsejtekben alkalmazható expressziós transzfervektorok, amelyek „helpervírus” jelenlététől független virális expressziós vektorok. Ebből a rendszerből származó expressziós vektorokban rendszerint az erős virális polihedringén-promótert alkalmazzuk heterológ gének expressziójának irányítására. Különböző vektorok, és olyan eljárások, amelyekkel heterológ DNS baculovírus kívánt helyére juttatható, baculovírus expresszió területén jártas szakember számára ismeretesek. A technika állása szerint ugyancsak ismertek rovarsejtek által felismert, poszt-transzlációs módosítást irányító különböző szignálok.

A találmány tárgyát képezi továbbá a fenti rekombináns vektorok valamelyikével transzformált gazdasejt.

Az említetteken felül, a találmány tárgyát képezik a találmány szerinti peptidek ellen termelt ellenanyagok, előnyösen olyan peptidek ellen termelt ellenanyagok, amelyekben az argininok citrullinná lettek derivatizálva. Ezek az ellenanyagok lehetnek poliklonálisak vagy monoklonálisak. Ellenanyagokat úgy állíthatunk elő, hogy gazdaállatot immunizálunk a találmány szerinti peptidekkel gyógyászati-

lag elfogadható hordozóanyagban, ahol az argininok legalább egyike citrullinná derivatizált. Gyógyászati lag elfogadható hordozóanyagokként alkalmazhatunk bármely hordozóanyagot, amely önmagában nem váltja ki a készítménnyel immunizált egyedre nézve ártalmas ellenanyagok termelődését. Alkalmas hordozóanyagok tipikusan nagyméretű, lassan metabolizálódó makromolekulák, például proteinek, poliszacharidok, politejsavak, poliglikolsavak, aminosav-polimerek, aminosav-kopolimerek; és inaktív vírusrészecskék. Ilyen hordozóanyagok szakember számára jól ismertek.

A készítmény hatékonyságának növelésére adjuvánsként például - de anélkül, hogy igényünket a felsoroltakra korlátoznánk - alkalmazhatunk alumínium-hidroxidot (alum), N-acetil-muramil-L-treonil-D-izoglutamint (thr-MDP) [amelynek leírását lásd például a 4 606 918 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-izoglutamint (nor-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-izoglutaminil-L-alanin-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifoszforiloxi)-etilamint (MTP-PE) és/vagy RIBI-t, amely három, baktériumokból extrahált komponenst - monofoszforil-lipid-A-t (MPL), trehalóz dimikolátot (TDM) és sejtfalszekeletont („cell wall skeleton”, CWS) (MPL+TDM+CWS) - tartalmaz 2% szkvalén / Tween-80 összetételű emulzióban. A három komponens - MPL, TDM és CWS - bármelyike egymagában is alkalmazható, vagy azok közül 2-2 kombinálható. Az említetteken felül, egyéb adjuvánsok is alkalmazhatók, például Stimulon (Cambridge Bioscience, Worcester, MA) vagy SAF-1 (Syntex). Nem humán egyedben tör-

ténő alkalmazásra és kutatási célra alkalmazhatunk továbbá Freund-féle komplett adjuvánst („*Complete Freund's Adjuvant*”; CFA) vagy inkomplett Freund adjuvánst („*Incomplete Freund's Adjuvant*; IFA).

Az immunogén készítmény tipikusan gyógyászatilag elfogadható vivőanyagokat, például vizet, fiziológiás sóoldatot, glicerint, etanolt, stb. is tartalmaz. Ezen felül, ilyen vivőanyaghoz adhatunk járulékos összetevőket, például nedvesítő vagy emulgeáló anyagokat, pH-pufferoló anyagokat, tartósítószereket és hasonlókat.

Az immunogén készítményeket tipikusan injektálható formában állítjuk elő, folyékony oldatokként vagy szuszpenzióként; vagy az injektálást megelőzően folyékony vivőanyagban oldható vagy szuszpendálható szilárd formában. Ezen felül, a készítmény emulgeálható vagy liposzómákba kapszulázható, miáltal az adjuváns hatás fokozódik. A készítmény immunstimuláló komplexekbe („*Immune Stimulating Complexes*” is építhető szaponinokkal, például Quil-A-val együtt (ISCOMS).

Az ellenanyagok termeltetésére alkalmazott immunogén készítmények „elegendő mennyiségben” vagy „immunológiailag hatékony mennyiségben” tartalmazzák a találmány szerinti peptideket, ezen felül - szükség szerint -, tartalmazhatják bármely említett komponenst. „Immunológiailag hatékony mennyiségben” azt értjük, hogy az adott mennyiség beadása valamely egyednek - egyetlen dózisban vagy sorozatos adagolás részeként - hatásos immunválasz és ellenanyagok termelésének kiváltására. Ez a mennyiség függ az egyed egész-

ségi állapotától és fizikai kondíciójától, a kezelendő egyed taxonómiai besorolásától (például nem-humán főemlős, főemlős, nyúl, stb.), az egyed immunrendszerének ellenanyag-termelő képességétől, az antigénhatású peptid immuno-genitásától és egyéb faktoroktól. Várható, hogy ez a mennyiség viszonylag széles határok közt mozog, amely rutin kísérletezéssel meghatározható. A mennyiség általánosságban 0,01-1000 µg/dózis, közelebbről 0,1-100 µg/dózis.

Az immunogén készítményeket általában parenterálisan adjuk be, tipikusan inkjektálással, például szubkután vagy intramuszkulárisan (izomba). Más úton történő beadásra alkalmas készítmények lehetnek orális készítmények vagy kúpok. A kezelést végezhetjük egyetlen dózis vagy több dózis beadásán alapuló adagolási rend szerint. A vakcinát egyéb immunszabályozó hatóanyagokkal együtt is beadhatjuk.

Megfelelő időtartamot követően, a gazdától szérumot vagy plazmát nyerünk, amelyből a találmány szerinti peptid-ekkel reagáló ellenanyagokat tartalmazó készítményt állítunk elő. Például, telített ammónium-szulfát vagy „DEAE Sephadex” alkalmazásával vagy más szakember számára ismert technológiával izolálhatjuk a gamma-globulin frakciót vagy az IgG-ellenanyagokat. Az ellenanyagok lényegében mentesek számos olyan káros mellékhatástól, amelyek egyéb vírus-ellenes ágensek, például fertőző, krónikus vagy rekurrens mononukleózis kezelésére alkalmazott hatóanyagok adagolásával együtt járhatnak. Ilyen ellenanyagok alkalmazhatók lehetnek bizonyos betegségek, például Burkitt-limfóma diagnó-

zisára, amely utóbbi kórképben az Epstein-Barr vírus szerepét mutatták ki.

Akkor mondjuk egy anyagról, hogy az „immunogén”, ha képes humorális és/vagy celluláris választ kiváltani, egy-magában vagy hordozóanyaghoz kapcsoltnan, adjuváns jelenlétében vagy annak hiányában.

A találmány szerinti ellenanyagok monoklonális ellenanyagok is lehetnek, amelyeket úgy állítunk elő, hogy specifikus módon reagáljanak a peptidek valamelyikével, és előnyösen monoklonális ellenanyagok legyenek.

A találmány szerinti monoklonális ellenanyagokat előállíthatjuk bármely, elsősorban klasszikus eljárásokkal létrehozott hibridóma alkalmazásával, egyrészt, a találmány szerinti peptidekkel immunizált állat, például egér vagy patkány lépsejtjeiből, másrészt, egy mielóma sejtvonallal sejtjeiből; ezután, a hibridóma arra nézve szelektálható, hogy termel-e az állat immunizálására eredetileg alkalmazott peptidek citrullintartalmú formáit felismerő monoklonális ellenanyagokat.

A találmány szerinti ellenanyagok megfelelő enzimatis, fluoreszcens vagy radioaktív jelöléssel láthatók el.

A találmány egy további előnyös megvalósítási módja szerint, a monoklonális ellenanyagok egérezetű monoklonális ellenanyagok rekombináns DNS-technológiával előállított humanizált változatai, amelyeket H- és L-láncokat kódoló egér és/vagy humán genomi DNS-szekvenciákból vagy H- és L-láncokat kódoló cDNS-klónokból kiindulva állítunk elő.

A találmány egy további előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány szerinti monoklonális ellenanyagok lehetnek humán monoklonális ellenanyagok. A találmány eme előnyös megvalósítási módja szerint, ezek az ellenanyagok ugyancsak származhatnak reumatoid artritiszben szenvedő betegekből nyert humán perifériás vér eredetű limfocitákból. Ilyen humán monoklonális ellenanyagok előállíthatók például humán perifériás vér eredetű limfociták (PBL-ek) repopulációjával súlyos kombinált immunhiányos („*severe combined immune deficiency*”, SCID) egerekben [az erre a témára vonatkozó, közelmúltban megjelent összefoglalót lásd: Duchosal és munkatársai: (1992)], vagy úgy, hogy vakcinázott egyedeket szűrünk a találmány szerinti antigének alkalmazásával reaktív B-sejtek jelenlétére.

A találmány tárgyát képezik továbbá anti-idiotípus ellenanyagok, amelyek a fenti ellenanyagok valamelyikével történő immunizációval lettek előállítva, és specifikus módon reagálnak az ellenanyagokkal, ezáltal utánozzák a találmány szerinti peptideket.

Ezen felül, a találmány tárgyát képezik az ellenanyagok és anti-idiotípus ellenanyagok csonka változatai és egyláncú változatai, amelyek megtartották az eredeti specifitást az antigénekkal történő reaktivitás vonatkozásában.

A találmány tárgyát képezik továbbá az ellenanyagokat utánzó proteinek vagy peptidek, például fágprezentációs eljárással nyerhető mikroproteinek; vagy rekombináns ellenanyag nagymértékben variábilis doménja, amelyet repertoárklónozást követően végzett szűréssel kaphatunk.

Az említetteken felül, a találmány tárgyát képezi eljárás a találmány szerinti peptidekkel vagy anti-idiotípus ellenanyagokkal specifikus módon reagáló, biológiai mintában jelen lévő ellenanyagok kimutatására, amely szerint:

(i) az ellenanyagok jelenlétére analizálandó biológiai mintát a peptidek vagy anti-idiotípus ellenanyagok valamelyikével érintkeztetjük;

(ii) az ellenanyagok és peptid vagy anti-idiotípus ellenanyag által képzett immunológiai komplexet kimutatjuk.

A találmány tárgyát képezi továbbá reverz eljárás a találmány szerinti peptidek és/vagy anti-idiotípus ellenanyagok kimutatására a peptidekkel vagy ilyen peptideket utánzó anti-idiotípus ellenanyagokkal specifikus módon reagáló, biológiai mintában jelen lévő ellenanyagok alkalmazásával, amely szerint:

(i) a peptidek vagy anti-idiotípus ellenanyagok jelenlétére analizálandó biológiai mintát az ellenanyagokkal érintkeztetjük;

(ii) az ellenanyagok és peptid vagy anti-idiotípus ellenanyag által képzett immunológiai komplexet kimutatjuk.

A fenti eljárások alkalmazhatók reumatoid arthritisz diagnosztizálására.

A találmány egy további előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány tárgyát képezi diagnosztikai eljárás, amely lehetővé teszi, hogy elkülönítsük azokat az autoimmun betegségeket, amelyekben a jellemző ellenanyagok gyakran ugyanazzal az antigénnel keresztreakálnak, ezáltal a diagnózist bonyolulttá és lassúvá teszik. Ilyen diagnosztikai

eljárások alapulhatnak több találmány szerinti antigén és/vagy anti-idiotípus ellenanyag párhuzamos alkalmazásán.

A találmány tárgyát képezi továbbá diagnosztikai reagenskészlet az ellenanyagok jelenlétének kimutatására, amely legalább egy, fenti meghatározás szerinti peptidet, anti-idiotípus ellenanyagot vagy mikroproteint tartalmaz, amely peptid vagy anti-idiotípus ellenanyag vagy mikroprotein előnyösen szilárd hordozóhoz van kötve.

A már említetteken felül, a találmány tárgyát képezi diagnosztikai reagenskészlet autoimmun betegség típusának meghatározására, amely legalább egy, fenti meghatározás szerinti peptidet, anti-idiotípus ellenanyagot vagy mikroproteint tartalmaz, amely peptid vagy anti-idiotípus ellenanyag vagy mikroprotein előnyösen szilárd hordozóhoz van kötve.

Ugyancsak a találmány tárgyát képezi diagnosztikai reagenskészlet, amely a peptidek és/vagy anti-idiotípus ellenanyagok vagy mikroproteinek sorozatát tartalmazza szilárd hordozón, meghatározott helyekhez kötve.

A találmány tárgyát képezi továbbá diagnosztikai reagenskészlet, ahol a szilárd hordozó membráncsík, és a peptidek és/vagy anti-idiotípus ellenanyagok vagy mikroproteinek párhuzamos sávok formájában vannak ahhoz hozzákapcsolva.

A találmány szerinti immunológiai próbákban alkalmazhatunk például különálló antigént vagy specifikus oligomer antigéneket, dimer antigéneket; valamint különálló vagy specifikus oligomer antigének kombinációit. A találmány

szerinti peptidek gyakorlatilag bármely vizsgálati típusban alkalmazhatók, amelyben ismert antigént alkalmazunk bizonyos betegségre vagy fertőzésre jellemző ellenanyagok kimutatására. Valamennyi ilyen vizsgálat közös sajáttsága, hogy az antigénhatású peptidet vagy anti-idiotípus ellenanyagot vagy mikroproteint az ellenanyagokat feltételezetten tartalmazó testalkotóval érintkeztetjük, olyan körülmények mellett, amelyek lehetővé teszik, hogy az antigén kötődjék a testalkotóban jelen lévő ilyen ellenanyagokkal. Ilyen körülményeken tipikusan fiziológiás hőmérsékletet, pH-t és ionerősséget értünk, és az antigént feleslegben alkalmazzuk. Miután az antigént a mintával inkubáltuk, az antigént magában foglaló immunkomplexeket kimutatjuk.

Immunológiai próbák nagymértékű változatosságot mutatnak, és a technika állása szerint számos formájuk ismert. Eljárások alapulhatnak például szilárd hordozó alkalmazásán vagy immunprecipitáción. Az eljárások többségében jelölt ellenanyagot vagy peptidet alkalmaznak; a jelölés lehet például enzimatis, fluoreszcens, kemilumineszcens, radioaktív vagy festékmolekula. Ismertek olyan vizsgálati eljárások is, amelyekben az immunkomplexből származó jel amplifikálódik; ilyen vizsgálati eljárások például a biotin és avidin vagy streptavidin alkalmazásán alapuló eljárások; valamint enzimmel jelölt reagensek alkalmazásán alapuló és enzimközvetített vizsgálati eljárások, például ELISA-eljárások.

Az immunológiai próbák például, de anélkül, hogy igényünket a felsoroltakra korlátoznánk, lehetnek heterogén

vagy homogén formájúak, és standard vagy kompetitív típusúak. Heterogén formában, a peptid vagy anti-idiotípus ellenanyag vagy mikroprotein tipikusan szilárd mátrixhoz vagy hordozóhoz van kötve, megkönnyítendő az inkubációt követően a minta elkülönítését a peptidtől vagy anti-idiotípus ellenanyagtól vagy mikroproteintől. Heterogén formában, szilárd hordozóként alkalmazhatunk például nitrocellulózt (például membránként, vagy mikrotitráló lemez mélyületeként) polivinil-kloridot (például lapokként vagy mikrotitráló lemez mélyületeként), polisztrén latexet (például szemcsékként vagy mikrotitráló lemezekként), polivinildénfluoridot (amely Immunolon™ néven ismert), diazotált papírt, nylon membránokat, aktivált szemcséket és protein-A-szemcséket (Precision Plastic Ball). A heterogén formában alkalmazhatunk például „Dynatech Immunolon™ 1” vagy „Immunolon™ 2” mikrotitráló lemezeket vagy 0,635 cm (0,25 inch) polisztrén szemcséket (Precision Plastic Ball). Az antigénhatású peptideket vagy anti-idiotípus ellenanyagokat vagy mikroproteineket tartalmazó szilárd hordozót, miután a tesztmintát eltávolítottuk, és mielőtt a kötődött ellenanyagokat kimutatjuk, tipikusan mossuk. Az eljárásnak a technika állása szerint mind standard, mind kompetitív formái ismertek.

Homogén forma esetén, a tesztmintát antigének kombinációjával inkubáljuk oldatban. Az inkubációt végezhetjük például a képződött antigén-ellenanyag vagy anti-idiotípus ellenanyag - ellenanyag vagy mikroprotein-ellenanyag komplexek precipitálódását eredményező körülmények mellett.

Ezeknek a próbáknak a technika állása szerint mind standard, mind kompetitív formái ismertek. Standard formában például, reumatoid artritisz jellemzésére a reumatoid artritiszre jellemző ellenanyagok mennyiségét közvetlenül mérjük az ellenanyag-antigén komplexekben. Ezt végezhetjük annak meghatározásával, hogy egy második típusú, jelölt anti-xenogén (például anti-humán) ellenanyag, amely az első típusú, reumatoid artritiszre jellemző ellenanyagon ismer fel valamely epitópot, kötődik-e komplexképződés révén. Kompetitív formában, a mintában található, reumatoid artritiszre jellemző ellenanyagok mennyiségére úgy következtünk, hogy annak kompetitív hatását mérjük ismert mennyiségű jelölt ellenanyag (vagy más, a kötődésért versengő ligandum) kötődésére a komplexben. A találmány szerinti megoldást reumatoid artritisz diagnosztizálásán keresztül szemléltetjük reumatoid artritiszre jellemző ellenanyagok kimutatásával. A leírásban a „reumatoid artritiszre jellemző ellenanyagok” kifejezést használjuk, anélkül azonban, hogy igényünket arra korlátoznánk. Hasonlóképp, az egyéb autoimmun betegségeket más ellenanyagok alkalmazásával diagnosztizáljuk, és a mononukleózist Epstein-Barr-vírus elleni ellenanyagok kimutatásával diagnosztizáljuk.

A képződött, reumatoid artritiszre jellemző ellenanyagokat tartalmazó komplexeket (vagy kompetitív próbák esetén, a versengő ellenanyagok mennyiségét) bármely ismert eljárással kimutathatjuk vagy meghatározhatjuk, a próba formájától függően. Reumatoid artritiszre jellemző jelöletlen ellenanyagokat a komplexben kimutathatunk például anti-

xenogén immunglobulin (Ig) és jelölőanyag (például enzim jelölőanyag) alkotta konjugátum alkalmazásával.

Immunprecipitációs vagy agglutinációs próbák esetében, a reumatoid artritisz kialakulásában szerepet játszó antigének és reumatoid artritiszre jellemző ellenanyagok közti reakció térhálós struktúra kialakulását eredményezi, amely az oldatból vagy szuszpenzióból precipitálódik, és precipitátumból álló látható réteget vagy filmet képez. Amennyiben a tesztelendő mintában reumatoid artritiszre jellemző ellenanyagok nincsenek jelen, nem képződik látható precipitátum.

Jelenleg, a részecskeagglutinációs („particle agglutination”, PA) próbáknak három jellemző típusa ismert. Ezeket a próbákat különböző, hordozóhoz kötött antigének elleni ellenanyagok kimutatására alkalmazzuk. Ilyen típusú próba például az olyan vörösvérsejtek („red blood cells”, RBC) alkalmazásán alapuló hemagglutinációs próba, amelyeket úgy érzékenyítünk, hogy azokra passzív módon antigéneket (vagy ellenanyagokat) adszorbeáltatunk. Amennyiben ezekhez a testalkotóban jelen lévő, az antigén elleni specifikus ellenanyagokat adunk - ha ilyenek abban jelen vannak -, a tisztított antigénnel bevont RBC-k agglutinálódnak.

A hemagglutinációs próbáknál jelentkező esetleges nem-specifikus reakciók kiküszöbölésére, az RBC-k helyett két mesterséges hordozót alkalmazhatunk hordozóként a PA-próbákban. Ezek közül a leggyakrabban latexrészecskéket alkalmazunk. Alkalmazhatunk továbbá zselatinrészecskéket. A fenti hordozók bármelyikén alapuló próbák alapját a tisztí-

tott antigénekkal bevont részecskék passzív agglutinációja képezi.

A találmány szerinti antigénhatású peptideket tipikusan reagenskészlet formájában szereljük ki az említett immunológiai próbákban történő alkalmazásra. A reagenskészlet általában - külön tartályokban - a következőket tartalmazza: az antigénhatású peptidet vagy anti-idiotípus ellenanyagot, kontroll (pozitív és/vagy negatív) ellenanyagkészítményeket; jelölt ellenanyagot, ha a próba formája azt kívánja; és jelet létrehozó reagenseket (például enzimszubsztrátot), ha a jelölőanyag nem hoz létre jelet közvetlenül. Az antigénhatású peptid vagy anti-idiotípus ellenanyag már eleve kötve lehet szilárd hordozóhoz, vagy jelen lehet külön, olyan reagensekkel együtt, amelyekkel a hordozóhoz köthető. A próbához rendszerint annak kivitelezéséhez szükséges utasításokat mellékelünk (például írásos utasítást, magnószalagot, CD-ROM-ot, stb.).

Szilárd fázisként alkalmazhatunk például polimer vagy üvegszemcséket, nitrocellulózt, mikrorészecskéket, mikrotitráló lemez lyukait, tesztcsöveket és mágneses szemcséket. Szignált létrehozó vegyületként alkalmazhatunk például enzimet, lumineszcens vegyületet, kromogén vegyületet, radioaktív elemet vagy kemilumineszcens vegyületet. Enzimeként alkalmazhatunk például alkalikus foszfatázt, tormaperoxidázt vagy béta-galaktozidázt. Enhanszer vegyületekként alkalmazhatunk biotint, anti-biotint és avidint. Enhanszer vegyületekhez kötődő vegyületek például a biotin, anti-biotin és avidin. Reumatoidfaktor-szerű anyagok hatásának

gátlására a tesztmintát olyan körülményeknek vetjük alá, amelyek elégségesek a reumatoidfaktor-szerű anyagok hatásának blokkolására. Ilyen körülményeket hozhatunk létre például úgy, hogy a tesztmintát például nyúl eredetű Ig vagy anti-humán IgG megfelelő mennyiségével érintkeztetjük, előnyösen aggregált formában; elegyet képezünk, és az elegyet elegendő ideig és ahhoz megfelelő körülmények mellett inkubáljuk, hogy reumatoidfaktor-szerű anyagtól lényegében mentes reakcióelegyet kapjunk.

Közelebbről, a találmány tárgyát képezi immunológiai próba, amelyben több találmány szerinti peptidet kötünk membránhoz párhozamos sávok formájában. Ez a próba formátum különösen előnyös, mivel lehetővé teszi különböző autoimmun betegségek elkülönítését.

A találmány egy további előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány tárgyát képezi biológiai próba autoantigén és reumatoid artritiszre specifikus autoantitest kötődését módosító vegyületek azonosítására, amely szerint:

i) reumatoid artritiszre specifikus autoantitesteket érintkeztetünk az említett peptidek vagy intermedier rost-proteinek bármelyikével, vagy azok valamilyen kombinációjával;

kimutatjuk a reumatoid artritiszre specifikus ellenanyagok kötődését a fenti peptidek vagy intermedier rost-proteinek bármelyikével vagy azok kombinációjával;

(ii) valamely vegyületet vagy vegyületek kombinációját, és reumatoid artritiszre specifikus autoantitesteket érintkeztetünk egyidejűleg vagy egymást követően az emlí-

tett peptidek vagy intermedier rostproteinek bármelyikével vagy azok valamilyen kombinációjával;

kimutatjuk a reumatoid artritiszre specifikus ellenanyagok kötődését a fenti peptidek vagy intermedier rostproteinek bármelyikével vagy azok kombinációjával;

iii) az i) és ii) kísérlet eredményeinek összehasonlításával meghatározzuk, hogy a vegyületek vagy vegyületek kombinációja módosítja-e a reumatoid artritiszre specifikus autoantitestek és az említett peptidek vagy intermedier rostproteinek bármelyikének vagy azok kombinációjának kötődését.

A találmány egy további előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány tárgyát képezi autoantigén és reumatoid artritiszre specifikus autoantitest közti kölcsönhatás modulátora, valamint eljárás a modulátor előállítására, ahol a modulátor a fent ismertetett biológiai próbával lett azonosítva.

A leírás szerinti értelemben a „vegyület” kifejezést tág értelemben használjuk, és az vonatkozik proteinekre, peptidekre, polipeptidekre, peptidomimetikumokra, szénhidrátokra, lipidekre, vagy más szerves vagy szervetlen molekulákra, vagy vakcinázást követően magában a gazdaszervezetben termelődő ellenanyagokra.

A leírásban „kötődésen” azt értjük, hogy valamely peptid fizikailag kapcsolódik ellenanyagokkal, és kölcsönhatásba lép azokkal. A peptid kötődését az ellenanyaghoz kimutathatjuk a technika állása szerint ismert bármely eljárással, például kötődési, ELISA- és RIA-típusú vizsgálati

eljárással vagy kompetitív vizsgálati eljárásokkal (lásd például a példákban ismertetett eljárást, valamint a „Current protocols in immunology” című kézikönyvben).

A leírás szerinti értelemben „módosítani” vagy „módosít” kifejezések egyaránt jelenthetnek valamely peptid és egy anti-HCV-ellenanyag közti kötődésre kifejtett pozitív irányú szabályozást [azaz aktivációt vagy stimulációt (például agonista vagy potenciáló hatást)] vagy negatív irányú szabályozást [azaz inhibíciót vagy szupressziót (például antagonista, csökkentő vagy gátló hatást)].

„Modulátornak” akkor nevezünk egy vegyületet, ha képes a fenti módosító hatást kifejteni.

„Peptidomimetikumnak” olyan molekulákat nevezünk, amelyek előállíthatók, és utánozzák az ellenanyag és a peptid közti kölcsönhatást módosító peptidszekvenciákat. Ilyen peptidszekvenciák nem-hidrolizálható peptidanalógjait előállíthatjuk például benzodiazepin [lásd például Freidinger és munkatársai: Peptides: Chemistry and Biology, szerk.: Marshall G.R., ESCOM Publisher, Leiden, Hollandia (1988)], azepin (lásd például Huffman és munkatársai: Peptides: Chemistry and Biology, szerk.: Marshall G.R., ESCOM Publisher, Leiden, Hollandia (1988)], PNA, szubsztituált gamma-laktám gyűrűk [Garvey és munkatársai: Peptides: Chemistry and Biology, szerk.: Marshall G.R., ESCOM Publisher, Leiden, Hollandia (1988)], ketometilén-pszeudopeptidek [Ewenson és munkatársai: J. Med Chem. 29, 295 (1986); valamint Ewenson és munkatársai: Peptides: Structure and Function, Proceedings of the 9th American

Peptide Symposium, Pierce Chemical Co. Rockland, III (1985)] β -spirális dipeptidmagok [Nagai és munkatársai: Tetrahedron Lett. 26, 647 (1985); valamint Sato és munkatársai: J. Chem. Soc, Perkin Trans 1, 1231 (1986)] és β -aminoalkoholok [Gordon és munkatársai: Biochem Biophys. Res. Commun. 126, 419 (1985); valamint Dann és munkatársai: Biochem Biophys. Res. Commun. 134, 71 (1986)] alkalmazásával.

A következőkben röviden ismertetjük a leíráshoz csatolt ábrákat.

Az 1. ábrán tripszinnel emésztett, humán, természetes savas (a) és neutrális (b) fillagrin HPLC-profilját mutatjuk be.

Peptideket reverz fázisú HPLC-eljárással választottunk szét „C-4 Vydac” oszlopon (2,1x250 mm; Hesperia, CA), „140B Solvent Delivery System” (ABI, Foster city, CA) készülékkel, és 70% acetonitrilből kiindulva készített 8-70% lineáris gradienssel eluáltunk 0,1% koncentrációjú trifluor-ecetsavban. (TFA-ban). A kimutatást 214 nm-en végeztük „1000S” típusú diódasoros detektorral.

A 2. ábrán több sorban párhuzamba állított fillagrin proteinszekvenciákat, valamint a szekvenált peptidek szekvenciáit mutatjuk be. A HB2641-, HB2642-, HB2648- és HB2650-klónokat saját laboratóriumunkban izoláltuk; valamennyi egyéb szekvencia a szakirodalomból származott.

A teljesen konzervált karaktereket „*” jellel jelöltük.

A nagymértékben konzervált karakterek jelölésére a "." jelet alkalmaztuk.

A 3. ábrán 26 humán RA-szérum reaktivitását ábrázoltuk szintetikus peptidekkel, LIA-eljárásban. Az IGP1155-, 1156-, 1157- és 1158-peptidek citrullint tartalmaztak; az IGP1179-, 1180-, 1181- és 1182-peptidek a megfelelő, citrullint nem tartalmazó párok. A peptideket streptavidinnel történő komplexképzést követően vittük fel, 400 µg/ml koncentrációban. Az IGP1154 jelzésű peptid egy semleges kontroll peptid.

A 4. ábrán gátló ELISA-vizsgálat eredményeit ábrázoltuk, természetes fillagrin gátlóanyagként történő alkalmazásával.

A lemezeket tisztított, humán, természetes fillagrinnal vontuk be, 1 µg/ml koncentrációjú oldat alkalmazásával. A szérumokat 1/50 arányban hígítottuk, és 1-10 µg/ml természetes fillagrinnal történő előinkubálást követően, vagy előinkubálás nélkül adtuk a lemezekhez. A fénylenyelést (OD) 450 nm hullámhosszon mértük.

Az 5. ábrán gátló ELISA-vizsgálat eredményeit ábrázoltuk, szintetikus, citrullint tartalmazó fillagrinpeptidek gátlóanyagként történő alkalmazásával.

A lemezeket tisztított, humán, természetes fillagrinnal vontuk be, 4 µg/ml koncentrációjú oldat alkalmazásával. A szérumokat 1/50 arányban hígítottuk, és az egyes peptidekkel (IGP1155, 1156, 1157, 1158) vagy a négy peptid elegyével (elegy; „mix”) történő előinkubálást követően - az egyes peptideket 100 µg/ml koncentrációban alkalmazva -,

vagy előinkubálás nélkül adtuk a lemezekhez. A fényelnyelést (OD) 450 nm hullámhosszon mértük.

A 6. ábrán a HB2641, HB2642-, HB2648-, HB2648- és HB2650-klónok szekvenciáit állítottuk több sorban párhuzamba a szakirodalomból származó HFIL1-szekvenciával [McKinley-Grant és munkatársai: (1988)].

A teljesen konzervált karaktereket „*” jellel jelöltük.

A nagymértékben konzervált karakterek jelölésére a “.” jelet alkalmaztuk.

A 7. ábrán placentaextraktumok 2-dimenziós immunoblotját mutatjuk be.

A placentaextraktum 200 mmol/l sóoldattal eluált frakciójának 200 µg mennyiségét 2-dimenziós gélelektroforézissel választottuk szét, az első dimenzióban IPG 4-7-csíkok, a második dimenzióban 10% Laemmli-gél alkalmazásával. A proteineket elektroblot-eljárással nitrocellulóz-membránokra vittük át, és a blottokat: a) humán, reumatoid artritiszben szenvedő betegből származó szérummal (1/200 hígításban); vagy b) humán vimentin elleni monoklonális ellenanyaggal (mAb) (Sigma) érintkeztettük (az utóbbit 1/5000 hígításban alkalmazva). A nyíl a referencia PDI-protein helyét mutatja, amelyet „Ponceau S” festékkel végzett teljes proteinfestést követően tűszúrással jelöltünk meg.

Miután a találmány szerinti megoldást általánosságban ismertettük, a továbbiakban azt a pontosabb értelmezhetőség céljából konkrét megvalósítási példákon keresztül kívánjuk szemléltetni, anélkül azonban, hogy igényünket az ismerte-

tettekre korlátoznánk.

1. példa

A fillagrin epitóptérképezése

1.1 Szérumok

Humán szérumokat az „University Hospital Genth” (Belgium) reumatológiai osztályáról („Department of Rheumatology”) kaptunk. Összesen 265 szérumot vizsgáltunk, amelyek közül 75 felelt meg az RA-ra megadott ARA-kritériumoknak [Arnett és munkatársai: (1987)], 155 szérum adott pozitív eredményt az APF fluoreszcens tesztben [De Keyser és munkatársai: (közlés alatt)], 98 reagált természetes fillagrinnal Western-blotton, 80 APF-negatív volt, és 16 egészséges donorokból származott.

1.2 Humán fillagrin előállítása

Természetes fillagrint humán bőrből tisztítottunk, amelyet hasplasztikát követően, frissen nyertünk Simon és munkatársai eljárásával [Simon és munkatársai: (1993)]. Az epidermiszt a dermisztől úgy választottuk el, hogy a bőrda-
rabokat 56°C-on, 5 mmol/l EDTA-t tartalmazó PBS-ben inkubáltuk. Az anyagot a felhasználásig -20°C-on tároltuk. Az epidermiszt kis darabokra vágtuk, amelyeket 40 mmol/l Tris-HCl (pH=7,4), 150 mmol/l NaCl, 5 mmol/l EDTA, 0,5% NP-40, 0,1% nátrium-azid, 0,1 mmol/l PMSF (0,2 ml/cm³) összetételű oldatban homogenizáltuk, és egy éjszakán át, 4°C-on ráztuk. A homogenizátumot 15 percig, 15 000 g-vel centrifugáltuk, és a felülúszóban jelen lévő extrahált proteineket egy éjszakán át, -20°C-on, 5 térfogatnyi abszolút etanol hozzá-

adásával precipitáltuk. Miután az elegyet 15 percig, 10 000 g-vel centrifugáltuk, a kiülepített proteineket vákuum alatt szárítottuk, majd vízben szuszpendáltuk. Ezt, a részlegesen tisztított proteinkészítményt alkalmaztuk kísérleteinkben fillagrinként. A protein mennyiségét Bradford eljárásának Peterson által módosított változatával (1983) határoztuk meg, BSA standard görbék felvételével.

1.3 Anti-fillagrín-ellenanyagok kimutatása humán szérumokban immunológiai kimutatási eljárással

A nyers fillagrínkészítményt 10%-os Tricine-SDS-PAGE-gélen futtattuk „Bio-Rad mini-gel” készülék alkalmazásával. Két (2) μg proteint mértünk egy nagyméretű vályulatba, és elektorforézist végeztünk standard körülmények mellett. Ezt követően, a proteineket a gélről elektroblot-eljárással nitrocellulóz-membránra vittük át, 10% metanol és 10 mmol/l CAPS (pH=11,0) összetételű oldatban, 40 perc alatt. A blottot 0,05% Tween-20-detergenst és 1% zselatint tartalmazó PBS-ben blokkoltuk, 3 mm széles csíkokra vágtuk, és egy éjszakán át, 1/100 arányban hígított humán szérummal érintkeztettük 0,05% Tween-20-detergenst és 0,1% zselatint tartalmazó PBS-ben. Második ellenanyagként anti-humán-IgG-AP konjugátumot alkalmaztunk (Sigma, St. Louis, MI) 1/1000 hígításban; az előhívás NBT/BCIP kromogén szubsztrát hozzáadásával történt.

1.4 Fillagrín kétdimenziós elektorforézise

A fillagrínt 2-dimenziós elektroforézissel választottuk szét, az első dimenzióban „Immobiline DryeStrips pH 3-10” (Pharmacia Biotech, Uppsala, Svédország), a másodikban 10%

Tricine-SDS-PAGE alkalmazásával, ismert eljárások szerint. Preparatív gélekre 300 µg proteint vittünk fel, és a géleket „Coomassie R-250” festékkel megfestettük. A fillagrinnak megfelelő nagyméretű, felkiáltójel alakú foltot fillagrin elleni monoklonális ellenanyaggal (BTI, Stoughton, MA) adott immunreakcióval azonosítottuk. Ennek a heterogén proteinnek a pI-értéke 6,7-8,5 tartományba (a gélen 7,1-8,5) esett, és 35-68 kDa molekulatömegű formákat tartalmazott, amelyek közül a legsavasabb izoformok voltak a legnagyobb molekulatömegűek.

1.5 Fillagrin elektorelúciója

A fillagrinnak megfelelő nagyméretű foltot a gélből kivágtuk, és három frakcióra választottuk szét: i) savas frakcióra (pI=7,1-7,5); ii) neutrális frakcióra (pI=7,5-8,1); és iii) bázikus frakcióra (pI=8,1-8,5). Mindegyik frakciót Hunkapiller és munkatársai eljárásával (1983) elektroeluáltuk, 50 mmol/l (NH₄)HCO₃, 0,1% SDS összetételű elúciós puffer alkalmazásával. A Coomassie-festéket és SDS-t ionpárextakcióval távolítottuk el a proteinkészítményből, Königsberg és Henderson eljárása szerint (1983). A vákuum alatt szárított kiüleptített proteineket megfelelő pufferben szuszpendáltuk.

1.6 Peptidtérképezés

A tisztított, elektroeluált fillagrinfrakciók 100 µg mennyiségét 40 µl, következő összetételű pufferben oldottuk: 100 mmol/l 100 mmol/l (NH₄)HCO₃ (pH=8,0), 10% acetonitril; és tripszinnel emésztettük (1/40 enzim/szubsztrát arány alkalmazásával). Miután az elegyet egy éjszakán át,

37°C-on inkubáltuk, az emésztett terméket a felhasználásig -20°C-on tároltuk.

A peptideket reverz fázisú HPLC-eljárással választottuk szét „C-4 Vydac” oszlopon (2,1x250 mm; Hesperia, CA), „140B Solvent Delivery System” (ABI, Foster city, CA) készülékkel, 70% acetonitrilből kiindulva készített 8-70% lineáris gradienssel eluáltuk 0,1% koncentrációjú trifluor-ecetsavban. (TFA-ban). A kimutatást 214 nm-en végeztük „1000S” típusú diódasoros detektorral, és a peptideket manuális úton nyertük ki.

1.7 „Dot-spot” analízis és mikroszekvenálás

A csúcsokat képviselő frakciók 90%-át vákuum alatt szárítottuk, majd kis térfogatú, alábbi összetételű pufferben szuszpendáltuk: 10%-os acetonitril; 50 mmol/l NaCO₃ puffer (pH=9,5). A peptideket foltmintázat formájában „Immunodyne ABC” membránokra vittük fel (Pall BioSupport, UK), amelyeket humán szérummal érintkeztettünk az immunreaktivitást mutató epitópok azonosítására. Először, a membránokat 0,5% kazeint tartalmazó PBS-sel blokkoltuk, és egy éjszakán át, 1/50 arányban, a következő összetételű pufferben hígított szérumokkal inkubáltuk: 0,05% kazein, 0,1% Triton-X705, és 10 mmol/l MgCl₂x6H₂O PBS-ben. Miután a membránokat 0,05% Tween-20-detergenst tartalmazó PBS-sel mostuk, azokhoz anti-humán IgG-t adtunk (Promega), amelyet előzőleg 0,1% kazeint, 0,2% TritonX-705-detergenst tartalmazó pufferben hígítottunk, és azokat 1 óra 30 percig inkubáltuk. Az előhívást NBT/BCIP kromogén szubsztrátot tartalmazó, alábbi összetételű szubsztrátpufferben végez-

tük: 100 mmol/l NaCl, 100 mmol/l Tris-HCl (pH=9,8) és 50 mmol/l $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. A reakciót 0,2 normál H_2SO_4 hozzáadásával állítottuk le.

Az immunreaktív frakció fennmaradó 10%-át mikroszekvenálásnak vetettük alá. Ehhez, frakciókat online 120-feniltiohidantoin analizátorral (ABI) felszerelt pulzáltatott folyadékfázisú „477A Sequencer” típusú készülékkel közvetlenül analizáltunk.

1.8. Kísérleteinkben az alábbi eredményeket kaptuk

Savas fillagrin

A savas fillagrin tripszinnel emésztett valamennyi frakcióját (1.A ábra) ABC-membránokra vittük fel, triplikátumokban, foltmintázat formájában. Az immunreakcióban négy, Western-blot szerint humán fillagrinnal reagáló APF-pozitív szérumot (IG24 395, IG35 247, és IG24 183/24 184 elegyet) és egy APF-negatív kontrollszérumot alkalmaztunk. A T2-, T9-, T16- és T66-frakciók gyenge reakciót adtak az IG24 395-szérummal, míg a T3-T44-sorozat tagjai - különösen a T34- és T38-peptidek - egyértelműen pozitív reakciót adtak. Az APF-szérumelegy ugyancsak pozitív eredményt adott mind a T34-, mind a T38-szérummal, míg az IG35 247 csak a T4-frakcióval reagált. Nyilvánvaló volt, hogy az APF-negatív kontrollszérum egyik peptidfrakcióval sem reagál.

Az egyes frakciókban a következő aminosav-szekvenciákat azonosítottuk:

T38; T39:

A T35-frakcióban található peptidekkel megegyező peptidek;

T40, T41:

A T34-frakcióban található peptidekkel megegyező peptidek;

T66:

Nem volt kimutatható szignál.

R a citrullin aminosavat jelenti, amely meghatározott, az argininétől eltérő retenciós idő után jelenik meg. A citrullin jelenlétének további bizonyítéka, hogy: i) a szekvencia nem hasítódott az adott pozícióban úgy, mintha ott arginin lett volna jelen; és ii) a szekvenálással arginin aminosavat nem azonosítottunk.

Neutrális fillagrin

Hasonló módon jártunk el a neutrális fillagrin esetében (1.B ábra), és a „dot-spot” membránokat az IG24 395 és IG24 184-jelzésű APF-szérumokkal, valamint a savas fillagrin térképezésére is alkalmazott negatív kontrollszérummal inkubáltuk. A T28-, T65-, T81-frakciók és a T30-T40-sorozat tagjai (különösen a T32-, T35- és T36-frakciók) pozitív reakciót adtak egy APF-szérummal, nevezetesen az IG24 395-szérummal. A másik szérum gyenge reakciót adott a T4-, T28-, T45- és T81-frakciókkal. Egy olyan frakciót (T48) találtunk, amely aspecifikus reakciót mutatott valamennyi szérummal, beleértve a negatív kontrollszérummal is.

Az egyes frakciókban a következő szekvenciákat azonosítottuk:

A T32-, T36-, T37-, T48- és T65-frakciók esetében nem kaptunk egyértelmű aminosav-szekvenciákként értelmezhető jeleket.

T35:

R↓HSGIGHGQASSAVR;

R↓DSGHRGYSGSQASDNEGH;

R↓HSTSQEGQDTIHGHRGS;

R↓HSASQDGQDTIRGHGP;

R↓GYSGSQASDNEGHSE.

Az ötödik peptid egyértelműen a második peptid származéka volt, amely nagy valószínűséggel onnan származott, hogy a neutrális fillagrinban két forma, citrullinnal módosított és citrullint nem-tartalmazó forma van jelen. A fenti eredmények szerint, ugyanazt a négy peptidet azonosítottuk, mint a savas T35-frakcióban.

A neutrális fillagrin második térképezése

Két további, az IGP1155, 1156, 1157 vagy 1158 jelzésű szintetikus peptideken negatív eredményt adó szérum - az IG35 038/35 041-szérumok (lásd 2. példa) - elegyét alkalmaztuk más forrásból származó bőrből nyert neutrális fillagrin peptidjeinek térképezésére. Ezek specifikus módon reagáltak a T28-, T31-, T34- és T35-frakciókkal, míg az APF-negatív szérum nem mutatott reaktivitást.

Szekvenálással a következő eredményeket kaptuk:

A T28-, T31- és T34-frakciók esetében nem kaptunk szekvenciákként értékelhető jeleket.

T35:

R↓NDEQSGDGSR.

A fillagrinmolekulák szekvenált immunreaktív részeinek összefoglalását a 2. ábrán mutatjuk be.

2. példa

Szintetikus peptidek reaktivitása sávos immunológiai próba („Line Immuno Assay”; LIA) rendszerben

2.1 Szintetikus peptidek

Szintetikus peptideket az 1. példában ismertettek szerint kapott aminosav-szekvenciák alapján állítottunk elő. Egyes citrullintartalmú peptidek esetében megszintetizáltuk a módosíthatatlan, arginint tartalmazó párt is, hogy a peptidek reaktivitását összehasonlíthassuk. A következő peptideket állítottuk elő:

IGP1155

HSASQDGQDTIRGHPGSS

IGP1179

HSASQDGQDTIRGHPSS

IGP1156

HSGIGHGQASSAVRDSGHRGYS

IGP1180

HSGIGHGQASSAVRDSGHRGYS

IGP1157

DSGHRGYSGSQASDNEGH

IGP1181

DSGHRGYSGSQASDNEGH

IGP1158

HSTSQEGQDTIHGHRGS

IGP1182

HSTSQEGQDTIHGHRGS

IGP1249

GGQGSRHQQAR

IGP1250

GGAGHGHSADSSR

IGP1251

GGHGSHHQQSADSSR

IGP1252

GGNDEQSGDGSRHSGS

IGP1326

SRHSQVGQGESSGPR

R citrullint jelent.

2.2 Analízis sávos immunológiai próbával

Streptavidinnel konjugált peptideket vittünk fel közvetlenül, műanyaghátlapra felvitt nylon membránra. Blokkolt csíkokat egy éjszakán át, humán szérumokkal inkubáltunk, amelyeket előzőleg 1/100 arányban, 1 ml térfogatú, következő összetételű PBS-pufferben hígítottunk: 0,05% kazein; 0,1% Triton-X705; és 10 mmol/l $MgCl_2 \cdot 6H_2O$. Miután a csíkokat 0,05% Tween-20-detergenst tartalmazó PBS-pufferrel mostuk, azokat kecskében termelt, 0,1% kazeint és 0,2% Triton-X705-detergenst tartalmazó PBS-ben hígított anti-humán-IgG-AP konjugátum (Promega) jelenlétében inkubáltuk 1 óra 30 percig. Az előhívást NBT/BCIP kromogén szubsztrátot tartalmazó, alábbi összetételű szubsztrátpufferben végeztük:

100 mmol/l NaCl, 100 mmol/l Tris-HCl (pH=9,8) és 50 mmol/l $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. A reakciót 0,2 normál H_2SO_4 hozzáadásával állítottuk le.

2.3. Kísérleteinkben a következő eredményeket kaptuk

Százhét (107), az RA-ra megadott ARA-kritériumoknak megfelelő egyéntől származó szérumot teszteltünk a LIA-rendszerben a 2.1 pontban ismertetett 13 szintetikus peptiddel adott reaktivitásra. Reaktivitást észleltünk az IGP1155-, 1156-, 1157-, 1158- és 1249-peptidekkel (2. táblázat), ebben a csoportban 48%-os összesített szenzitivitással. Csak azokat a szérumokat figyelembe véve, amelyek Western-blotton humán természetes fillagrinnal reagáltak, nyilvánvaló, hogy ezekkel mindegyik szintetikus peptid esetében szignifikánsan magasabb szenzitivitást értünk el, mint a fillagrin-negatív RA-szérumokkal. Hasonló eredményeket kaptunk, amikor az APF-pozitív és APF-negatív szérumokat külön csoportba osztottuk. Kontroll szérumokként 51 egészséges egyéntől, 61 SLE-ben szenvedő betegtől és 62 osteoarthritisben szenvedő betegtől származó szérumot alkalmaztunk, ezek csak jelentéktelen mértékű reaktivitást mutattak a peptidekkel.

2. táblázat

Humán szérumok immunreaktivitása 5 különböző citrullintartalmú szintetikus peptiddel szemben

Szérumcsoport	Szérumok száma	IGP1155	IGP1156	IGP1157	IGP1158	IGP1249	Peptidok kombinációja
RA szérum	107	22 (20.6%)	31 (29.0%)	4 (3.7%)	26 (24.3%)	16 (15.0%)	51 (47.7%)
Fg-blet-pozitív	52	17 (32.6%)	24 (46.2%)	3 (5.8%)	21 (40.4%)	13 (25%)	40 (77.0%)
Fg-blet-negatív	55	5 (9.1%)	7 (12.7%)	1 (1.8%)	5 (9.1%)	3 (5.5%)	11 (20.0%)
APF pozitív	87	20 (23.0%)	29 (33%)	4 (4.6%)	24 (27.6%)	16 (18.4%)	49 (56.3%)
APF negatív	20	2 (10%)	2 (10.0%)	0	2 (10.0%)	0	2 (10.0%)
Kontrol szérumok							
Egészséges	51	1 (2.0%)	3 (5.9%)	1 (2.0%)	1 (2.0%)	1 (2.0%)	3 (5.9%)
SLE	61	1 (1.6%)	0	1 (1.6%)	0	22 (20.6%)	4 (6.6%)
Osteoarthritis	62	1 (1.6%)	1 (1.6%)	1 (1.6%)	0	1 (1.6%)	2 (3.2%)

> 5% szignifikancia

Fg-blot-pozitív: CI=63-87%

APF-pozitív: CI=45-67%

Fg-blot-negatív: CI=10-33%

APF-negatív: CI=1-32%

Valamennyi csoportban, az IGP1156- és IGP1158-peptidek bizonyultak a leginkább reaktív peptideknek, míg az IGP1157 minden esetben igen gyenge reaktivitást adott, és nem járult hozzá az RA-diagnózis szenzitivitásának növeléséhez.

Az RA-csoportba tartozó szérumok Western-blotton tapasztalt fillagrin-pozitivitása és a szintetikus peptidekkel szemben mutatott reaktivitása közti összefüggést a 3. táblázatban foglaltuk össze. Statisztikai analízis szerint, mérsékelt összefüggés volt kimutatható a két reaktivitási minta közt (kappa érték: 0,57; 95%CI: 0,41-0,73; egyezési koefficiens 78,5%).

Az IGP1155, IGP1156, IGP1157 és IGP1158 jelzésű citrullintartalmú peptidek esetében megfigyelt pozitív LIA-jelek nem voltak megfigyelhetőek a megfelelő módosítatlan párok - az IGP1179-, IGP1180-, IGP1181- és IGP1182-peptidek - tesztelésekor (3. ábra). Csak két olyan szérumot találtunk, amelyek gyenge színreakciót eredményeztek valamennyi módosítatlan peptid esetében, ami az adott szérumokkal kapcsolatos aspecifikus háttérfestődésnek tekinthető. Eredményeink azt igazolják, hogy a citrullin jelenléte feltétlenül szükséges az immun-reaktivitáshoz, és ez a ritka aminosav lényeges epitópot képez az anti-fillagrin-ellenanyagok számára.

3. táblázat

A Western-bloton tapasztalt anti-fillagrín-pozitivitás és 5 szintetikus peptiddel - az IGP1155-, IGP1156-, IGP1157-, IGP1158- és IGP1249-peptidekkel - szemben LIA-eljárásban mutatott reaktivitás közti összefüggés

RA-szérum		Peptidkombináció	
(N=107)		+	-
Fillagrín-blot	+	40	12
	-	11	44

3. példa

Szintetikus peptidek reaktivitása ELISA-eljárás szerint

3.1 ELISA

„Maxisorp” polisztirol lemezeket elektroeluált humán természetes fillagrinnal vontunk be 1 µg/ml vagy 4 µg/ml koncentrációjú oldat alkalmazásával, 50 mmol/l karbonát-pufferben (pH=9,6), egy éjszakán át, 4°C-on. A szérumokat 1/50 arányban, PBS-ben hígítottuk, és 100 µg/ml megfelelő peptid, 1 µg/ml vagy 10 µg/ml izolált természetes fillagrín (pozitív kontroll) vagy PBS (negatív kontroll) jelenlétében 2 órán át előinkubáltuk. A lemezeket 1 órán át, 37°C-on, 0,1% kazeint tartalmazó PBS-sel blokkoltuk, majd 2 órán át, 37°C-on a szérumokkal inkubáltuk. A lemezeket 0,05% Tween-20-detergenst tartalmazó PBS-sel ötször mostuk, majd anti-humán-IgG-HPR-konjugátummal inkubáltuk, amelyet előzőleg a

következőket tartalmazó PBS-pufferben hígítottunk: 0,1% ka-
zein és 0,1 mmol/l $K_3Fe(CN)_6$. A színreakciót az alábbi ösz-
szetételű pufferben, 1/100 arányban hígított tetrametil-
benzidinnel hívtuk elő: 0,1 mol/l Na_2HPO_4 ; 0,1 mol/l cit-
romsav; 0,006% H_2O_2 (pH=4,3). A reakciót 2 normál H_2SO_4 hoz-
záadásával állítottuk le, és a fényelnyelést (OD) 450 nm
hullámhosszon, Bio-tek ELISA-olvasóval mértük.

A gátlást százalékban fejeztük ki, és a következő kép-
let alapján számítottuk:

$$\frac{(OD \text{ gátlás nélkül} - OD \text{ gátlással}) \times 100}{OD \text{ gátlás nélkül}}$$

OD gátlás nélkül

3.2 Kísérleteinkben a következő eredményeket kaptuk

Öt, blottokon természetes fillagrinnal szemben erős
immunreaktivitást mutató APF-pozitív szérumot vizsgáltunk
fillagrinnal bevont lemezeken, fillagrin gátlóanyagként
történő hozzáadásával (4. ábra; 4. táblázat). Tíz (10)
 $\mu g/ml$ fillagrinnal történő előinkubálást követően a jel 64-
79%-kal csökkent, ami szignifikánsan nagyobb mértékű volt,
mint az 1 $\mu g/ml$ fillagrin alkalmazásakor tapasztalt csökke-
nés (4-45%). A fillagrinnal Western-blotton nem-reagáló
IG24 805 jelzésű APF-negatív szérum csak háttérjelet ered-
ményezett az ELISA-vizsgálatban, és annak alkalmazásával
szignifikáns gátlás nem volt kimutatható.

Amikor szintetikus citrullintartalmú peptidek -
IGP1155, 156, 1157, 1158 - egyikét vagy a négy peptid ele-
gyét alkalmaztuk kompetítorként - mindegyik peptidet

100 µg/ml koncentrációban - 4 szérumból 2 volt szignifikáns módon gátolható IGP1155-peptiddel, és 1 szérum IGP1158-peptiddel, amely eredmények megegyeztek a LIA-eredményekkel (5. ábra; 4. táblázat). A peptidek elegye 37-92%-ban volt képes gátolni a négy szérum anti-filagrin-ellenanyagainak kötődését, míg az APF-negatív szérum esetében gátlás nem volt megfigyelhető.

4. táblázat

Anti-fillagrin-reaktivitás gátlása citrullintartalmú szintetikus peptidek és természetes

fillagrin alkalmazásával

Szérum	APF- teszt	Anti- fillag- rin- blot	OD gátló- anyag nélkül	% gát- lás IGP1155	% gát- lás IGP1156	% gát- lás IGP1157	% gát- lás IGP1158	% gát- lás peptid- elegy- gyel	OD gátló- anyag nélkül	% gátlás fillagrinnal	
										1 µg/ml	10 µg/ml
35036	+	+	0.754	92%	19%	19%	24%	92%	0.887	38%	78%
35037	+	+	-	-	-	-	-	-	0.408	4%	66%
35038	+	+	0.335	32%	29%	13%	10%	45%	0.344	45%	74%
35044	+	+	-	-	-	-	-	-	1.957	18%	77%
35049	+	+	0.889	79%	4%	12%	72%	89%	-	-	-
35055	+	+	0.332	28%	22%	5%	23%	37%	0.318	18%	64%
24805	-	-	0.058	-93%	0%	0%	-2%	-12%	0.056	5%	5%

00000

4. példa

Humán fillagrín klónozása és expresszáltatása

Négy humán fillagrinszekvencia-jelöltet klónoztunk PCR-technológiával, humán limfocitákból izolált genomi DNS templátként történő alkalmazásával. A következő PCR-láncindítókat terveztük:

„Szensz” láncindító:

EcoRI

5'CC **GAA TTC** GCC ACC ATG GGG TCT TTC CTC TAC CAG GTG 3'

Met Gly Ser Phe Leu Tyr Gln Val

A PCR eljárásban alkalmazott „szensz” láncindítót úgy terveztük, hogy az átfedje a fillagrín linkerszekvenciát, és funkcionális kezdőkódon (Kozak-környezet) beiktatását eredményezze a linkerszekvenciától 5'-irányban (Phe Leu Tyr Gln Val Ser Thr). A linkerszekvenciát azért foglaltuk az amplifikált fillagrín ismétlődő egységbe, mivel az nagy valószínűséggel szerepet játszik az érett protein helyes célbajuttatásában. A PCR-fragmentum szubklónozásának megkönnyítésére a szekvenciához EcoRI restrikciós helyet adtunk.

A következő „antiszensz” PCR-láncindítót terveztük:

Thr Ser Gly His Ser Gly Ser Pro Gly His STOP

3' TGC AGA CCT GTA AGT CCT AGA **GGG CCC GAG ATC TGG** 5'

SmaI

XbaI

Az antiszensz láncindítót a következő fillagrín linkerszekvenciától közvetlenül 5'-irányban helyeztük el, és az TAG transzlációs stopkódon hozzáadását eredményezi a termékhez. Az amplifikált fillagrinszekvencia tehát a kö-

vetkezőket tartalmaz: fillagrinlinkert, belső fillagrin ismétlődő egységet, és az alkalmazott klónozó stratégia következményeképp beépült három további aminosavat (Pro/Gly/His). A PCR-amplifikált fragmentumokat EcoRI-XbaI-fragmentumként pBLSK-vektorba (Stratagene) klónoztuk, ezáltal lehetővé vált az amplifikált cDNS szekvenálása.

A szekvenálással jellemzett négy klónt HB2641-, HB2642-, HB2648- és HB2650-klónoknak neveztük (6. ábra). A cDNS-inszerteket EcoRV/EcII36II-fragmentumokként a pIGRHISA *E. coli* expressziós vektorba szubklónoztuk, amelyet előzőleg HsiI-enzimmal felnyitottunk, és tompa végűvé alakítottunk. A fillagrin proteineket HIS6-toldalékkal ellátott rekombináns fillagrin fúziós proteinekként expresszáltattuk három különböző *E. coli* törzsben, amelyekben magas szintű, Commassie-festékkel festhető expressziós szintet értünk el. A fúziós protein His6-toldalék lehetővé teszi a protein egyszerű tisztítását fém-affinitásos kromatográfiával.

5. példa

Vimentin alkalmazása reumatoid artritisz diagnózisának markereként

5.1 Antigén izolálása

Placentaextraktumokat Després és munkatársai eljárásával állítottunk elő (1994). -70°C-on tárolt placentaszöveteket homogenizáltunk a következő összetételű pufferben: 50 mmol/l Tris-HCl (pH=7,4); 120 mmol/l NaCl; 1,5 mmol/l DTT; 0,02% NaN₃; 1 mmol/l PMSF; valamint 5 µg/ml kimosztatin, leupeptin, antipain és pepstatin. Feltisztítást köve-

tően, a homogenizátumot DE52 ioncserélő kromatográfiának vetettük alá; a 200, 250 és 300 mmol/l sókoncentrációnál eluálódó frakciókat 1- és 2-dimenziós gélelektroforézissel tovább vizsgáltuk.

5.2 Kétdimenziós gélelektroforézis és blottolás

A különböző kromatográfiás frakciókban jelen lévő proteineket 2-dimenziós gélelektroforézissel szétválasztottuk. Mintákat az alábbi összetételű rehidráló pufferben oldottunk: 7 mol/l urea; 2 mol/l tiourea; 4% CHAPS; 0,5% Triton-X-100; 1% Pharmalytes 3-10; 10 mmol/l DTT; és 0,01% Orange G. Ötven-ötszáz (50-500) µg proteint vittünk fel IPG4-7 izoelektrofókuszáló csíkokra (Pharmacia) Rabilloud és munkatársai gélen belüli („in-gel”) rehidrációs eljárásával (1997). Az első dimenziós csíkokat a második dimenziós futtatáshoz 10%-os Laemmli-gélekre vagy „SDS Gradient 12-14 ExcelGel” (Pharmacia) gélekre vittük fel, ismert eljárások szerint. A géleket elektroblott-eljárással nitrocellulóz-membránokra vittük át, 2 óra alatt, 10% metanol, 10 mmol/l CAPS (pH=11,0) összetételű pufferben. Immunológiai kimutatást humán szérumokkal és monoklonális ellenanyaggal (mAb-val) végeztünk az 1.3 pontban ismertetettek szerint eljárva. Anti-vimentin mAb-t a Sigma cégtől szereztünk be, és azt 1/5000 hígításban alkalmaztuk. Az Affinity BioReagents Inc. (Golden, CO) cégtől hozzáférhető anti-kalretikulin poliklonális ellenanyagot (pAb-t) alkalmaztunk 1/1000 hígításban.

5.3 Proteinek azonosítása MS-analízissel

Coomassie-festett proteinfoltokat a kétdimenziós gélből kivágtunk, vízzel és 50% acetonitril / 1% TFA eleggyel mostunk, és 20 órán át, 37°C-on, 0,08 µg tripszinnel inkubáltuk 10µl térfogatú, következő összetételű elegyben: 25 mmol/l NH₄HCO₃; 10% acetonitril (pH=8,0). A peptideket 60% acetonitrilt és 0,1% TFA-t tartalmazó oldattal extraháltuk, vákuum alatt szárítottuk, és 10 µl térfogatú, következő összetételű eleggyel extraháltuk: 30% MeOH; 1% hangyasav. Az emésztett elegy körülbelül 5%-át DE-MALDI-RETOF-MS-analízisnek vetettük alá „Voyager-De STR” (Perseptive Biosystems, Framingham, MA) készüléken. A fennmaradó részt „PorosR2” alkalmazásával tisztítottuk; a kötődött peptideket 4µl, 60% MeOH / 1% hangyasav összetételű elegyben eluáltuk, ennek 65%-át ESI-MS-analízisnek vetettük alá „Q-TOF” tömegspektrométer (Micromass, UK) alkalmazásával.

5.4. Kísérleteinkben a következő eredményeket kaptuk

Huszonöt humán RA-szérumot, 3 oszteoartritiszben szenvedő betegből származó szérumot és 20 negatív kontroll-szérumot vizsgáltunk placentaextraktumokat tartalmazó 2-dimenziós blottokon. Igen feltűnő immunreaktivitást figyeltünk meg 14 RA-szérum esetében, többszörös foltos volt megfigyelhető +60 kDa molekula-tömegnél (a gélrendszer-től függően 56 és 61 kDa között), 4,5-4,8 pI-értékkel (7.A ábra). A kontrollok egyike sem mutatott reaktivitást ezekkel a proteinekkal. A blottokat anti-kalretikulin pAb-val, anti-PDI mAb-val és anti-vimentin ellenanyagokkal érintkeztettük a fenti főbb placentaproteinek azonosítására. A

kalretikulint egy 56-61 kDa molekulatömegű feltűnő foltként azonosítottuk (pI=4,3), míg a PDI 58-64 kDa molekulatömegnél volt megfigyelhető, 4,6-4,8 pI-értékkel; a 2-dimenziós blotton tehát mindkét folt helye megfelelt az elméletileg várt pozíciónak. Az utóbbi foltról tandem MS-analízissel tovább igazoltuk, hogy az PDI-nek felel meg.

Amint az a 7.B ábrán látható, az anti-vimentin mAb erős reaktivitást mutatott számos, 40 kDa és 61 kDa közé eső proteinnel. Ez a mintázat nagymértékben reprodukálhatónak bizonyult a tisztított termék különböző tételei esetében, még akkor is, ha azok különböző személyektől származtak, és különböző időpontokban lettek tesztelve. Amikor az RA-szérumokkal érintkeztetett blottokat az anti-vimentin blottokra helyeztük, nyilvánvalóvá vált, hogy az RA-specifikus reaktivitás pozíciója egybeesett a vimentin nagy molekulatömegű formájának helyével. A kérdéses foltokat MALDI-TOF-eljárással és tandem tömegspektrometriával tovább azonosítottuk. Mindkét technológiával, egyéb nem-azonosított peptideken felül, humán vimentinből, citokeratin-1- és citokeratin-9-proteinekből származó peptideket azonosítottunk. Ezek a proteinek valamennyien az intermedier rostproteinek családjába tartoznak. Mivel a vimentin és a citokeratinok citrullintartalmú formáiról már eddig is ismert volt, hogy *in vivo* előfordulnak [Senshu és munkatársai: (1992); Senshu és munkatársai: (1995); Senshu és munkatársai: (1996)], valószínű, hogy azok reumatoid artritiszben szenvedő betegek szérumában található autoantitestek specifikus célpontjai. Citrullintartalmú proteinekről kimutat-

ták, hogy azok a citrullint nem tartalmazó formákhoz képest mobilitáseltolódást eredményeznek SDS-PAGE-géleken a magasabb molekulatömegű régiók felé [Senshu és munkatársai: (1995); Tarcsa és munkatársai: (1996)], ami magyarázatul szolgálhat a humán szérumok szelektív immunreaktivitására a vimentin legmagasabb molekulatömegű formáival. Specifikus intermedier rostproteinformák tehát reumatológiai rendellenességek diagnóziására alkalmazhatók markerekként.

REFERENCIALISTA

- Arnett F.C., Edworthy S.M., Bloch D.A., McShane D.J., Fries J.F., Cooper N.S., Healy L.A., Kaplan S.R., Liang M.H., Luthra H.S., Medsger T.A., Mitchell D.M., Neustadt D.H., Pinals R.S., Schaller J.G., Sharp J.T., Wilder R.L., Hunder G.G. (1987) The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 31: 315-324
- Chen P.P., Fong S., Carson D.A. (1987) Rheumatoid factor. *Rheum. Dis. North Am.*, 13: 545-568
- Dale B.A., Holbrook K.A., Steinert P.M. (1978) Assembly of stratum corneum basic protein and keratin filaments in macrofibrils. *Nature*, 276: 729-731
- Després N., Boire G., Lopez-Longo F.J., Ménard H.A. (1994) The Sa system: a novel antigen-antibody system specific for rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.*, 21: 1027-1033
- Feltkamp T.E., Berthelot J.M., Boerbooms A.M., Geertzen H.G., Hoet R., De Keyser F. (1993) Interlaboratory variability of the antiperinuclear factor (APF) test for rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.*, 11: 57-59
- Gan S.Q., McBride O.W., Idler W.W., Markova N., Steinert P.M. (1990) Organization, structure, and polymorphisms of the human profilaggrin gene. *Biochemistry*, 29: 9432-9440
- Hajiroussou V.J., Skingle J., Gillett A.P., Webley M. (1985) Significance of antikeratin antibodies in rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.*, 12: 57-59
- Harding C.R., Scott I.R. (1983) Histidine-rich proteins (filaggrins): structural and functional heterogeneity during epidermal differentiation. *J. Mol. Biol.*, 170: 651-673
- Hassfeld W., Steiner G., Graninger W., Witzmann G., Schweitzer H., Smolen J.S. (1993) Autoantibodies to the nuclear antigen RA33: a marker for early rheumatoid arthritis. *Br. J. Rheumatol.*, 32: 199-203
- Janssens X., Veys E.M., Verbruggen G., Declercq L. (1988) The diagnostic significance of the antiperinuclear factor for rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.*, 15: 1364-1350

- Johnson G.D., Carvalho A., Holborow E.J., Goddard D.H., Russell G. (1981)** Antiperinuclear factor and antikeratin antibodies in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, 40: 263-266
- Kataaha P.K., Mortazavi-Milani S.M., Russell G., Holborow E.J. (1985)** Anti-intermediate filament antibodies, antikeratin antibodies, and perinuclear factor in rheumatoid arthritis and infectious mononucleosis. *Ann. Rheum. Dis.*, 44: 446-449
- Kirstein H., Hjarvard K., Moerk Hansen T. (1989)** Antikeratin antibodies in synovial fluid in rheumatoid arthritis. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, 97: 185-189
- Köningsberg W.H., Henderson L. (1983)** Removal of Sodium Dodecyl Sulfate from proteins by ion-pair extraction. *Meth. Enzymol.*, 91: 254-259
- Lynley A.M., Dale B.A. (1983)** The characterization of human epidermal filaggrin, a histidine-rich, keratin filament-aggregating protein. *Biochem. Biophys. Acta*, 744: 28-35
- Mack J.W., Steven A.C., Steinert P.M. (1993)** The mechanism of interaction of filaggrin with intermediate filaments. *J. Mol. Biol.*, 232: 50-66
- Maniatis T., Fritsch E., Sambrook J. (1982)** Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Markova N.G., Marekov L.N., Chipev C.C., Gan S.-Q., Idler W.W., Steinert P.M. (1993)** Profilaggrin is a major epidermal calcium-binding protein. *Mol. Cell. Biol.*, 13: 613-625
- McKinley-Grant L.J., Idler W.W., Bernstein I.A., Parry D.A.D., Cannizzaro L., Croce C.M., Huebner K., Lessin S.R., Steinert P.M. (1989)** Characterization of a cDNA clone encoding human filaggrin and localization of the gene to chromosome region 1q21. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 4848-4852
- Miossec P., Youinou P., Le Goff P., Moineau M.P. (1982)** Clinical relevance of antikeratin antibodies in rheumatoid arthritis. *Clin. Rheumatol.*, 1: 185-189
- Nesher G., Moore T.L., Gristani M.W., El-Najdawi E., Osborn T.G. (1992)** Antiperinuclear factor in juvenile rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, 51: 350-352

- Nienhuis R.L.F., Mandema E. (1964) A new serum factor in patients with rheumatoid arthritis. The antiperinuclear factor. *Ann. Rheum. Dis.*, 23: 302-305
- Peterson G.L. (1983) Determination of total protein. *Meth. Enzymol.*, 91: 95-119
- Presland R.B., Haydock P.V., Fleckman P., Nirunsuksiri W., Dale B.A. (1992) Genomic organization and identification of an S-100-like calcium binding domain at the amino terminus. *J. Biol. Chem.*, 267: 23772-23781
- Rabilloud T., Adessi C., Giraudel A., Lunardi J. (1997) Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, 18: 307-316
- Resing K.A., Walsh K.A., Haugen-Scofield J., Dale B.A. (1989) Identification of proteolytic cleavage sites in the conversion of profilaggrin to filaggrin in mammalian epidermis. *J. Biol. Chem.*, 264: 1837-1845
- Resing K.A., Johnson R.S., Walsh K.A. (1993) Characterization of protease sites during conversion of rat profilaggrin to filaggrin. *Biochemistry*, 32: 10036-10045
- Scott I.R., Harding C.R., Barrett J.G. (1982) Histidine-rich protein of the keratohyalin granules. Source of the free amino acids, urocanic acid and pyrrolidone carboxylic acid in the stratum corneum. *Biochem. Biophys. Acta*, 719: 110-117
- Sebbag M., Simon M., Vincent C., Masson-Bessière C., Girbal E., Durieux J.-J., Serre G. (1995) The antiperinuclear factor and the so-called antikeratin antibodies are the same rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J. Clin. Invest.*, 95: 2672-2679
- Senshu T., Sato T., Inoue T., Akiyama K., Asaga H. (1992) Detection of citrulline residues in deiminated proteins on polyvinylidene difluoride membrane. *Anal. Biochem.*, 203: 94-100
- Senshu T., Akiyama K., Kan S., Asaga H., Ishigami A., Manabe M. (1995) Detection of deiminated proteins in rat skin: probing with a monospecific antibody after modification of citrulline residues. *J. Invest. Dermatol.*, 105: 163-169

- Senshu T., Kan S., Ogawa H., Manabe M., Asaga H. (1996)** Preferential deimination of keratin K1 and filaggrin during the terminal differentiation of human epidermis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 225: 712-719
- Simon M., Girbal E., Sebbag M., Gomès-Daudrix V., Vincent C., Salama G., Serre G. (1993)** The cytokeratin filament-aggregating protein filaggrin is the target of the so-called 'antikeratin antibodies', autoantibodies specific for rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.*, 92: 1387-1393
- Simon M., Vincent C., Haftek M., Girbal E., Sebbag M., Gomès-Daudrix V., Serre G. (1995)** The rheumatoid arthritis-associated autoantibodies to filaggrin label the fibrous matrix of the cornified cells but not the profilaggrin-containing keratohyalin granules in human epidermis. *Clin. Exp. Immunol.*, 100: 90-98
- Tarcsa E., Marekov L., Mei G., Melino G., Lee S.-C., Steinert P. (1996)** Protein unfolding by peptidylarginine deiminase. Substrate specificity and structural relationships of the natural substrates trichohyalin and filaggrin. *J. Biol. Chem.*, 271: 30709-30716
- Vincent C., Serre G., Lapeyre F., Fournié B., Ayrolles C., Fournié A., Soleilhavoup J.-P. (1989)** High diagnostic value in rheumatoid arthritis of antibodies to the stratum corneum of rat oesophagus epithelium, so-called 'antikeratin antibodies'. 1989. *Ann. Rheum. Dis.*, 48: 712-722
- Vincent C., Serre G., Basile J.-P., Lestra H.C., Girbal E., Sebbag M., Soleilhavoup J.-P. (1990)** Subclass distribution of IgG antibodies to the rat oesophagus stratum corneum (so-called anti-keratin antibodies) in rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Immunol.*, 81: 83-89
- Vincent C., De Keyser F., Veys E.M., Serre G. (1997)** Comparative study of APF, AKA and anti-filaggrin autoantibodies in rheumatoid arthritis and other arthritides. *Ann. Med. Interne*, 148: 52
- Vivino F.B., Maul G. G. (1989)** Antiperinuclear factor prevalence for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 32: S95
- Vivino F.B., Maul G.G. (1990)** Histologic and electron microscopic characterization of the antiperinuclear factor antigen. *Arthritis Rheum.*, 33: 960-969

Waller M.V., Toone E.C., Vaughan E. (1964) Study of rheumatoid factor in a normal population. *Arthr. Rheum.*, 7: 513-520

Westgeest A.A.A., Boerbooms A.M.Th., Jongmans M., Vandenbroucke J.P., Vierwinden G., van de Putte L.B.A. (1987) Antiperinuclear factor: Indicator of more severe disease in seronegative rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.*, 14: 893-897

Youinou P., Le Goff P., Colaco C.B., Thivolet J., Tater D., Viac J., Shipley M. (1985) Antikeratin antibodies in serum and synovial fluid show specificity for rheumatoid arthritis in a study of connective tissue diseases. *Ann. Rheum. Dis.*, 44: 450-454

Youinou P., Berthelot J.M., Peron A., Leroux A.M., Le Goff P. (1992) Antiperinuclear antibodies and corresponding antigens. *Rev. Rhum. Mal. Osteoartic.*, 59: 43S-51S

Young B.J.J., Mallya R.K., Leslie R.D.G., Clark C.J.M., Hamblin T.J. (1979) Anti-keratin antibodies in rheumatoid arthritis. *Br. Med. J.*, 2: 97-99

09121

SZEKVENCIALISTA

<210> 1
<211> 18
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

His Ser Ala Ser Gln Asp Gly Gln Asp Thr Ile Arg Gly His Pro Gly
1 5 10 15

Ser Ser

<210> 2
<211> 22
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

His Ser Gly Ile Gly His Gly Gln Ala Ser Ser Ala Val Arg Asp Ser
1 5 10 15

Gly His Arg Gly Tyr Ser
20

<210> 3
<211> 18
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

Asp Ser Gly His Arg Gly Tyr Ser Gly Ser Gln Ala Ser Asp Asn Glu
1 5 10 15

Gly His

<210> 4
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

His Ser Thr Ser Gln Glu Gly Gln Asp Thr Ile His Gly His Arg Gly
1 5 10 15

Ser

<210> 5
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

3921

Gly Gly Gln Gly Ser Arg His Gln Gln Ala Arg
1 5 10

<210> 6
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

Gln Gly Ser Arg His Gln Gln Ala Arg Asp Ser Ser Arg His Ser Thr
1 5 10 15

Ser Gln Glu Gly Gln Asp Thr Ile His Gly His Arg Gly Ser
20 25 30

<210> 7
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7

Gln Gly Ser Arg His Gln Gln Ala Arg Asp Ser Ser Arg His Ser Ala
1 5 10 15

Ser Gln Asp Gly Gln Asp Thr Ile Arg Gly His Pro Gly Ser Ser
20 25 30

<210> 8
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

His Ser Gly Ile Gly His Gly Gln Ala Ser Ser Ala Val Arg Asp Ser
1 5 10 15

Gly His Arg Gly Tyr Ser Gly Ser Gln Ala Ser Asp Asn Glu Gly His
20 25 30

<210> 9
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9

Arg Ala Gly His Gly His Ser Ala Asp Ser Ser Arg
1 5 10

<210> 10
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES

09121

<222> (5)

<223> Az Xaa citrullint jelöl

<400> 10

Arg Gln Gly Ser Xaa His Gln Gln Ala Arg
1 5 10

<210> 11

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Arg His Gly Ser His His Gln Gln Ser Ala Asp Ser Ser Arg
1 5 10

<210> 12

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Arg His Ser Gln Val Gly Gln Gly Glu Ser Ser Gly Pro Arg
1 5 10

<210> 13

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

<222> (13)

<223> Az Xaa citrullint jelöl

<400> 13

Arg His Ser Ala Ser Gln Asp Gly Gln Asp Thr Ile Xaa Gly His Pro
1 5 10 15

Gly

<210> 14

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

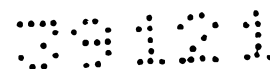
<221> MOD_RES

<222> (13)

<223> Az Xaa citrullint jelöl

<400> 14

Arg His Ser Ala Ser Gln Asp Gly Gln Asp Thr Ile Xaa Gly His
1 5 10 15



<210> 15
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 15

Arg His Ser Gly Ile Gly His Gly Gln Ala Ser Ser Ala Val Arg
 1 5 10 15

<210> 16
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 16

Arg His Ser Ala Ser Gln Asp Gly Gln Asp Thr Ile
 1 5 10

<210> 17
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)
 <223> Az Xaa citrullint jelöl

<400> 17

Arg Asp Ser Gly His Xaa Gly Tyr Ser Gly Ser Gln Ala Ser Asp Asn
 1 5 10 15

Glu Gly His

<210> 18
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (16)
 <223> Az Xaa citrullint jelöl

<400> 18

Arg His Ser Thr Ser Gln Glu Gly Gln Asp Thr Ile His Gly His Xaa
 1 5 10 15

Gly Ser

<210> 19
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 19

39121

Arg Gly Tyr Ser Gly Ser Gln Ala Ser Asp Asn Glu Gly His Ser Glu
1 5 10 15

<210> 20
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20

Arg Asn Asp Glu Gln Ser Gly Asp Gly Ser Arg
1 5 10

<210> 21
<211> 18
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)
<223> Az Xaa citrullint jelöl

<400> 21

His Ser Ala Ser Gln Asp Gly Gln Asp Thr Ile Xaa Gly His Pro Gly
1 5 10 15

Ser Ser

<210> 22
<211> 22
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (19)
<223> Az Xaa citrullint jelöl

<400> 22

His Ser Gly Ile Gly His Gly Gln Ala Ser Ser Ala Val Arg Asp Ser
1 5 10 15

Gly His Xaa Gly Tyr Ser
20

<210> 23
<211> 18
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)
<223> Az Xaa citrullint jelöl

<400> 23

<210> 28
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 28

Gly Gly Asn Asp Glu Gln Ser Gly Asp Gly Ser Arg His Ser Gly Ser
1 5 10 15

<210> 29
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 29

Ser Arg His Ser Gln Val Gly Gln Gly Glu Ser Ser Gly Pro Arg
1 5 10 15

<210> 30
<211> 36
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 30

gaattcgcca ccatgggggtc tttcctctac caggtg 36

<210> 31
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 31

Met Gly Ser Phe Leu Tyr Gln Val
1 5

<210> 32
<211> 36
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 32

tgcagacctg taagtcctag agggcccgag atctgg 36

<210> 33
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 33
Thr Ser Gly His Ser Gly Ser Pro Gly His
1 5 10

<210> 34
<211> 18
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

<222> (12)

<223> Az Xaa citrullin aminosavgyököt jelöl

<400> 34

His Ser Ala Ser Gln Asp Gly Gln Asp Thr Ile Xaa Gly His Pro Gly
1 5 10 15

Ser Ser

<210> 35

<211> 22

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

<222> (19)

<223> Az Xaa citrullin aminosavgyököt jelöl

<400> 35

His Ser Gly Ile Gly His Gly Gln Ala Ser Ser Ala Val Arg Asp Ser
1 5 10 15

Gly His Xaa Gly Tyr Ser
20

<210> 36

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)

<223> Az Xaa citrullin aminosavgyököt jelöl

<400> 36

Asp Ser Gly His Xaa Gly Tyr Ser Gly Ser Gln Ala Ser Asp Asn Glu
1 5 10 15

Gly His

<210> 37

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

<222> (15)

<223> Az Xaa citrullin aminosavgyököt jelöl

<400> 37

His Ser Thr Ser Gln Glu Gly Gln Asp Thr Ile His Gly His Xaa Gly
1 5 10 15

Ser

<210> 38

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

<222> (6)

<223> Az Xaa citrullin aminosavgyököt jelöl

<400> 38

Gly Gly Gln Gly Ser Xaa His Gln Gln Ala Arg
1 5 10

<210> 39

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4)

<223> Az Xaa citrullin aminosavgyököt jelöl

<400> 39

Gln Gly Ser Xaa His Gln Gln Ala Arg Asp Ser Ser Arg His Ser Thr
1 5 10 15

Ser Gln Glu Gly Gln Asp Thr Ile His Gly His Xaa Gly Ser
20 25 30

<210> 40

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4)

<223> Az Xaa citrullin aminosavgyököt jelöl

<220>

<221> MOD_RES

<222> (25)

<223> Az Xaa citrullin aminosavgyököt jelöl

<400> 40

Gln Gly Ser Xaa His Gln Gln Ala Arg Asp Ser Ser Arg His Ser Ala
1 5 10 15

Ser Gln Asp Gly Gln Asp Thr Ile Xaa Gly His Pro Gly Ser Ser
20 25 30

<210> 41
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD RES
<222> (19)
<223> Az Xaa citrullin aminosavgyököt jelöl

<400> 41

His Ser Gly Ile Gly His Gly Gln Ala Ser Ser Ala Val Arg Asp Ser
1 5 10 15

Gly His Xaa Gly Tyr Ser Gly Ser Gln Ala Ser Asp Asn Glu Gly His
20 25 30

<210> 42
<211> 1006
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 42

```
gaattcgcca ccatggggtc tttcctctac caggtgagca ctcatgaaca gtctgagtcc 60
gcccatggac ggaccgggac cagcactgga ggaagacaag gatcccacca cgagcaggca 120
cgagacagct ccaggcactc aacgtcccaa gagggtcagg acaccattca tggacaccgg 180
gggtcaagca gtggaggaag gcagggatcc cactacgagc aatcggtaga tagatctgga 240
cactcagggc ctcatcacag ccacaccaca tcccagggaa ggtctgatgc ctcccatggg 300
cagtcaggat ccagaagtgc aagcagacaa actcgtaacg atgaacaatc aggagacggc 360
tccaggcact cagggtcgcg tcaccatgaa gcttcctctc gggccgacag ctctagacac 420
tcgcaggtgg gccagggaca atcagagggg cccaggacaa gcaggaactg gggatccagt 480
tttagccagg acagtgacag tgagggacat tcagaagact ctgagaggtg gtctgggtct 540
gcttcagaa accatcatgg atctgctcag gagcagctaa gagatggctc cagacacccc 600
aggtcccatc aagaagacag agctggtcat gggcactctg cagacagctc cagacaatca 660
ggcactcgtc acacacagac ttcctctggt ggacaggctg catcatcca tgaacaggca 720
agatcaagtg caggagaaag acatggatcc caccaccagc agtcagcaga cagctccaga 780
cactcaggca ttgggcacgg acaagcttca tctgcagtca gagacagtgg acaccgaggg 840
tacagtggta gtcaggccag tgacaatgag ggacattcag aagactcaga cacacagtca 900
gtgtcagccc acggacaggc tgggtcccat cagcagtgcc accaagagtc cgcacgtggc 960
cggtcagggg aaacgtctgg acattcagga tctcccgggc tctaga 1006
```

<210> 43
<211> 330
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 43

Met Gly Ser Phe Leu Tyr Gln Val Ser Thr His Glu Gln Ser Glu Ser
1 5 10 15

Ala His Gly Arg Thr Gly Thr Ser Thr Gly Gly Arg Gln Gly Ser His
20 25 30

His Glu Gln Ala Arg Asp Ser Ser Arg His Ser Thr Ser Gln Glu Gly
35 40 45

Gln Asp Thr Ile His Gly His Arg Gly Ser Ser Ser Gly Gly Arg Gln
50 55 60

39101

Gly Ser His Tyr Glu Gln Ser Val Asp Arg Ser Gly His Ser Gly Ser
65 70 75 80

His His Ser His Thr Thr Ser Gln Gly Arg Ser Asp Ala Ser His Gly
85 90 95

Gln Ser Gly Ser Arg Ser Ala Ser Arg Gln Thr Arg Asn Asp Glu Gln
100 105 110

Ser Gly Asp Gly Ser Arg His Ser Gly Ser Arg His His Glu Ala Ser
115 120 125

Ser Arg Ala Asp Ser Ser Arg His Ser Gln Val Gly Gln Gly Gln Ser
130 135 140

Glu Gly Pro Arg Thr Ser Arg Asn Trp Gly Ser Ser Phe Ser Gln Asp
145 150 155 160

Ser Asp Ser Glu Gly His Ser Glu Asp Ser Glu Arg Trp Ser Gly Ser
165 170 175

Ala Ser Arg Asn His His Gly Ser Ala Gln Glu Gln Leu Arg Asp Gly
180 185 190

Ser Arg His Pro Arg Ser His Gln Glu Asp Arg Ala Gly His Gly His
195 200 205

Ser Ala Asp Ser Ser Arg Gln Ser Gly Thr Arg His Thr Gln Thr Ser
210 215 220

Ser Gly Gly Gln Ala Ala Ser Ser His Glu Gln Ala Arg Ser Ser Ala
225 230 235 240

Gly Glu Arg His Gly Ser His His Gln Gln Ser Ala Asp Ser Ser Arg
245 250 255

His Ser Gly Ile Gly His Gly Gln Ala Ser Ser Ala Val Arg Asp Ser
260 265 270

Gly His Arg Gly Tyr Ser Gly Ser Gln Ala Ser Asp Asn Glu Gly His
275 280 285

Ser Glu Asp Ser Asp Thr Gln Ser Val Ser Ala His Gly Gln Ala Gly
290 295 300

Ser His Gln Gln Cys His Gln Glu Ser Ala Arg Gly Arg Ser Gly Glu
305 310 315 320

Thr Ser Gly His Ser Gly Ser Pro Gly Leu
325 330

<210> 44
<211> 1006
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 44

gaattcgcca ccattggggtc tttcctctac caggtgagca ctcatgaaca gtctgagtcc 60
gcccattggac ggaccgggac cagcactgga ggaagacaag gatcccacca cgagcaggca 120
cgagacagct ccaggcactc aacgtcccaa gagggtcagg acaccattca tggacaccgg 180
gggtcaagca gtggaggaag gcagggatcc cactacgagc aatcggtaga tagatctgga 240
cactcagggt ctcatcacag ccacaccaca tcccaggga ggtctgatgc ctcccatggg 300

```

cagtcaggat ccagaagtgc aagcagacaa actcgtaacg atgaacaatc aggagacggc 360
tccaggcact cagggtcgcg ccaccatgaa gcttcctctc gggccgacag ctctagacac 420
tcgcagggtg gccagggaca atcagagggg cccaggacaa gcagggaactg gggatccagt 480
tttagccagg acagtgcacg tgaggggacat tcagaagact ctgagagggtg gtctgggtct 540
gcttcacgaa accatcatgg atctgctcag gagcagctaa gagatggctc cagacacccc 600
aggtcccatc aagaaggcag agctgggtcat gggcactctg cagacagctc cagacaatca 660
ggcactcgtc acacacagac ttctctctgt ggacaggctg catcatccca tgaacgggca 720
agatcaagtg caggagaaaag acatggatcc caccaccagc agtcagcaga cagctccaga 780
cactcaggca ttgggcacgg acaagcttca tctgcagtca gagacagtgg acaccgaggg 840
tacagtggta gtcaggccag tgacaatgag ggacattcag aagactcaga cacacagtca 900
gtgtcagccc acggacaggc tgggtcccat cagcagagcc accaagagtc cgcacgtggc 960
cggtcagggg aaacgtctgg acattcagga tctcccgggc tctaga 1006

```

<210> 45
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 45

```

Met Gly Ser Phe Leu Tyr Gln Val Ser Thr His Glu Gln Ser Glu Ser
  1              5              10              15

Ala His Gly Arg Thr Gly Thr Ser Thr Gly Gly Arg Gln Gly Ser His
              20              25              30

His Glu Gln Ala Arg Asp Ser Ser Arg His Ser Thr Ser Gln Glu Gly
              35              40              45

Gln Asp Thr Ile His Gly His Arg Gly Ser Ser Ser Gly Gly Arg Gln
  50              55              60

Gly Ser His Tyr Glu Gln Ser Val Asp Arg Ser Gly His Ser Gly Ser
  65              70              75              80

His His Ser His Thr Thr Ser Gln Gly Arg Ser Asp Ala Ser His Gly
              85              90              95

Gln Ser Gly Ser Arg Ser Ala Ser Arg Gln Thr Arg Asn Asp Glu Gln
              100              105              110

Ser Gly Asp Gly Ser Arg His Ser Gly Ser Arg His His Glu Ala Ser
              115              120              125

Ser Arg Ala Asp Ser Ser Arg His Ser Gln Val Gly Gln Gly Gln Ser
              130              135              140

Glu Gly Pro Arg Thr Ser Arg Asn Trp Gly Ser Ser Phe Ser Gln Asp
  145              150              155              160

Ser Asp Ser Glu Gly His Ser Glu Asp Ser Glu Arg Trp Ser Gly Ser
              165              170              175

Ala Ser Arg Asn His His Gly Ser Ala Gln Glu Gln Leu Arg Asp Gly
              180              185              190

Ser Arg His Pro Arg Ser His Gln Glu Gly Arg Ala Gly His Gly His
              195              200              205

Ser Ala Asp Ser Ser Arg Gln Ser Gly Thr Arg His Thr Gln Thr Ser
              210              215              220

Ser Gly Gly Gln Ala Ala Ser Ser His Glu Arg Ala Arg Ser Ser Ala

```

225		230		235		240
Gly Glu Arg His	Gly Ser His His	Gln Gln Ser	Ala Asp Ser	Ser Ser Arg		
	245		250		255	
His Ser Gly Ile	Gly His Gly Gln	Ala Ser Ser	Ala Val Arg	Asp Ser		
	260		265		270	
Gly His Arg Gly	Tyr Ser Gly Ser	Gln Ala Ser	Asp Asn Glu	Gly His		
	275		280		285	
Ser Glu Asp Ser	Asp Thr Gln Ser	Val Ser Ala	His Gly Gln	Ala Gly		
	290		295		300	
Ser His Gln Gln	Ser His Gln Glu	Ser Ala Arg	Gly Arg Ser	Gly Glu		
	305		310		315	
Thr Ser Gly His	Ser Gly Ser Pro	Gly Leu				
	325		330			

<210> 46
 <211> 1006
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 46

```

gaattcgcca ccatggggtc tttcctctac caggtgggca ctcatgaaca gtctgagtcc 60
gcccatggac ggaccgggac cagcactgga ggaagacaag gatcccacca cgagcaggca 120
cgagacagct ccaggcactc aacgtcccaa gagggtcagg acaccattca tggacaccgg 180
gggtcaagca gtggaggaag gcagggatcc cactacgagc aatcggtaga tagatctgga 240
cactcagggt ctcatcacag ccacaccaca tcccagggaa ggtctgatgc ctcccatggg 300
cagtcaggat ccagaagtgc aagcagacaa actcgtaacg atgaacaatc aggagacggc 360
tccaggcact cagggtcgcg tcaccatgaa gcttcctctc gggccgacag ctctagacac 420
tcacaggcag tccagggaca atcagagggg ccaggacaa gcaggaactg gggatccagt 480
tttagccagg acagtgcag tgagggacat tcagaagact ctgagaggtg gtctgggtct 540
gcttcagaa accatcatgg atctgctcag gagcagctaa gagatggctc cagacacccc 600
aggtcccatc aagaagacag agctgggtcat gggcactctg cagacagctc cagacaatca 660
ggcactcgtc acacacagac ttctctgtgt ggacaggctg catcatccca tgaacaggca 720
agatcaagtg caggagaaag acatggatcc caccaccagc agtcagcaga cagctccaga 780
cactcaggca ttgggcacgg acaagcttca tctgcagtca gagacagtgg acaccgaggg 840
tacagtggta gtcaggccag tgacaatgag ggacattcag aagactcaga cacacagtca 900
gtgtcagccc acggacaggc tgggtcccat cagcagagcc accaagagtc cgcacgtggc 960
cggtcagggg aaacgtcttg acattcagga tctcccgggc tctaga 1006
  
```

<210> 47
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 47

Met Gly Ser Phe	Leu Tyr Gln Val	Gly Thr His Glu	Gln Ser Glu Ser
1	5	10	15
Ala His Gly Arg	Thr Gly Thr Ser	Thr Gly Gly Arg	Gln Gly Ser His
	20	25	30
His Glu Gln Ala	Arg Asp Ser Ser	Arg His Ser Thr	Ser Gln Glu Gly
	35	40	45
Gln Asp Thr Ile	His Gly His Arg	Gly Ser Ser Ser	Gly Gly Arg Gln

50 55 60

Gly Ser His Tyr Glu Gln Ser Val Asp Arg Ser Gly His Ser Gly Ser
65 70 75 80

His His Ser His Thr Thr Ser Gln Gly Arg Ser Asp Ala Ser His Gly
85 90 95

Gln Ser Gly Ser Arg Ser Ala Ser Arg Gln Thr Arg Asn Asp Glu Gln
100 105 110

Ser Gly Asp Gly Ser Arg His Ser Gly Ser Arg His His Glu Ala Ser
115 120 125

Ser Arg Ala Asp Ser Ser Arg His Ser Gln Ala Val Gln Gly Gln Ser
130 135 140

Glu Gly Pro Arg Thr Ser Arg Asn Trp Gly Ser Ser Phe Ser Gln Asp
145 150 155 160

Ser Asp Ser Glu Gly His Ser Glu Asp Ser Glu Arg Trp Ser Gly Ser
165 170 175

Ala Ser Arg Asn His His Gly Ser Ala Gln Glu Gln Leu Arg Asp Gly
180 185 190

Ser Arg His Pro Arg Ser His Gln Glu Asp Arg Ala Gly His Gly His
195 200 205

Ser Ala Asp Ser Ser Arg Gln Ser Gly Thr Arg His Thr Gln Thr Ser
210 215 220

Ser Gly Gly Gln Ala Ala Ser Ser His Glu Gln Ala Arg Ser Ser Ala
225 230 235 240

Gly Glu Arg His Gly Ser His His Gln Gln Ser Ala Asp Ser Ser Arg
245 250 255

His Ser Gly Ile Gly His Gly Gln Ala Ser Ser Ala Val Arg Asp Ser
260 265 270

Gly His Arg Gly Tyr Ser Gly Ser Gln Ala Ser Asp Asn Glu Gly His
275 280 285

Ser Glu Asp Ser Asp Thr Gln Ser Val Ser Ala His Gly Gln Ala Gly
290 295 300

Ser His Gln Gln Ser His Gln Glu Ser Ala Arg Gly Arg Ser Gly Glu
305 310 315 320

Thr Ser Gly His Ser Gly Ser Pro Gly Leu
325 330

<210> 48
<211> 1006
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 48

gaattcgcca ccatgggggtc tttcctctac caggtgagca ctcatgaaca gtctgagtc 60
tcccatggat ggacggggcc cagcactaga ggaagacaag gatcccgcca tgagcaggca 120
caagacagct ccaggcactc agcatcccaa gacgggtcagg acaccattcg tggacacccg 180

```

gggtcaagca gaggaggaag gcagggatcc cactacgagc aatcggtaga tagatctgga 240
cactcagggt ctcatcacag ccacaccaca tcccagggaa ggtctgatgc ctcccatggg 300
cactcaggat ccagaagtgc aagcagacaa actcgtaacg atgaacaatc aggagacggc 360
tccaggcact cagggtcgcg tcacatgaa gcttcctctc gggccgacag ctctagacac 420
tcgcagggtg gccaggaaca atcagagggg cccaggacaa gcaggaactg gggatccagt 480
tttagccagg acagtgcagc tcagggacac tcagaagact ctgagagggt gtctgggtct 540
gcttcagaa accatcatgg atctgctcag gaggagctaa gagatggctc cagacacccc 600
aggtcccatc aagaagacag agctgggtcat gggcactctg cagacagctc cagacaatca 660
ggcactcgtc acacacagac ttcctctggg ggacaggctg catcatccca tgaacaggca 720
agatcaagtg caggagaaaag acatggatcc caccaccagc agtcagcaga cagctccaga 780
cactcaggca ttgggcacgg acaagcttca tctgcagtca gagacagtgg acaccgaggg 840
tacagtggta gtcaggccag tgacaatgag ggacattcag aagactcaga cacacagtca 900
gtgtcagccc acggacaggc tgggtcccat cagcagagcc accaagatc cgcacgtggc 960
cggtcagggg aaacgtctgg acattcagga tctcccgggc tctaga 1006

```

<210> 49
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 49

```

Met Gly Ser Phe Leu Tyr Gln Val Ser Thr His Glu Gln Ser Glu Ser
 1              5              10              15

Ser His Gly Trp Thr Gly Pro Ser Thr Arg Gly Arg Gln Gly Ser Arg
          20              25              30

His Glu Gln Ala Gln Asp Ser Ser Arg His Ser Ala Ser Gln Asp Gly
          35              40              45

Gln Asp Thr Ile Arg Gly His Pro Gly Ser Ser Arg Gly Gly Arg Gln
          50              55              60

Gly Ser His Tyr Glu Gln Ser Val Asp Arg Ser Gly His Ser Gly Ser
          65              70              75              80

His His Ser His Thr Thr Ser Gln Gly Arg Ser Asp Ala Ser His Gly
          85              90              95

His Ser Gly Ser Arg Ser Ala Ser Arg Gln Thr Arg Asn Asp Glu Gln
          100             105             110

Ser Gly Asp Gly Ser Arg His Ser Gly Ser Arg His His Glu Ala Ser
          115             120             125

Ser Arg Ala Asp Ser Ser Arg His Ser Gln Val Gly Gln Glu Gln Ser
          130             135             140

Glu Gly Pro Arg Thr Ser Arg Asn Trp Gly Ser Ser Phe Ser Gln Asp
          145             150             155             160

Ser Asp Ser Gln Gly His Ser Glu Asp Ser Glu Arg Trp Ser Gly Ser
          165             170             175

Ala Ser Arg Asn His His Gly Ser Ala Gln Glu Gln Leu Arg Asp Gly
          180             185             190

Ser Arg His Pro Arg Ser His Gln Glu Asp Arg Ala Gly His Gly His
          195             200             205

Ser Ala Asp Ser Ser Arg Gln Ser Gly Thr Arg His Thr Gln Thr Ser
          210             215             220

```

Ser Gly Gly Gln Ala Ala Ser Ser His Glu Gln Ala Arg Ser Ser Ala
225 230 235 240

Gly Glu Arg His Gly Ser His His Gln Gln Ser Ala Asp Ser Ser Arg
245 250 255

His Ser Gly Ile Gly His Gly Gln Ala Ser Ser Ala Val Arg Asp Ser
260 265 270

Gly His Arg Gly Tyr Ser Gly Ser Gln Ala Ser Asp Asn Glu Gly His
275 280 285

Ser Glu Asp Ser Asp Thr Gln Ser Val Ser Ala His Gly Gln Ala Gly
290 295 300

Ser His Gln Gln Ser His Gln Glu Ser Ala Arg Gly Arg Ser Gly Glu
305 310 315 320

Thr Ser Gly His Ser Gly Ser Pro Gly Leu
325 330

tctgg 36

<210> 33
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 33

Thr Ser Gly His Ser Gly Ser Pro Gly His
1 5 10

<210> 34
<211> 18
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)
<223> Az Xaa citrullin aminosavgyököt jelöl

<400> 34

His Ser Ala Ser Gln Asp Gly Gln Asp Thr Ile Xaa Gly His Pro Gly
1 5 10 15

Ser Ser

<210> 35
<211> 22
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (19)
<223> Az Xaa citrullin aminosavgyököt jelöl

<400> 35

His Ser Gly Ile Gly His Gly Gln Ala Ser Ser Ala Val Arg Asp Ser
1 5 10 15

Gly His Xaa Gly Tyr Ser
20

<210> 36

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)

<223> Az Xaa citrullin aminosavgyököt jelöl

<400> 36

Asp Ser Gly His Xaa Gly Tyr Ser Gly Ser Gln Ala Ser Asp Asn Glu
1 5 10 15

Gly His

<210> 37

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

<222> (15)

<223> Az Xaa citrullin aminosavgyököt jelöl

<400> 37

His Ser Thr Ser Gln Glu Gly Gln Asp Thr Ile His Gly His Xaa Gly
1 5 10 15

Ser

<210> 38

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

<222> (6)

<223> Az Xaa citrullin aminosavgyököt jelöl

<400> 38

Gly Gly Gln Gly Ser Xaa His Gln Gln Ala Arg
1 5 10

<210> 39

<211> 30

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)
<223> Az Xaa citrullin aminosavgyököt jelöl

<400> 39

Gln	Gly	Ser	Xaa	His	Gln	Gln	Ala	Arg	Asp	Ser	Ser	Arg	His	Ser	Thr
1				5					10					15	
Ser	Gln	Glu	Gly	Gln	Asp	Thr	Ile	His	Gly	His	Xaa	Gly	Ser		
			20					25					30		

<210> 40
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)
<223> Az Xaa citrullin aminosavgyököt jelöl

<220>
<221> MOD_RES
<222> (25)
<223> Az Xaa citrullin aminosavgyököt jelöl

<400> 40

Gln	Gly	Ser	Xaa	His	Gln	Gln	Ala	Arg	Asp	Ser	Ser	Arg	His	Ser	Ala
1				5					10					15	
Ser	Gln	Asp	Gly	Gln	Asp	Thr	Ile	Xaa	Gly	His	Pro	Gly	Ser	Ser	
			20					25					30		

<210> 41
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (19)
<223> Az Xaa citrullin aminosavgyököt jelöl

<400> 41

His	Ser	Gly	Ile	Gly	His	Gly	Gln	Ala	Ser	Ser	Ala	Val	Arg	Asp	Ser
1				5					10					15	
Gly	His	Xaa	Gly	Tyr	Ser	Gly	Ser	Gln	Ala	Ser	Asp	Asn	Glu	Gly	His
			20					25					30		

<210> 42
<211> 1006
<212> DNA
<213> Homo sapiens



<400> 42

```

gaattcgcca ccatggggtc tttcctctac caggtgagca ctcatgaaca gtctgagtcc 60
gcccatggac ggaccgggac cagcactgga ggaagacaag gatcccacca cgagcaggca 120
cgagacagct ccaggcactc aacgtcccaa gagggtcagg acaccattca tggacaccgg 180
gggtcaagca gtggaggaag gcagggatcc cactacgagc aatcggtaga tagatctgga 240
cactcagggt ctcattcacag ccacaccaca tcccaggga ggtctgatgc ctcccatggg 300
cagtcaggat ccagaagtgc aagcagacaa actcgtaacg atgaacaatc aggagacggc 360
tccaggcact cagggtcgcg tcaccatgaa gttcctctc gggccgacag ctctagacac 420
tcgcaggtgg gccagggaca atcagagggg cccaggacaa gcaggaactg gggatccagt 480
tttagccagg acagtgcag tgagggacat tcagaagact ctgagaggtg gtctgggtct 540
gcttcagaaa accatcatgg atctgctcag gaggagctaa gagatggctc cagacacccc 600
aggtcccatc aagaagacag agctgggtcat gggcactctg cagacagctc cagacaatca 660
ggcactcgtc acacacagac ttcctctggt ggacaggctg catcatccca tgaacaggca 720
agatcaagtg caggagaaaag acatggatcc caccaccagc agtcagcaga cagctccaga 780
cactcaggca ttgggcacgg acaagcttca tctgcagtca gagacagtgg acaccgaggg 840
tacagtggta gtcaggccag tgacaatgag ggacattcag aagactcaga cacacagtca 900
gtgtcagccc acggacaggc tgggtcccat cagcagtgcc accaagagtc cgcacgtggc 960
cggtcagggg aaacgtcttg acattcagga tctcccgggc tctaga 1006

```

<210> 43

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 43

```

Met Gly Ser Phe Leu Tyr Gln Val Ser Thr His Glu Gln Ser Glu Ser
 1             5             10             15

Ala His Gly Arg Thr Gly Thr Ser Thr Gly Gly Arg Gln Gly Ser His
      20             25             30

His Glu Gln Ala Arg Asp Ser Ser Arg His Ser Thr Ser Gln Glu Gly
      35             40             45

Gln Asp Thr Ile His Gly His Arg Gly Ser Ser Ser Gly Gly Arg Gln
      50             55             60

Gly Ser His Tyr Glu Gln Ser Val Asp Arg Ser Gly His Ser Gly Ser
      65             70             75             80

His His Ser His Thr Thr Ser Gln Gly Arg Ser Asp Ala Ser His Gly
      85             90             95

Gln Ser Gly Ser Arg Ser Ala Ser Arg Gln Thr Arg Asn Asp Glu Gln
      100             105             110

Ser Gly Asp Gly Ser Arg His Ser Gly Ser Arg His His Glu Ala Ser
      115             120             125

Ser Arg Ala Asp Ser Ser Arg His Ser Gln Val Gly Gln Gly Gln Ser
      130             135             140

Glu Gly Pro Arg Thr Ser Arg Asn Trp Gly Ser Ser Phe Ser Gln Asp
      145             150             155             160

Ser Asp Ser Glu Gly His Ser Glu Asp Ser Glu Arg Trp Ser Gly Ser
      165             170             175

Ala Ser Arg Asn His His Gly Ser Ala Gln Glu Gln Leu Arg Asp Gly
      180             185             190

```



Ser Arg His Pro Arg Ser His Gln Glu Asp Arg Ala Gly His Gly His
 195 200 205

Ser Ala Asp Ser Ser Arg Gln Ser Gly Thr Arg His Thr Gln Thr Ser
 210 215 220

Ser Gly Gly Gln Ala Ala Ser Ser His Glu Gln Ala Arg Ser Ser Ala
 225 230 235 240

Gly Glu Arg His Gly Ser His His Gln Gln Ser Ala Asp Ser Ser Arg
 245 250 255

His Ser Gly Ile Gly His Gly Gln Ala Ser Ser Ala Val Arg Asp Ser
 260 265 270

Gly His Arg Gly Tyr Ser Gly Ser Gln Ala Ser Asp Asn Glu Gly His
 275 280 285

Ser Glu Asp Ser Asp Thr Gln Ser Val Ser Ala His Gly Gln Ala Gly
 290 295 300

Ser His Gln Gln Cys His Gln Glu Ser Ala Arg Gly Arg Ser Gly Glu
 305 310 315 320

Thr Ser Gly His Ser Gly Ser Pro Gly Leu
 325 330

<210> 44
 <211> 1006
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 44

gaattcgcca ccatgggggtc ttctctctac cagggtgagca ctcatgaaca gtctgagtcc 60
 gcccatggac ggaccgggac cagcactgga ggaagacaag gatcccacca cgagcaggca 120
 cgagacagct ccaggcactc aacgtcccaa gaggggtcagg acaccattca tggacaccgg 180
 gggtaagca gtggaggaag gcagggatcc cactacgagc aatcggtaga tagatctgga 240
 cactcagggt ctcatcacag ccacaccaca tcccaggga ggtctgatgc ctcccatggg 300
 cagtcaggat ccagaagtgc aagcagacaa actcgtaacg atgaacaatc aggagacggc 360
 tccaggcact cagggtcgcg ccaccatgaa gttcctctc gggccgacag ctctagacac 420
 tcgcagggtg gccagggaca atcagagggg cccaggacaa gcaggaaactg gggatccagt 480
 tttagccagg acagtgcag tgagggacat tcagaagact ctgagaggtg gtctgggtct 540
 gcttcagaa accatcatgg atctgctcag gagcagctaa gagatggctc cagacacccc 600
 aggtcccac aagaaggcag agctggctcat gggcactctg cagacagctc cagacaatca 660
 ggcaactcgc acacacagac ttctctctgt ggacaggctg catcatccca tgaacgggca 720
 agatcaagtg caggagaaaag acatggatcc caccaccagc agtcagcaga cagctccaga 780
 cactcaggca ttgggcacgg acaagcttca tctgcagtca gagacagtgg acaccgaggg 840
 tacagtggta gtcaggccag tgacaatgag ggacattcag aagactcaga cacacagtca 900
 gtgtcagccc acggacaggc tgggtcccat cagcagagcc accaagagtc cgcacgtggc 960
 cggtcagggg aaacgtcttg acattcagga tctcccgggc tctaga 1006

<210> 45
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 45

Met Gly Ser Phe Leu Tyr Gln Val Ser Thr His Glu Gln Ser Glu Ser
 1 5 10 15

Ala His Gly Arg Thr Gly Thr Ser Thr Gly Gly Arg Gln Gly Ser His



20										25					30				
His	Glu	Gln	Ala	Arg	Asp	Ser	Ser	Arg	His	Ser	Thr	Ser	Gln	Glu	Gly				
		35					40					45							
Gln	Asp	Thr	Ile	His	Gly	His	Arg	Gly	Ser	Ser	Ser	Ser	Gly	Gly	Arg	Gln			
	50					55						60							
Gly	Ser	His	Tyr	Glu	Gln	Ser	Val	Asp	Arg	Ser	Gly	His	Ser	Gly	Ser				
	65				70						75				80				
His	His	Ser	His	Thr	Thr	Ser	Gln	Gly	Arg	Ser	Asp	Ala	Ser	His	Gly				
				85					90					95					
Gln	Ser	Gly	Ser	Arg	Ser	Ala	Ser	Arg	Gln	Thr	Arg	Asn	Asp	Glu	Gln				
			100					105					110						
Ser	Gly	Asp	Gly	Ser	Arg	His	Ser	Gly	Ser	Arg	His	His	Glu	Ala	Ser				
		115					120					125							
Ser	Arg	Ala	Asp	Ser	Ser	Arg	His	Ser	Gln	Val	Gly	Gln	Gly	Gln	Ser				
	130					135					140								
Glu	Gly	Pro	Arg	Thr	Ser	Arg	Asn	Trp	Gly	Ser	Ser	Phe	Ser	Gln	Asp				
	145				150					155					160				
Ser	Asp	Ser	Glu	Gly	His	Ser	Glu	Asp	Ser	Glu	Arg	Trp	Ser	Gly	Ser				
				165					170					175					
Ala	Ser	Arg	Asn	His	His	Gly	Ser	Ala	Gln	Glu	Gln	Leu	Arg	Asp	Gly				
			180					185					190						
Ser	Arg	His	Pro	Arg	Ser	His	Gln	Glu	Gly	Arg	Ala	Gly	His	Gly	His				
		195					200					205							
Ser	Ala	Asp	Ser	Ser	Arg	Gln	Ser	Gly	Thr	Arg	His	Thr	Gln	Thr	Ser				
	210					215					220								
Ser	Gly	Gly	Gln	Ala	Ala	Ser	Ser	His	Glu	Arg	Ala	Arg	Ser	Ser	Ala				
	225				230					235					240				
Gly	Glu	Arg	His	Gly	Ser	His	His	Gln	Gln	Ser	Ala	Asp	Ser	Ser	Arg				
				245					250					255					
His	Ser	Gly	Ile	Gly	His	Gly	Gln	Ala	Ser	Ser	Ala	Val	Arg	Asp	Ser				
			260					265					270						
Gly	His	Arg	Gly	Tyr	Ser	Gly	Ser	Gln	Ala	Ser	Asp	Asn	Glu	Gly	His				
		275					280					285							
Ser	Glu	Asp	Ser	Asp	Thr	Gln	Ser	Val	Ser	Ala	His	Gly	Gln	Ala	Gly				
	290					295					300								
Ser	His	Gln	Gln	Ser	His	Gln	Glu	Ser	Ala	Arg	Gly	Arg	Ser	Gly	Glu				
	305				310					315					320				
Thr	Ser	Gly	His	Ser	Gly	Ser	Pro	Gly	Leu										

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Peptid, amely természetes fillagrin vagy intermedi-
er rostproteinek bármely variánsából származó, kevesebb,
mint 50 aminosavból felépülő, legalább egy citrullin amino-
savat magában foglaló szekvenciát tartalmaz, és amely pep-
tidben a citrullin jelenléte kulcsfontosságú a peptid és
reumatoid artritiszben szenvedő betegek szérumában találha-
tó ellenanyagok közti reakció létrejöttéhez.

2. Az 1. igénypont szerinti peptid, amely vimentin,
citokeratin-1 vagy citokeratin-9 bármely variánsából szár-
mazó, kevesebb, mint 50 aminosavból felépülő, legalább egy
citrullin aminosavat magában foglaló szekvenciát tartalmaz,
amely peptidben a citrullin jelenléte kulcsfontosságú a
peptid és reumatoid artritiszben szenvedő betegek szérumá-
ban található ellenanyagok közti reakció létrejöttéhez.

3. Az 1. igénypont szerinti peptid, amely a felsorolt
aminosavszekvenciák bármelyikét tartalmazza:

HSASQDGQDTIXGHPGSS; vagy

HSGIGHGQASSAVRDSGHXGYS; vagy

DSGHXGYSGSQASDNEGH; vagy

HSTSQEGQDTIHGXGS; vagy

GGQGSXHQQAR; vagy

QGSXHQQARDSSRHSTSQEGQDTIHGXGS; vagy

QGSXHQQARDSSRHASQDGQDTIXGHPGSS; vagy

HSGIGHGQASSAVRDSGHXGYSGSQASDNEGH; vagy

a fenti peptidek analógját, amely a fillagrin alléli-
kus variánsaira jellemző aminosav-szubsztitúciókat hordoz;

ahol „X” jelentése citrullin aminosav.

4. Peptid és/vagy kémiai struktúra, amely 1-3. igénypontok bármelyike szerinti peptidet tartalmaz linker molekulával fuzionáltatva.

5. Cirkularizált peptid, amely legalább egy 1-4. igénypontok bármelyike szerinti peptidet tartalmaz.

6. Peptid, amely legalább két 1-5. igénypontok bármelyike szerinti peptidből felépülő, tandem ismétlődő egységeket tartalmaz és/vagy ilyen egységekből épül fel.

7. Elágazó peptid, amely legalább egy 1-6. igénypontok bármelyike szerinti peptidet tartalmaz.

8. Eljárás az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti peptid előállítására klasszikus kémiai szintézistechnológiával, *azzal jellemezve*, hogy a kémiai szintézis bizonyos lépéseiben arginin aminosavakat citrullinnal helyettesítünk.

9. Eljárás az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti peptid előállítására, *azzal jellemezve*, hogy az elsődleges aminosav-szekvenciát klasszikus kémiai szintézissel hozzuk létre, és az arginin aminosavakat a kémiai szintézist követően, peptidilarginin deziminázzal történő érintkeztetéssel derivatizáljuk citrullinná.

10. Eljárás az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti peptid előállítására, *azzal jellemezve*, hogy:

(i) megfelelő celluláris gazdaszervezetet olyan rekombináns vektorral transzformálunk, amelybe a peptidet kódoló szekvenciát tartalmazó polinukleinsav-szekvencia lett inszertálva a megfelelő szabályozó elemek irányítása alatt,

úgy, hogy a peptid vagy a peptidet tartalmazó protein expresszáldójék és/vagy szekretáldójék;

(ii) a transzformált celluláris gazdaszervezetet a protein vagy peptid expresszáldását és a peptidben jelen lévő argininek citrullinná történő derivatizáldását lehetővé tevő körülmények mellett tenyésztjük; és

(iii) a peptidet kinyerjük.

11. Eljárás az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti peptid előállítására, azzal jellemezve, hogy:

(i) megfelelő celluláris gazdaszervezetet olyan rekombináns vektorral transzformálunk, amelybe a peptidet kódoló szekvenciát tartalmazó polinukleinsav-szekvencia lett inszertálva a megfelelő szabályozó elemek irányítása alatt, úgy, hogy a peptid vagy a peptidet tartalmazó protein expresszáldójék és/vagy szekretáldójék;

(ii) a transzformált celluláris gazdaszervezetet a protein vagy peptid expresszáldását lehetővé tevő körülmények mellett tenyésztjük;

(iii) a proteint vagy peptidet kinyerjük; és

(iv) a protein vagy peptid arginin aminosavait peptidilarginin deziminázzal történő érintkeztetéssel derivatizáljuk.

12. A 10. vagy 11. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy gazdasejtekként bakteriális gazdasejteket vagy élesztősejteket vagy bármely egyéb eukariota sejtet alkalmazunk, amely előnyösen rekombináns baculovírussal lett transzformálva.

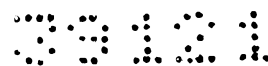
13. Ellenanyag, amely specifikus módon reagál az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti peptid citrullin aminosavaival; vagy specifikus módon reagál intermedier rostproteinek citrullin aminosavaival, és amely előnyösen monoklonális ellenanyag.

14. Anti-idiotípus ellenanyag, amely a 13. igénypont szerinti ellenanyagok bármelyikével történő immunizációval lett előállítva, és amely specifikus módon reagál a 13. igénypont szerinti ellenanyaggal, ezáltal utánozza az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti, citrullin aminosavat tartalmazó peptideket; és amely előnyösen monoklonális ellenanyag.

15. Immunotoxin-molekula, amely sejtfelismerő molekulaként az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti peptidet vagy a 13. vagy 14. igénypont szerinti ellenanyagot tartalmaz toxinmolekulával vagy annak aktív fragmentumával kovalens módon kapcsoltnak; és/vagy abból áll.

16. Az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti peptid vagy a 13. vagy 14. igénypont szerinti ellenanyag vagy a 15. igénypont szerinti immunotoxin-molekula vagy a felsoroltak bármelyikét tartalmazó készítmény alkalmazása gyógyszerként.

17. Az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti peptid vagy a 13. vagy 14. igénypont szerinti ellenanyag vagy a 15. igénypont szerinti immunotoxin-molekula vagy a felsoroltak bármelyikét tartalmazó készítmény alkalmazása reumátoid artritisz kezelésére vagy diagnosztizálására alkalmas gyógyszer vagy diagnosztikum előállítására.



18. Intermedier rostproteinek - előnyösen vimentin, citokeratin-1 vagy citokeratin-9 - vagy intermedier rostproteinekkal történő immunizálással előállított ellenanyagok vagy a felsoroltak bármelyikét tartalmazó készítmény alkalmazása reumatoid artritisz kezelésére vagy diagnosztizálására alkalmas gyógyszer vagy diagnosztikum előállítására.

19. Az 5-7. igénypontok bármelyike szerinti polipeptid vagy a polipeptidet tartalmazó készítmény alkalmazása reumatoid artritisz kezelésére alkalmas gyógyszer előállítására, amely készítmény növeli az antigén-immunkomplexek méretét, ezáltal javítja a képződött immunkomplexek kiürülését.

20. Az 5-7. igénypontok bármelyike szerinti polipeptid vagy a polipeptidet tartalmazó készítmény alkalmazása reumatoid artritisz kezelésére alkalmas, orálisan beadható gyógyszer előállítására, amely szisztémás hiporeszponzivitást („orális toleranciát”) vált ki a polipeptiddel szemben.

21. Diagnosztikai reagenskészlet autoimmun betegségek - például szisztémás lupus erythematosus, diszkoid lupus erythematosus, scleroderma, dermatomyositis, Sjögren-szindróma - diagnózisra, amely legalább egy 1-7. igénypontok bármelyike szerinti peptidet vagy 13. vagy 14. igénypont szerinti ellenanyagot, vagy intermedier rostproteint tartalmaz, adott esetben szilárd hordozóhoz kötve.

22. A 21. igénypont szerinti diagnosztikai reagenskészlet, amely 1-7. igénypontok bármelyike szerinti peptid és/vagy 13. vagy 15. igénypont szerinti ellenanyagok,

vagy intermedier rostproteinek sorozatát tartalmazza - adott esetben más autoimmun betegségek immunogén determinánsait alkotó antigénekkal kombinálva -, amelyben a peptidok, ellenanyagok és/vagy proteinek szilárd hordozó meghatározott helyeihez vannak kötve.

23. A 21. vagy 22. igénypont szerinti diagnosztikai reagenskészlet, ahol szilárd hordozó membráncsík, és a polipeptidek párhuzamos sávok formájában vannak ahhoz hozzákapcsolva.

24. A 21. vagy 22. igénypont szerinti diagnosztikai reagenskészlet, ahol bizonyos peptidek vagy proteinek nincsenek a szilárd hordozóhoz kapcsolva, hanem a kötőoldatban vannak jelen, és azok kompetitorokként és/vagy reumatoid artritisztől eltérő autoimmun betegségben szenvedő betegek szérumában jelen lévő egyéb ellenanyagok blokkolására szolgálnak, ezáltal csökkentik vagy kiküszöbölik az esetleges keresztreakció és/vagy aspecifikus kötődés lehetőségét.

25. Biológiai vizsgálati eljárás autoantigén és reumatoid artritisz specifikus autoantitest kötődését módosító vegyületek azonosítására, *azzal jellemezve, hogy:*

i) reumatoid artritiszre specifikus autoantitesteket érintkeztetünk az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti peptiddel vagy a peptidek valamilyen kombinációjával;

meghatározzuk a reumatoid artritiszre specifikus antitestek kötődését az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti peptiddel vagy intermedier rostproteinnel vagy azok kombinációjával;

(ii) valamely vegyületet vagy vegyületek kombinációját és a reumatoid artritiszre specifikus autoantitesteket érintkeztetünk egyidejűleg vagy egymást követően az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti peptiddel vagy intermedier rostproteinnel vagy azok valamilyen kombinációjával;

kimutatjuk a reumatoid artritiszre specifikus antitestek kötődését az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti peptiddel vagy intermedier rostproteinnel vagy azok kombinációjával;

iii) az i) és ii) kísérlet eredményeinek összehasonlításával meghatározzuk, hogy a vegyületek vagy vegyületek kombinációja módosítja-e a reumatoid artritiszre specifikus autoantitestek és az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti peptidek vagy intermedier rostproteinek vagy azok kombinációjának kötődését.

26. Modulátor autoantigén és reumatoid artritiszre specifikus autoantitest közti kölcsönhatás módosítására, amely a 25. igénypont szerinti eljárással lett előállítva.

27. Eljárás a 26. igénypont szerinti modulátor előállítására.

A meghatalmazott:

DANUBIA

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

103+16=119 oldal



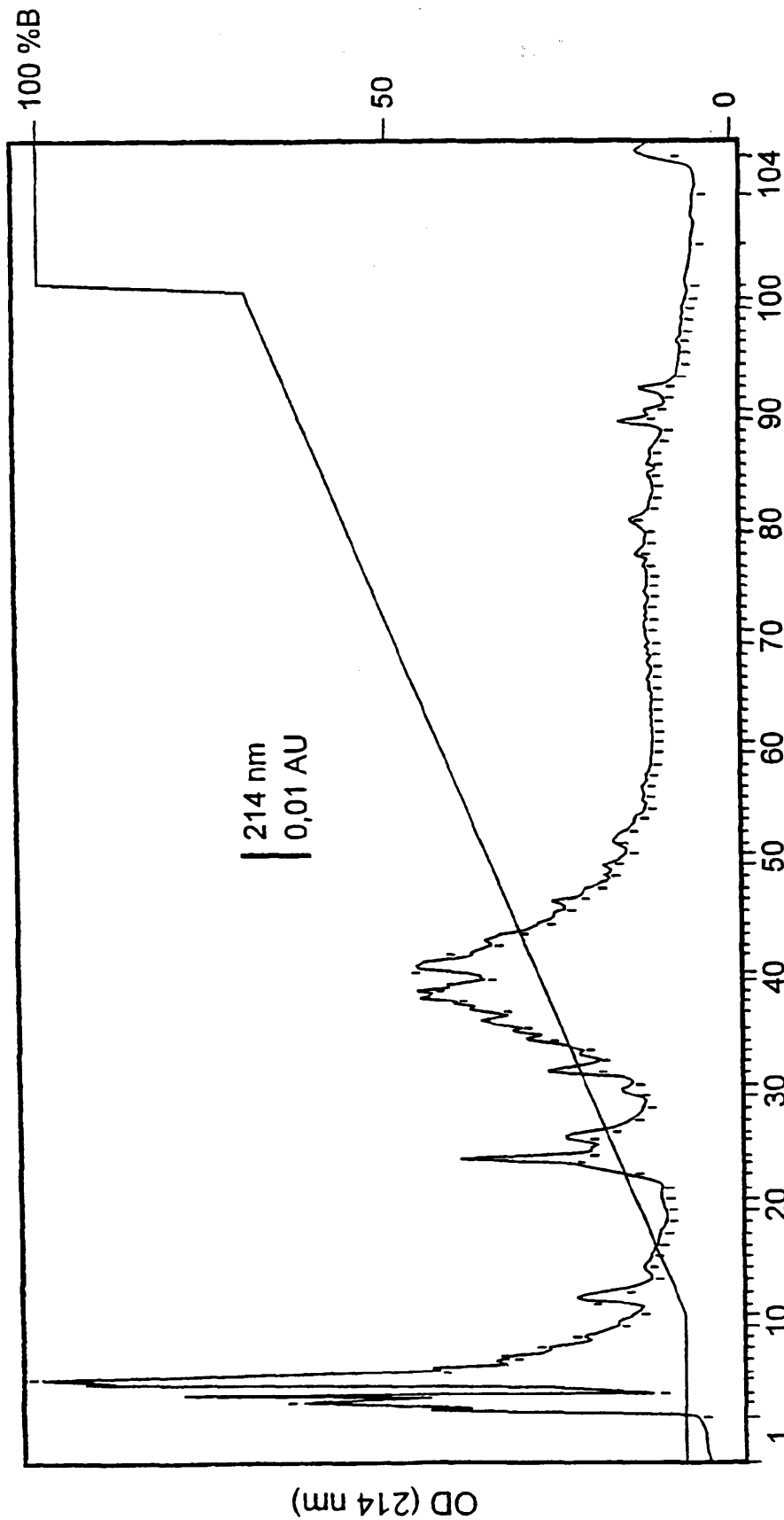
2000. 11. 22.



dr. Pethő Árpád

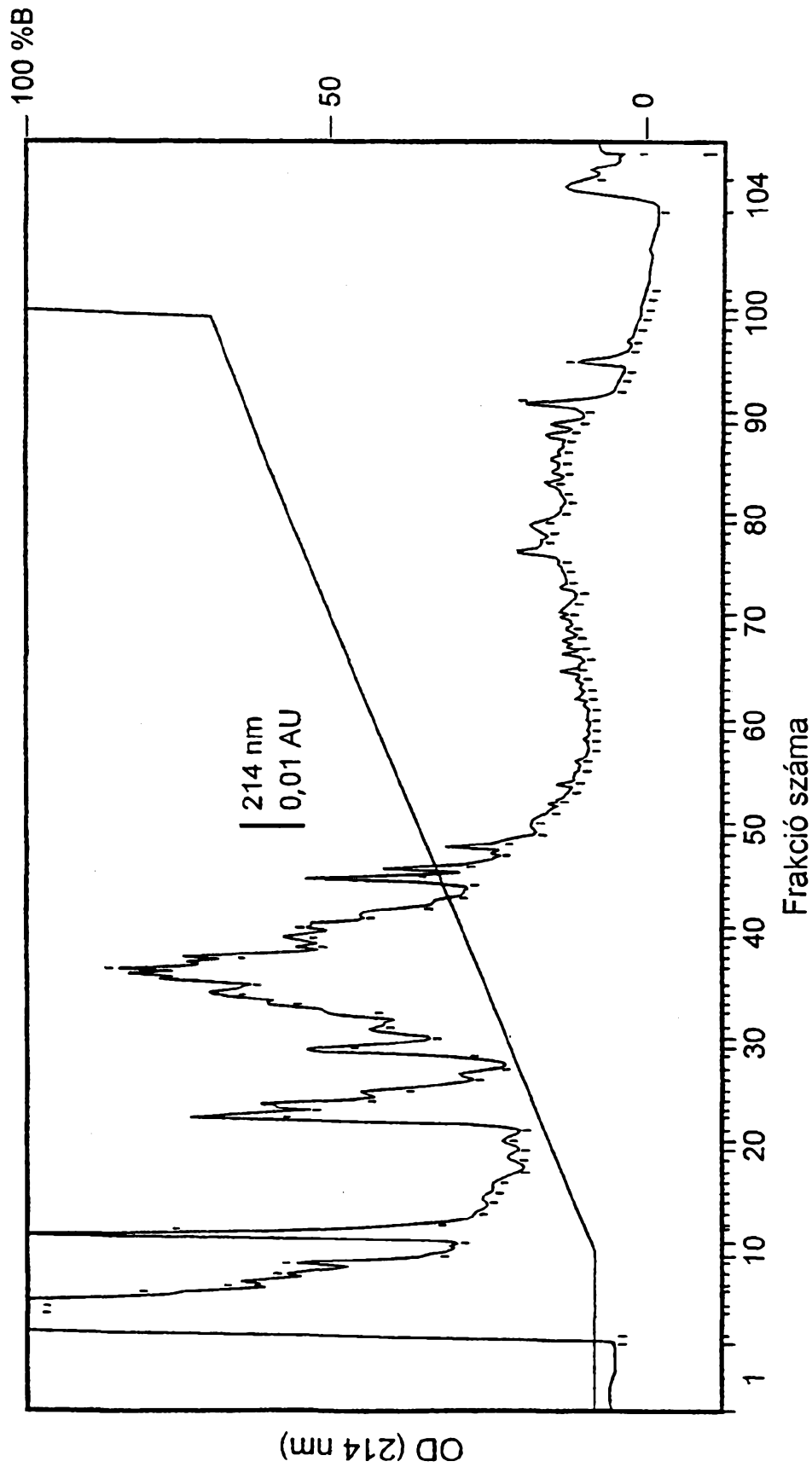
szabadalmi ügyvivő

A2



Frakció száma

1a ábra



1b ábra

HB2641	MG-----SFLYQVSTHEQSESAHGRTGTSTGGR	28
HB2642	MG-----SFLYQVSTHEQSESAHGRTGTSTGGR	28
HB2650	MG-----SFLYQVGTHEQSESAHGRTGTSTGGR	28
HFIL1	AGPHQQSHQESTRGRSAGRSGRSGSFLYQVSTHEQSESAHGRTGTSTGGR	50
HB2648	MG-----SFLYQVSTHEQSESSHGWTPSTRGR	28
FILGAN1	-----FLYQVSTHEQSESSHGRSGTSTGGR	25
HPROFIL22	-----GSFLYQVSTHEQSESAHGRSAPSTRRR	27
HPROFIL21	-----GSFLYQVSTHEQSESSHGWARTSTGRR	27
FILGAN2	-----FLIQVSTHEQSDSAHGQARPSTRRR	25
FILGAN3	-----FLIQVSTHEQSDSTHGWTAPSTRRR	25
FILGAN4	-----FLIQVSTHEQSDSTHGWTVPSTRRR	25

** **.*.....*.*. . .** *

HB2641	QGSHEQARDSSRHSTSQEGQDTIHGHRGSSSGGRQGSHYEQSVDRSGHS	78
HB2642	QGSHEQARDSSRHSTSQEGQDTIHGHRGSSSGGRQGSHYEQSVDRSGHS	78
HB2650	QGSHEQARDSSRHSTSQEGQDTIHGHRGSSSGGRQGSHYEQSVDRSGHS	78
HFIL1	⁵ ~~QGSHEQARDSSRHSTSQEGQDTIHGHRGSSSGGRQGSHYEQSVDRSGHS~~ ⁴	100
HB2648	¹ ~~QGSHEQAQDSSRHSAQEGQDTIRGHPGSSSGGRQGSHYEQSVDRSGHS~~	78
FILGAN1	QGSHEQARDSSRHSTSQEGQDTIHGHPGSSSGGRQGSHYEQSVDRSGHS	75
HPROFIL22	QGSHEQARDSSRHSAQEGQDTIRGHPGSSSGGRQGSHYEQSVDRSGHS	77
HPROFIL21	QGSRHQAQDSSRHSTSQQGQDTIHAHPGSSSGGRHGYYHEQSANSTGHR	77
FILGAN2	QGSRHQAQDSSGHSAQGGQDTIRARPGPRRRGRHGYYHEQLANSTGHR	75
FILGAN3	QGSRHQAQDSSGHSAQGGQDTIRARPGPRRRGRHGYYHEQLANSTGHR	75
FILGAN4	QGSRHQAQDSSGHSAQGGQDTIRARPGPRRRGRHGYYHEQLANSTGHR	75

***.*.*.*.* **.*.*.*.....*.*. **.* ..** ..**.*.

HB2641	GS HHSHTTSQGRSDASHGQSGSR SASRQTRNDEQSGDGSRHSGSRHHEAS	128
HB2642	GS HHSHTTSQGRSDASHGQSGSR SASRQTRNDEQSGDGSRHSGSRHHEAS	128
HB2650	GS HHSHTTSQGRSDASHGQSGSR SASRQTRNDEQSGDGSRHSGSRHHEAS	128
HFIL1	GS HHSHTTSQGRSDASHGHSGSR SASRQTRNDEQSGDGSRHSGSRHHEAS	150
HB2648	GS HHSHTTSQGRSDASHGHSGSR SASRQTRNDEQSGDGSRHSGSRHHEAS	128
FILGAN1	GS HHSHTTSQGRSDASHGTSGSR SASRQTRNDEQSGDGSRHSGSRHHEAS	125
H PROFIL22	GS HHSHTTSQGRSDASHGTSGSR SASRQTRDEEQSGDGTRHSGSHHHEAS	127
H PROFIL21	GS QHSHTTTQGRSDASRGSSGR STSRETRDQEQSGDGSRHSGSHHHEAS	127
FILGAN2	GS QHTHTTTQGRSDASRGSSGR STSRETHDEEQSGDGTRHSGSHHHEAS	125
FILGAN3	GS QHTHTTTQGRSDASRGSSGR STSRTTHDDEEQSGDGTRHSGSHHHEAS	125
FILGAN4	GS QHTHTTTQGRSDASRGSSGR STSRTTHDDEEQSGDGTRHSGSHHHEAS	125

..*****.* *****.* *...*****.*****.*.***

HB2641	SRADSSRHSQVGQQQSEGPRTSRNWGSSFSQDSDSEGHSEDSERWSGSAS	178
HB2642	SRADSSRHSQVGQQQSEGPRTSRNWGSSFSQDSDSEGHSEDSERWSGSAS	178
HB2650	SRADSSRHSQAVQQQSEGPRTSRNWGSSFSQDSDSEGHSEDSERWSGSAS	178
HFIL1	SRADSSGHSQVGQQQSEGPRTSRNWGSSFSQDSDSQGHSEDSERWSGSAS	200
HB2648	SRADSSRHSQVGQEQSEGPRTSRNWGSSFSQDSDSQGHSEDSERWSGSAS	178
FILGAN1	SRADSSRHSQVGQEQSEGPRTSRNWGSSFSQDSDSQGHSEDSERWSGSAS	175
H PROFIL22	TQADSSRHSQVGQQQSAGSRTSRNQGSSVSQDRDSEGQSEDSERHSGSAS	177
H PROFIL21	TRAESSRHSQVGQGESSGRTSRNQGSSFSQDRDSQAQSEDSERRSASGS	177
FILGAN2	TWAESSGHSAAVQQQSAGSRRSRRWGSSVSQDRDSEAQPEDSERRSASAS	175
FILGAN3	TQAESSGHSASVQGDSEGSRRSRRWGSSVSQDRDSEAYPEDSERHSESAS	175
FILGAN4	TQAESSGHSASVQGDSEGSRRSRRWGSSVSQDRDSEAYPEDSERHSESAS	175

. *.** *. *..*.*.* *. ** *...***** *.*.*

2. ábra - 1.folytatás

HB2641	RNHHGSAQEQLRDGSRHPRSHQEDRAGHGHSADSSRQSGTRHTQTSSGGQ	228
HB2642	RNHHGSAQEQLRDGSRHPRSHQEGRAGHGHSADSSRQSGTRHTQTSSGGQ	228
HB2650	RNHHGSAQEQLRDGSRHPRSHQEDRAGHGHSADSSRQSGTRHTQTSSGGQ	228
HFIL1	RNHHGSAQEQLRDGSRHPRSHQEDRAGHGHSADSSRQSGTRHTQTSSGGQ	250
HB2648	RNHHGSAQEQLRDGSRHPRSHQEDRAGHGHSADSSRQSGTRHTQTSSGGQ	228
FILGAN1	RNHHGSAQEQRDGSRHPRSHQEDRAGHGHSADSSRQSGTRHTQTSSGGQ	225
HPROFIL22	RNHRGSAQEQRDGSRHPPGSHDEDRAGHRQSADSSSQSGTRHTQTSSRRQ	227
HPROFIL21	RNHRGSAQEQRDGSRHPPGSHQEDRAGHRQSAESSSQSGTHHAENSSGGQ	227
FILGAN2	RNHRGSSREQLRDVSRHPGSHHEDTASHRQSSEVRSDSGRHAAENSSRRQ	225
FILGAN3	RNHRGSSWEQLRDVSRHPSSHEDTASHVDSSPVQDSSGRHAEESSRRQ	225
FILGAN4	RNHRGSSWEQLRDVSRHPTSHEEDTASHVDSSPVQQSSGRHAEESSRRQ	225
. ** . ** ** ** ** . * . * . ** ** *		
HB2641	AASSHEQARSSAGERHGSHHQQSADSSRHSGIGHGQASSAVRDSGHRGYS	278
HB2642	AASSHERARSSAGERHGSHHQQSADSSRHSGIGHGQASSAVRDSGHRGYS	278
HB2650	AASSHEQARSSAGERHGSHHQQSADSSRHSGIGHGQASSAVRDSGHRGYS	278
HFIL1	AASSHEQARSSAGDRHGSHHQQSADSSRHSGIGHGQASSAVRDSGHRGYS	300
HB2648	AASSHEQARSSAGERHGSHHQQSADSSRHSGIGHGQASSAVRDSGHRGYS	278
FILGAN1	AASSHEQARSSAGDRHGSQHQQSADSSRHSGIGHGQASSAVRDSGHRGSS	275
HPROFIL22	AASSQEARSRAGDRHGSQHQQSADSSRHSAIGRGQASSAVRDRGHRGSR	277
HPROFIL21	AASSQEARSAGERHGSQHQQSADSSRHSGIGHGQASSAVRDSGHRGYS	277
FILGAN2	TASSQEARSRPGERHGSHHQQSADSSRHAATGRGQASTAVSDRGHRGYR	275
FILGAN3	TASSQEARSRPGERHGSHYQQSADSSRHAATGRGQASTAVSDRGHRGYR	275
FILGAN4	TASSQEARSRPGERHGSHYQQSADSSRHAATGRGQASTAVSDRGHRGYR	275

. *** . * . *** . * . ***** * . ***** . * . * . ***** .

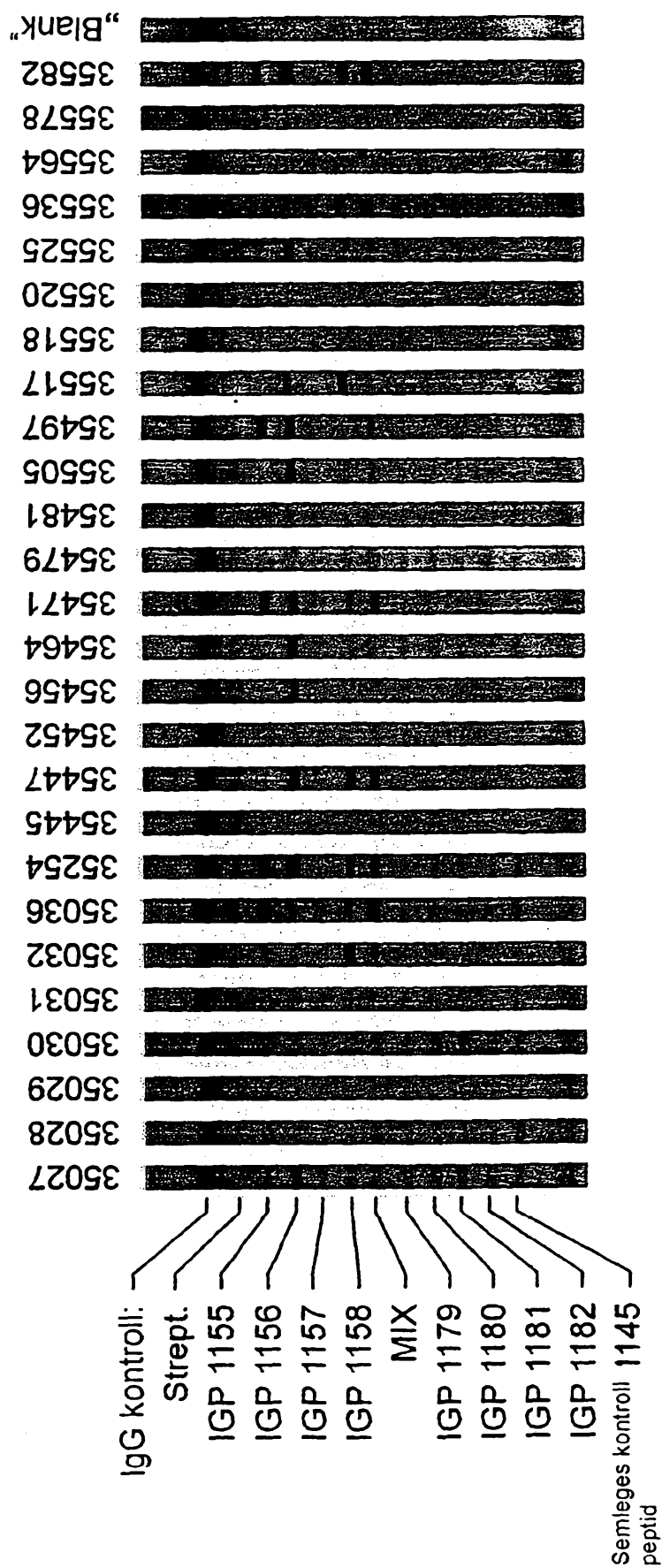
2. ábra - 2. folytatás

HB2641	GSQASDNEGHSESDTQSVSAHGQAGSHQQCHQESARGRSGETSGHSGSPGL	330
HB2642	GSQASDNEGHSESDTQSVSAHGQAGSHQQSHQESARGRSGETSGHSGSPGL	330
HB2650	GSQASDNEGHSESDTQSVSAHGQAGSHQQSHQESARGRSGETSGHSGSPGL	330
HFIL1	~~GSQASDNEGHSESDTQSVSAHGQAGSHQQSHQESARGRSGETSGHS~~ -----	347
	3	
HB2648	GSQASDNEGHSESDTQSVSAHGQAGSHQQSHQESARGRSGETSGHSGSPGL	330
FILGAN1	GSQASDNEGHSESDTQSVSAHGQAGSHQQSHQESTRGRS---RGRSGRS	324
HPROFIL22	GSQASDQEGHSESDSQSVSAQRQAGSHQQSHQESTRGRSQGRSGRS---GS	324
HPROFIL21	GSQASDQEGHSENSDSQSVSGQRQARSHQQSHQESTRGQSRGRSGRS-----	324
FILGAN2	GSQATDQEGHSENSDSQSVAGQRQARPRHEAHQESARGQSQETSGRSGS---	324
FILGAN3	GSQATDSEGHSENSDSQSVAGQRQARLRHEAHQESARGQSAEGSGRSGS---	324
FILGAN4	GSQATDSEGHSENSDSQSVAGQRQARRRHEAHQESARGQSGESSGRSGS---	324

****,* *****,**.***... ** ... *****,**,* ..*

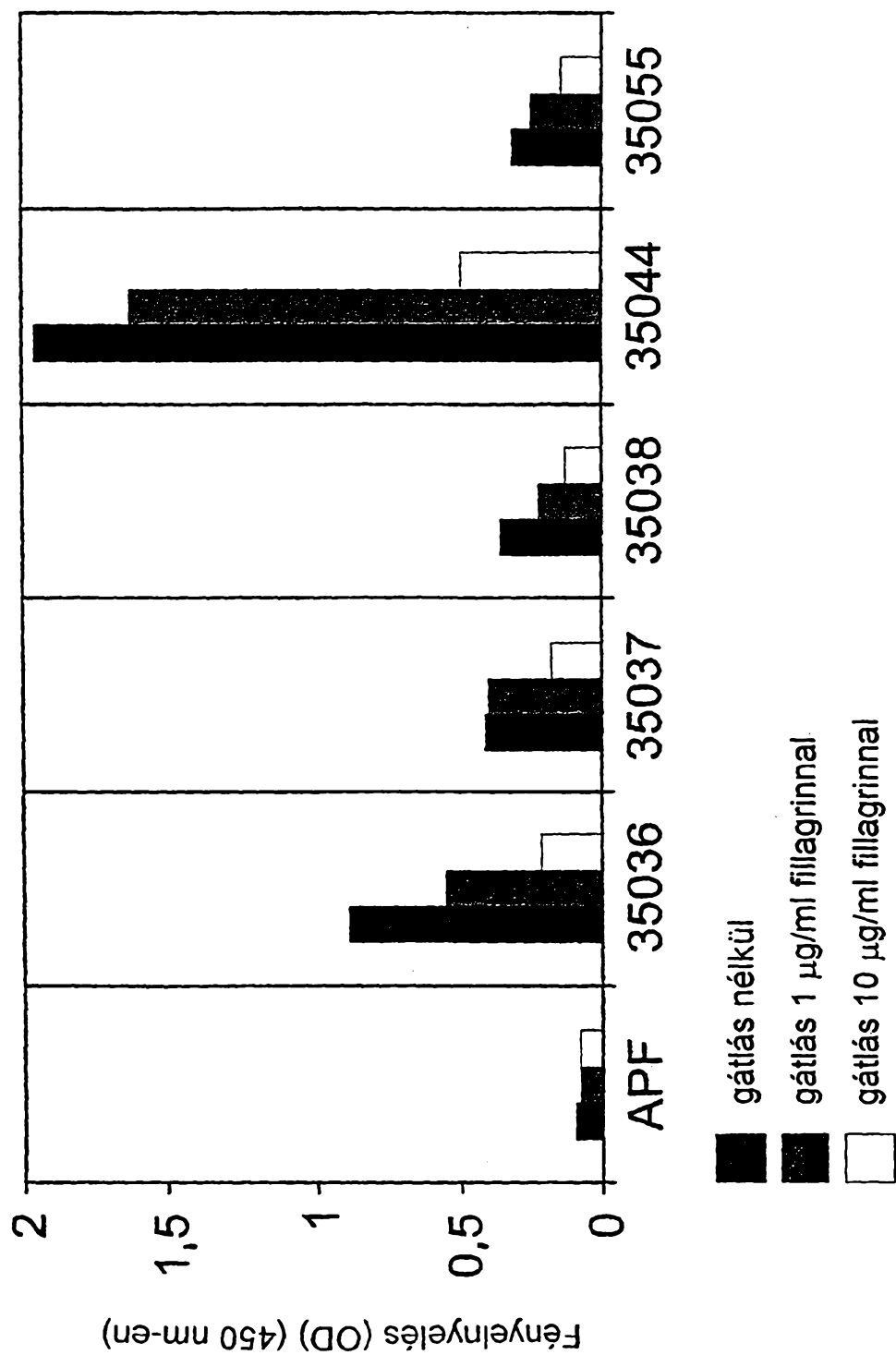
2. ábra - 3. folytatás

Peptidek számozása:	
1:	IGP 1155
2:	IGP 1156
3:	IGP 1157
4:	IGP 1158
5:	IGP 1249
6:	IGP 1250
7:	IGP 1251
8:	IGP 1252
9:	IGP 1326



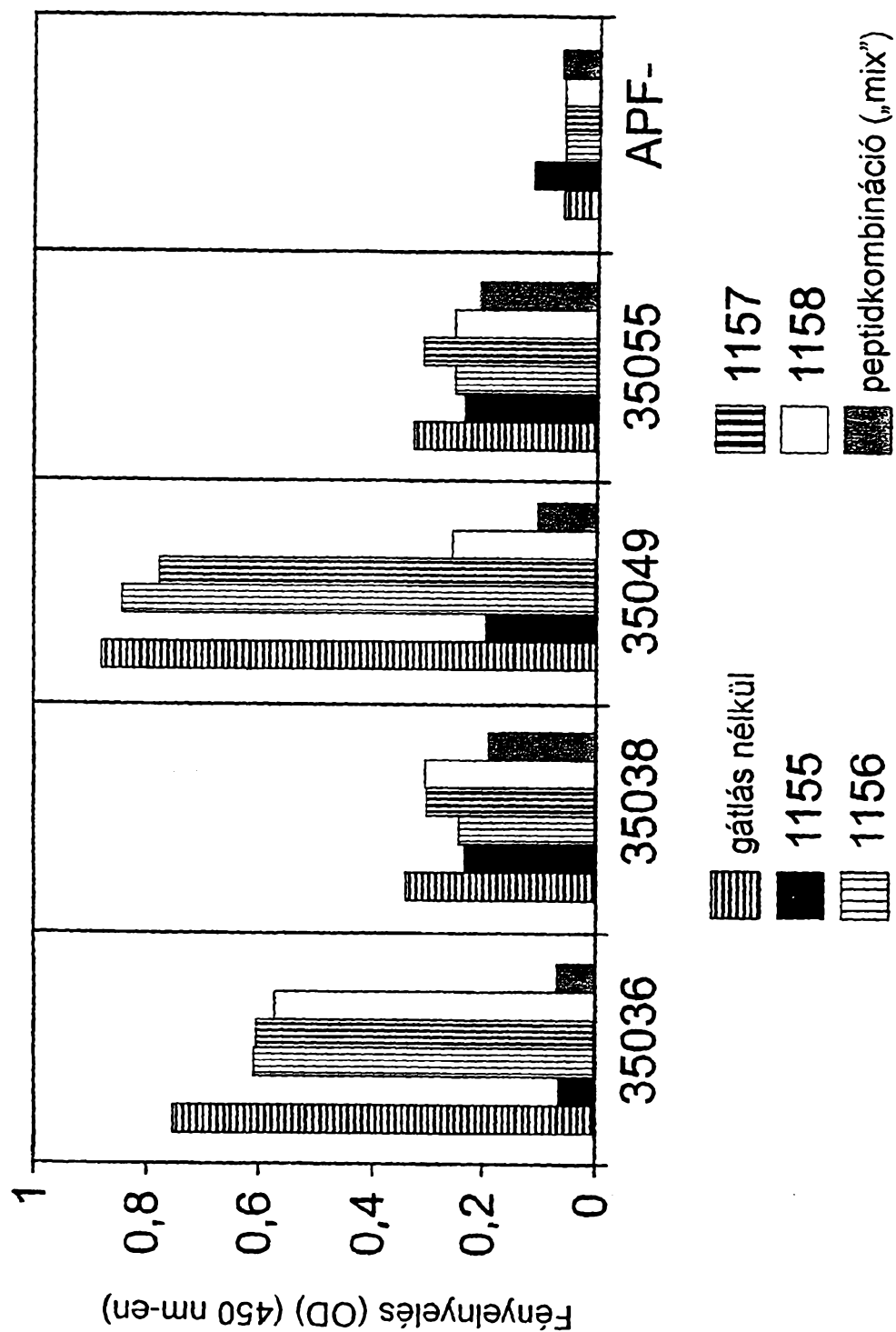
3. ábra

Gátlási ELISA natív fillagrin gátlószerként történő alkalmazásával

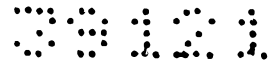


4. ábra

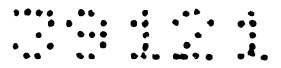
Gátlási ELISA fillagrinpeptidek gátlószerként történő alkalmazásával



5. ábra



HB2641	GAATTCGCCACCATGGGGTCTTTCCCTCTACCAGGTGAGCACTCATGAACA	50
HB2642	GAATTCGCCACCATGGGGTCTTTCCCTCTACCAGGTGAGCACTCATGAACA	50
HB2650	GAATTCGCCACCATGGGGTCTTTCCCTCTACCAGGTGGCACTCATGAACA	50
HB2648	GAATTCGCCACCATGGGGTCTTTCCCTCTACCAGGTGAGCACTCATGAACA	50
HFIL1	-----GGGTCTTTCCCTCTACCAGGTGAGCACTCATGAACA	35
	*****.*****.*****	
HB2641	GTCTGAGTCCGCCCATGGACGGACCGGGACCAGCACTGGAGGAAGACAAG	100
HB2642	GTCTGAGTCCGCCCATGGACGGACCGGGACCAGCACTGGAGGAAGACAAG	100
HB2650	GTCTGAGTCCGCCCATGGACGGACCGGGACCAGCACTGGAGGAAGACAAG	100
HB2648	GTCTGAGTCCCTCCCATGGATGGACGGGGCCCACTAGAGGAAGACAAG	100
HFIL1	GTCTGAGTCCGCCCATGGACGGACCGGGACCAGCACTGGAGGAAGACAAG	85
	*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****	
HB2641	GATCCACACGAGCAGGCACGAGACAGCTCCAGGCACTCAACGTCCCAA	150
HB2642	GATCCACACGAGCAGGCACGAGACAGCTCCAGGCACTCAACGTCCCAA	150
HB2650	GATCCACACGAGCAGGCACGAGACAGCTCCAGGCACTCAACGTCCCAA	150
HB2648	GATCCCGCCATGAGCAGGCACAAGACAGCTCCAGGCACTCAGCATCCCAA	150
HFIL1	GATCCACACGAGCAGGCACGAGACAGCTCCAGGCACTCAACGTCCCAA	135
	*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****	
HB2641	GAGGGTCAGGACACCATTCATGGACACCGGGGTCAAGCAGTGGAGGAAG	200
HB2642	GAGGGTCAGGACACCATTCATGGACACCGGGGTCAAGCAGTGGAGGAAG	200
HB2650	GAGGGTCAGGACACCATTCATGGACACCGGGGTCAAGCAGTGGAGGAAG	200
HB2648	GACGGTCAGGACACCATTCGTGGACACCGGGGTCAAGCAGAGGAGGAAG	200
HFIL1	GAGGGTCAGGACACCATTCATGGACACCGGGGTCAAGCAGTGGAGGAAG	185
	** *****.*****.*****.*****.*****.*****.*****	



HB2641	GCAGGGATCCCAC	TACGAGCAATCGGTAGATAGATCTGGACACTCAGGGT	250
HB2642	GCAGGGATCCCAC	TACGAGCAATCGGTAGATAGATCTGGACACTCAGGGT	250
HB2650	GCAGGGATCCCAC	TACGAGCAATCGGTAGATAGATCTGGACACTCAGGGT	250
HB2648	GCAGGGATCCCAC	TACGAGCAATCGGTAGATAGATCTGGACACTCAGGGT	250
HFIL1	GCAGGGATCCCAC	TACGAGCAATCGGTAGATAGATCTGGACACTCAGGGT	235
	*****	*****	
HB2641	CTCATCACAGCC	CACACATCCCAGGGAAGGTCTGATGCCCTCCCATGGG	300
HB2642	CTCATCACAGCC	CACACATCCCAGGGAAGGTCTGATGCCCTCCCATGGG	300
HB2650	CTCATCACAGCC	CACACATCCCAGGGAAGGTCTGATGCCCTCCCATGGG	300
HB2648	CTCATCACAGCC	CACACATCCCAGGGAAGGTCTGATGCCCTCCCATGGG	300
HFIL1	CTCATCACAGCC	CACACATCCCAGGGAAGGTCTGATGCCCTCCCATGGG	285
	*****	*****	
HB2641	CAGTCAGGATCC	AGAAGTGCAAGCAGACAAACTCGTAACGATGAACAATC	350
HB2642	CAGTCAGGATCC	AGAAGTGCAAGCAGACAAACTCGTAACGATGAACAATC	350
HB2650	CAGTCAGGATCC	AGAAGTGCAAGCAGACAAACTCGTAACGATGAACAATC	350
HB2648	CAGTCAGGATCC	AGAAGTGCAAGCAGACAAACTCGTAACGATGAACAATC	350
HFIL1	CAGTCAGGATCC	AGAAGTGCAAGCAGACAAACTCGTAACGATGAACAATC	335
	**	*****	
HB2641	AGGAGACGGCTC	CAGGGCTCGCGTCACCATGAAGCTTCCTCTC	400
HB2642	AGGAGACGGCTC	CAGGGCTCGCGTCACCATGAAGCTTCCTCTC	400
HB2650	AGGAGACGGCTC	CAGGGCTCGCGTCACCATGAAGCTTCCTCTC	400
HB2648	AGGAGACGGCTC	CAGGGCTCGCGTCACCATGAAGCTTCCTCTC	400
HFIL1	AGGAGACGGCTC	CAGGGCTCGCGTCACCATGAAGCTTCCTCTC	385
	*****	*****	

6. ábra
1. folytatás



HB2641	GGGCCGACAGCTCTAGACACTCGCAGGTGGGCCAGGGACAATCAGAGGGG	450
HB2642	GGGCCGACAGCTCTAGACACTCGCAGGTGGGCCAGGGACAATCAGAGGGG	450
HB2650	GGGCCGACAGCTCTAGACACTCACAGGCAGTCCAGGGACAATCAGAGGGG	450
HB2648	GGGCCGACAGCTCTAGACACTCGCAGGTGGGCCAGGAACAATCAGAGGGG	450
HFIL1	GGGCCGACAGCTCTGGACACTCGCAGGTGGGCCAGGGACAATCAGAGGGG	435
	*****.*****.*****.*****.*****.*****	
HB2641	CCCAGGACAAGCAGGAAC TGGGATCCAGTTT AGCCAGGACAGTGACAG	500
HB2642	CCCAGGACAAGCAGGAAC TGGGATCCAGTTT AGCCAGGACAGTGACAG	500
HB2650	CCCAGGACAAGCAGGAAC TGGGATCCAGTTT AGCCAGGACAGTGACAG	500
HB2648	CCCAGGACAAGCAGGAAC TGGGATCCAGTTT AGCCAGGACAGTGACAG	500
HFIL1	CCCAGGACAAGCAGGAAC TGGGATCCAGTTT AGCCAGGACAGTGACAG	485
	*****.*****.*****.*****.*****.*****	
HB2641	TGAGGGACATTCAGAAGACTCTGAGAGGTGGTCTGGGTCTGCTTCCAGAA	550
HB2642	TGAGGGACATTCAGAAGACTCTGAGAGGTGGTCTGGGTCTGCTTCCAGAA	550
HB2650	TGAGGGACATTCAGAAGACTCTGAGAGGTGGTCTGGGTCTGCTTCCAGAA	550
HB2648	TCAGGGACACTCAGAAGACTCTGAGAGGTGGTCTGGGTCTGCTTCCAGAA	550
HFIL1	TCAGGGACACTCAGAAGACTCTGAGAGGTGGTCTGGGTCTGCTTCCAGAA	535
	* ***** *	
HB2641	ACCATCATGGATCTGCTCAGGAGCAGCTAAGAGATGGCTCCAGACACCCC	600
HB2642	ACCATCATGGATCTGCTCAGGAGCAGCTAAGAGATGGCTCCAGACACCCC	600
HB2650	ACCATCATGGATCTGCTCAGGAGCAGCTAAGAGATGGCTCCAGACACCCC	600
HB2648	ACCATCATGGATCTGCTCAGGAGCAGCTAAGAGATGGCTCCAGACACCCC	600
HFIL1	ACCATCATGGATCTGCTCAGGAGCAGCTAAGAGATGGCTCCAGACACCCC	585
	*****.*****.*****.*****.*****.*****	

HB2641	AGGTCCCATCAAGAAGACAGAGCTGGTCATGGGCACTCTGCAGACAGCTC	650
HB2642	AGGTCCCATCAAGAAGGACAGAGCTGGTCATGGGCACTCTGCAGACAGCTC	650
HB2650	AGGTCCCATCAAGAAGACAGAGCTGGTCATGGGCACTCTGCAGACAGCTC	650
HB2648	AGGTCCCATCAAGAAGACAGAGCTGGTCATGGGCACTCTGCAGACAGCTC	650
HFIL1	AGGTCCCATCAAGAAGACAGAGCTGGTCATGGGCACTCTGCAGACAGCTC	635
	*****.*****	
HB2641	CAGACAAATCAGGCACTCGTCACACACAGACTTCCTCTGGTGGACAGGCTG	700
HB2642	CAGACAAATCAGGCACTCGTCACACACAGACTTCCTCTGGTGGACAGGCTG	700
HB2650	CAGACAAATCAGGCACTCGTCACACACAGACTTCCTCTGGTGGACAGGCTG	700
HB2648	CAGACAAATCAGGCACTCGTCACACACAGACTTCCTCTGGTGGACAGGCTG	700
HFIL1	CAGACAAATCAGGCACTCGTCACACACAGACTTCCTCTGGTGGACAGGCTG	685
	*****.*****	
HB2641	CATCATCCCATGAACAGGCAAGATCAAGTGCAGGAGAAAGACATGGATCC	750
HB2642	CATCATCCCATGAACGGGCAAGATCAAGTGCAGGAGAAAGACATGGATCC	750
HB2650	CATCATCCCATGAACAGGCAAGATCAAGTGCAGGAGAAAGACATGGATCC	750
HB2648	CATCATCCCATGAACAGGCAAGATCAAGTGCAGGAGAAAGACATGGATCC	750
HFIL1	CATCATCCCATGAACAGGCAAGATCAAGTGCAGGAGACAGACATGGATCC	735
	*****.*****	
HB2641	CACCACCAGCAGTCAGCAGACAGCTCCAGACACTCAGGCATTGGGCACGG	800
HB2642	CACCACCAGCAGTCAGCAGACAGCTCCAGACACTCAGGCATTGGGCACGG	800
HB2650	CACCACCAGCAGTCAGCAGACAGCTCCAGACACTCAGGCATTGGGCACGG	800
HB2648	CACCACCAGCAGTCAGCAGACAGCTCCAGACACTCAGGCATTGGGCACGG	800
HFIL1	CACCACCAGCAGTCAGCAGACAGCTCCAGACACTCAGGCATTGGGCACGG	785
	*****.*****	

6. ábra

3. folytatás

HB2641	ACAAGCTTCATCTGCAGTCAGAGACAGTGGACACCGAGGGTACAGTGGTA	850
HB2642	ACAAGCTTCATCTGCAGTCAGAGACAGTGGACACCGAGGGTACAGTGGTA	850
HB2650	ACAAGCTTCATCTGCAGTCAGAGACAGTGGACACCGAGGGTACAGTGGTA	850
HB2648	ACAAGCTTCATCTGCAGTCAGAGACAGTGGACACCGAGGGTACAGTGGTA	850
HFIL1	ACAAGCTTCATCTGCAGTCAGAGACAGTGGACACCGAGGGTACAGTGGTA	835

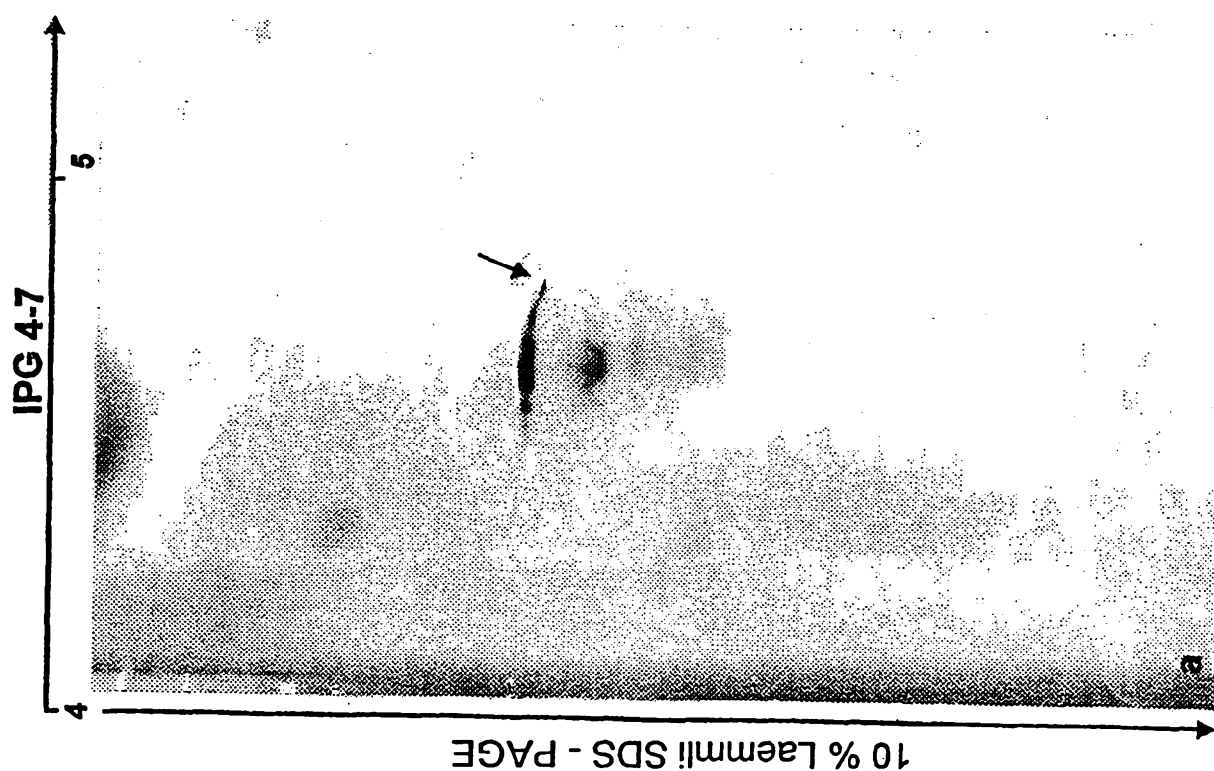
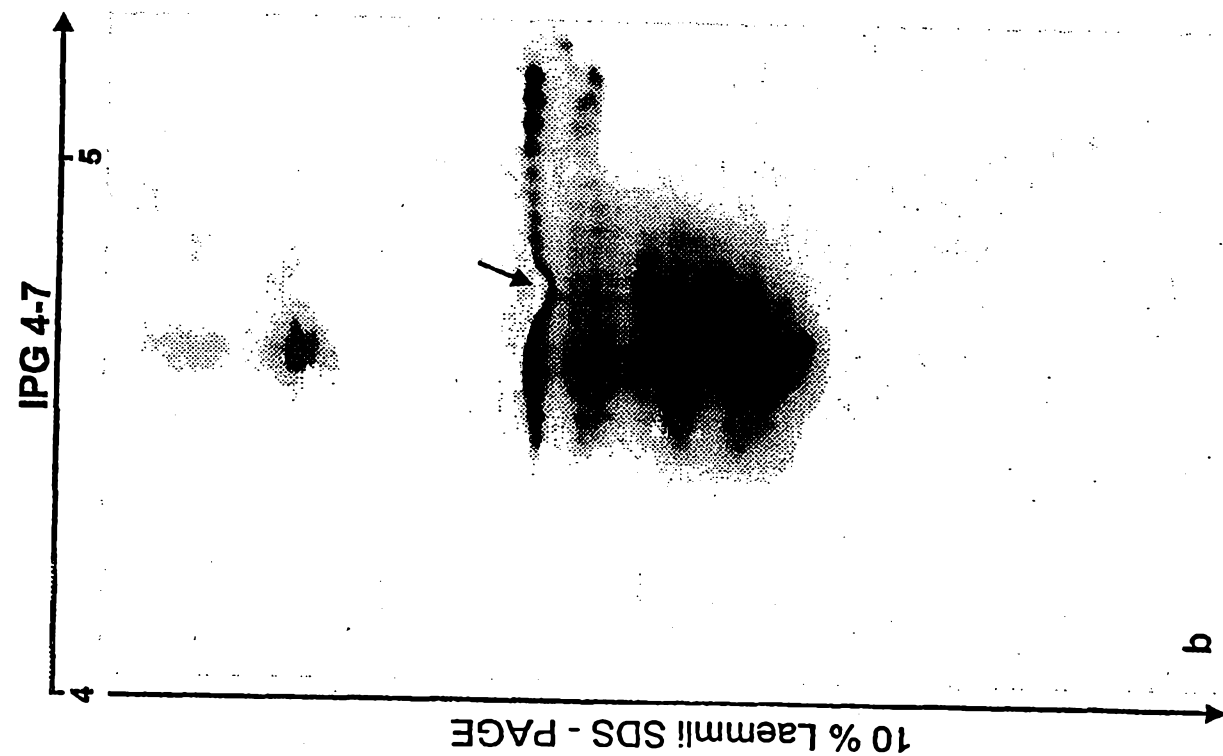
HB2641	GTCAGGCCAGTGACAATGAGGGACATTCAGAAGACTCAGACACACAGTCA	900
HB2642	GTCAGGCCAGTGACAATGAGGGACATTCAGAAGACTCAGACACACAGTCA	900
HB2650	GTCAGGCCAGTGACAATGAGGGACATTCAGAAGACTCAGACACACAGTCA	900
HB2648	GTCAGGCCAGTGACAATGAGGGACATTCAGAAGACTCAGACACACAGTCA	900
HFIL1	GTCAGGCCAGTGACAATGAGGGACATTCAGAAGACTCAGACACACAGTCA	885

HB2641	GTGTCAGCCACGGACAGGCTGGGTCCCATCAGCAGTGCCACCAAGAGTC	950
HB2642	GTGTCAGCCACGGACAGGCTGGGTCCCATCAGCAGTGCCACCAAGAGTC	950
HB2650	GTGTCAGCCACGGACAGGCTGGGTCCCATCAGCAGTGCCACCAAGAGTC	950
HB2648	GTGTCAGCCACGGACAGGCTGGGTCCCATCAGCAGTGCCACCAAGAGTC	950
HFIL1	GTGTCAGCCACGGACAGGCTGGGTCCCATCAGCAGTGCCACCAAGAGTC	935

HB2641	CGCACGTGGCCGGTCAAGGGGAAACGTCTGGACATTCAGGATCT--CC---	994
HB2642	CGCACGTGGCCGGTCAAGGGGAAACGTCTGGACATTCAGGATCT--CC---	994
HB2650	CGCACGTGGCCGGTCAAGGGGAAACGTCTGGACATTCAGGATCT--CC---	994
HB2648	CGCACGTGGCCGGTCAAGGGGAAACGTCTGGACATTCAGGATCT--CC---	994
HFIL1	CGCACGTGGCCGGTCAAGGGGAAACGTCTGGACATTCAGGATCTTTCCCTCT	985

HB2641	--CGGG-----CTCTAGA	1006
HB2642	--CGGG-----CTCTAGA	1006
HB2650	--CGGG-----CTCTAGA	1006
HB2648	--CGGG-----CTCTAGA	1006
HFIL1	ACCAGGTGAGCACT---	999
	..*.*.*	

6. ábra
5. folytatás



7. ábra