

**Béta-amiloid prekursor protein és ubiquitin-B
kereteltolódásos mutánsok és alkalmazásuk**

K I V O N A T

A találmány tárgya Alzheimer-kór vagy Down-kór kezelésére alkalmas peptid, amely Alzheimer-kórral vagy Down-kórral összefüggő kereteltolódásos mutáció eredményeként keletkezett mutáns β APP vagy Ubi-B protein fragmense, és vagy teljes hosszúságú vagy antigénbemutató sejt által végzett feldolgozását követően elnyert alakjában T-sejtes válaszreakció kiváltására képes, továbbá a kereteltolódásos mutáns peptidet kódoló DNS-szekvencia és az azt tartalmazó vektor. A találmány tárgyát képezik továbbá a peptideket vagy a DNS-szekvenciákat tartalmazó gyógyászati készítmények és vakcinák.

A találmány tárgya továbbá eljárás Alzheimer-kórban szenvedő vagy arra hajlamos, vagy Down-kórban szenvedő páciens kezelésére.

Fordulati

Képviselő:

**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY**

A 2

Danubia

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

B u d a p e s t

**Béta-amiloid prekursor protein és ubiquitin-B
kereteltolódásos mutánsok és alkalmazásuk**

A találmány tárgyát Alzheimer-kór és Down-kór kezelésére és/vagy megelőzésére alkalmas peptidek képezik.

Az Alzheimer-kór és a Down-kór egyaránt a β -amiloid prekursor proteint (β APP), illetve az ubiquitin-B-t (Ubi-B) kódoló régiók expressziója során a transzkripció szinten vagy az RNS poszttranszkripció szerkesztésében bekövetkező kereteltolódásos mutációkkal függ össze. Ezek a kereteltolódásos mutációk a C-terminális végükön rendellenes proteinszekvenciákkal rendelkező mutáns β APP vagy Ubi-B proteinek termelését idézik elő. A mutáns β APP vagy Ubi-B protein-termékek rendellenes részeit teljesen vagy részlegesen magukba foglaló peptidek T-sejtes immunválaszt váltanak ki, így Alzheimer-kór és Down-kór kezelésére használható készítmények összetevőiként alkalmazhatók. A találmány szerinti peptidek emellett Alzheimer-kór megelőzésére szolgáló vakcina készítésére is alkalmasak.

A találmány tárgyát továbbá Alzheimer- és Down-kóros betegekben előforduló rendellenes β APP és Ubi-B proteinszekvenciáknak megfelelő peptideket kódoló DNS-szekvenciák, és legalább egy ilyen peptidet kódoló DNS-szekvenciát tartalmazó, legalább egy inszerciós helyet magukba foglaló vektorok képezik.

A találmány tárgyát képezik továbbá Alzheimer-kór kezelésére és/vagy megelőzésére alkalmas, legalább egy mutáns β APP és/vagy Ubi-B peptid, vagy legalább egy, legalább egy mutáns β APP és/vagy Ubi-B peptidet kódoló DNS-szekvenciát tartalmazó inszerciót magában foglaló rekombináns vírusvektor beadásán alapuló eljárások is.

A találmány tárgyát a szervezet saját immunrendszere T-sejtes ágának Alzheimer-kórhoz társult mutáns β APP és Ubi-B proteintermékeket termelő sejtek elleni aktiválását előidéző peptidek alkalmazásán alapuló, az Alzheimer-kór kezelésére és/vagy megelőzésére alkalmas eljárás kifejlesztése képezi.

Az Alzheimer-kór kezelésére kifejlesztett eljárások közvetlenül igénybe vehetők Down-kóros betegek kezelésére is.

Az alábbiakban ismertetjük a technika állását a vonatkozó szakterületeken.

Daganatsejtek génjeiben bekövetkezett kereteltolódásos mutációk következtében létrejövő rendellenes proteinszekvenciáknak megfelelő peptidek specifikus T-sejtes immunitást idéznek elő, ezáltal daganatellenes vakcinaként alkalmazhatók (referencia: ezen beadvánnyal azonos időpontban

a Norsk Hydro ASA által benyújtott norvég szabadalmi bejelentések). Hasonlóképpen, más betegségekkel társult, kereteltolódásos mutációk eredményeként létrejött rendellenes proteinszekvenciáknak megfelelő peptidek szintén alkalmasak az adott betegség specifikus T-sejtes immunitás előidézésén alapuló kezelésének kifejlesztésére.

A kereteltolódásos mutációk a proteinek C-terminálisán teljesen új aminosav-szekvenciák megjelenését eredményezik, amelyek képződése az új végkodon megjelenésének helyén idő előtt megszakad. Ennek két lényeges következménye van.

1) A kereteltolódás eredményeként létrejövő csonkolt protein általában nem működőképes, ami a legtöbb esetben valamilyen lényeges sejtfunkció "kiütésével" jár. A kóros proteinek új tulajdonságokkal is rendelkezhetnek, ilyenek például az aggregálódás és a plakk-képzés. A kereteltolódás mindkét esetben megbetegedést okoz.

2) A kereteltolódásból eredő rendellenes új C-terminális aminosav-szekvencia idegen a szervezet számára. A mutáció előtt nem található meg a szervezetben és csak a mutáción átesett sejtekben van jelen.

Mivel ezek a hordozó immunrendszere számára teljesen ismeretlenek, védekezőrendszere T-sejtjei felismerhetik őket. Mindezidáig senki nem foglalkozott ebből a szempontból a kereteltolódásos mutációkkal és nem számoltak be antigéneknek számító proteinek kódoló régióiból származó kereteltolódásos peptidek jellegzetességeiről sem. A mi megközelítésünk ezért újnak számít és az ezeken a szekven-

ciákon alapuló vakcinák kifejlesztésének alapját képezi. Ezek a vakcinák a hibás géneket örökölt, vagy egyéb okból kereteltolódásos mutáció kialakulására hajlamos személyek esetében megelőző célzattal is alkalmazhatók. Az ilyen vakcinák új fejezetet nyitnak a betegségek öröklött formái elleni küzdelem terén.

Kimutatták, hogy az intracellularis "saját" proteinekben bekövetkező egyedi aminosav-helyettesítések daganatkilökődési antigének képződését eredményezhetik, amelyek az ép peptidektől aminosavsorrendjükben eltérő peptidekből állnak. Az ezeket a peptideket a daganatsejtek felszínén a fő hisztokompatibilitási (MHC) molekulákkal kapcsolatban felismerő T-sejtek képesek a daganatsejtek elpusztítására és a daganat szervezetből történő "kilökésére".

A B-sejtek által termelt, a szabad antigént általában természetes konformációjában, valamint emellett az antigén felszínén található szinte bármely helyet felismerő ellenanyagokkal szemben a T-sejtek egy antigént csak egy MHC-molekula által megkötött és bemutatott formában ismernek fel. Ez a megkötés rendszerint csak megfelelő antigénfeldolgozás ("processing") után következik be, ami a protein olyan proteolitikus feldarabolását foglalja magába, amelynek eredményeként képződő peptidfragmens az MHC-molekula barázdájába illik. Ennek megfelelően a T-sejtek képesek felismerni az intracelluláris proteinekből származó peptideket is. Így a T-sejtek képesek a daganatsejt bármely részéből származó, a sejtfelszíni MHC-molekulákkal összefüggésben bemutatott rendellenes peptidek felismerésére

majd aktiválhatók is a rendellenes peptidet tartalmazó daganatsejt eltávolítására érdekében.

Az MHC peptidekhez történő kötődésével kapcsolatban rövid áttekintést közöl M. Baringa közleménye [Baringa, M., Science 257, 880 (1992)]. A találmány tárgyát képező megoldás technikai hátterével kapcsolatban lásd a következő közleményt: Male, D. és mtsai.: Advanced Immunology, kiad.: J. B. Lippincott Co., Philadelphia. Mindkét említett szakirodalom teljes terjedelmében a kitanítás részét képezi.

Emberekben az MHC-molekulák általános megnevezése HLA-molekula ("human leucocyte antigen", emberi fehérvérsejt antigén). Ezeket az emberi 6-os kromoszóma HLA-régiója kódolja.

A HLA-molekulák két osztálya különíthető el aszerint, hogy a kromoszóma melyik régiója kódolja őket, melyik T-sejt alcsoporttal reagálnak és ezáltal elsősorban mely T-sejteket aktiválják. Az I. osztályba sorolt molekulákat a HLA A, B és C allokuszok kódolják, ezek elsősorban a CD8+ citotoxikus T-sejteket aktiválják. A II. osztályba sorolt molekulákat a DR, DP és DQ allokuszok kódolják, ezek elsősorban a CD4+, segítő és citotoxikus T-sejteket aktiválják.

Minden egyes személy rendszerint hat HLA-I osztályú molekulával rendelkezik, mégpedig kettő-kettővel a három, A, B és C jelölésű csoportból. Ehhez hasonlóan mindenkinben megtalálhatók a DP, DQ és DR jelzésű csoportokból származó, csoportonként két HLA-II osztályú molekula egyedi kombinációi. Az A, B, C, DP, DQ és DR csoportok mindegyike több alcsoportra bontható. Bizonyos esetekben a különböző HLA-I

és HLA-II molekulák száma a két HLA-alcsoport közötti átfedés miatt kevesebb a megszokottnál.

A géntermékek mindegyike nagyfokban polimorf. Különböző személyek így másokétól elkülönült HLA-molekulákat expresszálnak. Szervátültetések esetén emiatt nehéz megfelelő HLA-csoportazonosságú donorokat találni. A HLA-molekulák genetikai változatosságának immunbiológiai jelentőségét jól tükrözi immunválaszgénként betöltött szerepük. Peptidkötő képességük által a HLA-molekulák jelenléte vagy hiánya határozza meg egy egyén peptid epitópokra adott válaszreakcióját. Ennek következtében a megbetegedésre való fogékonyságot vagy a vele szembeni ellenálló képességet a HLA-molekulák határozzák meg.

A T-sejtek számos úton szabályozhatják a rendellenes proteineket termelő sejtek kifejlődését és növekedését. A csak HLA-I osztályú molekulákkal rendelkező CD8+, valamint a csak HLA-II osztályú molekulákat tartalmazó CD4+ citotoxikus T-sejtek képesek lehetnek a megfelelő antigéneket hordozó sejtek közvetlen elpusztítására. A CD4+ segítő T-sejtekre szükség van a CD8+ citotoxikus T-sejtes válaszreakciókban, az ellenanyag-termelés területén, valamint a makrofágok és a LAK-sejtek okozta sejtpusztítás során.

A HLA-I és HLA-II osztályú kötődéssel szembeni közös követelmény, hogy a peptideknek tartalmaznia kell egy, a különböző HLA-csoportok és -alcsoportok esetében általában eltérő kötődési motívumot. A kötődési motívumnak a peptid bizonyos pozícióiban meghatározott, például nagy és hidrofób vagy pozitív töltésű oldalláncokat tartalmazó aminosá-

vakból kell felépülnie, úgy, hogy szorosan illeszkedjék a HLA kötő barázdájának zsebeivel. Ennek és a kötő barázdában a peptid korlátozott, 8-10 aminosavas hosszúságának köszönhetően nagyon kevéssé valószínű, hogy az egy bizonyos típusú HLA-I osztályú molekulákhoz kötődő peptid másik típushoz is kötődne. Ennek megfelelően például nagyon valószínű, hogy az egyaránt az I. osztályba tartozó HLA-A1 és HLA-A2 alcsoportok peptidkötő motívumai annyira különböznek egymástól, mint a HLA-A1 és HLA-B1 molekulák motívumai.

Ugyanebből az okból kifolyólag nem valószínű, hogy a különböző II. osztályú molekulák kötő barázdájában pontosan ugyanaz az aminosav-szekvencia fordulna elő. A HLA-II osztályba sorolt molekulák esetében a peptidek kötődési szekvenciái hosszabbak lehetnek, általában 10-16 aminosavat tartalmaznak, amelyek közül néhány az egyik vagy másik terminálisnál nem része a HLA-barázda kötődési motívumának.

Ugyanakkor számos HLA-I és HLA-II osztályú molekula különböző peptidkötő motívumai között átfedések is előfordulhatnak. A legalább két különböző HLA-molekulára vonatkozóan kötődési szekvenciáikban átfedéseket tartalmazó peptideket "nested" („beágyazott”) T-sejt-epitópokat tartalmazóknak nevezzük. Az egy "nested epitóp peptid"-ben található különböző epitópok kialakulhatnak a peptid antigénbemutató sejtek általi feldolgozásán és különböző HLA-molekulákat kötő különböző T-sejteknek történő bemutatásán keresztül. Emberekben a HLA-molekulákban meglévő egyedi változatosság miatt a "nested" epitópokat tartalmazó peptidek alkalmasabbak vakcinakészítésre, mint azok, ame-

lyek csak egy meghatározott típusú HLA-molekulához képesek kötődni.

Egy beteg csak akkor vakcinázható hatékonyan, ha legalább egyféle HLA-I és/vagy HLA-II osztályú molekulája kötődni képes vagy egy teljes hosszúságú vakcinapeptidhez, vagy annak a beteg saját antigénbemutató sejtjei által feldolgozott és megrövidített változatához.

Egy peptid annál alkalmasabb a populáció többsége számára hasznos általános vakcina előállítására, minél nagyobb számú különböző HLA-molekulához képes kötődni vagy teljes hosszúságú, vagy antigénbemutató sejtek által feldolgozott és megrövidített formájában.

Mutáns gén által kódolt proteinből származó peptidek CD4+ és/vagy CD8+ T-sejtek képződését elősegítő vakcinaként vagy gyógyászati hatóanyagként történő felhasználása érdekében a kérdéses mutáns gén vizsgálatára és olyan peptidek azonosítására van szükség, amelyek az antigénbemutató sejtek által rövidebb peptidekké történt feldolgozásukat követően T-sejt stimuláló hatással rendelkeznek.

A találmány szerinti megoldással az alábbi problémát oldottuk meg.

Jelenleg nem áll rendelkezésre az Alzheimer-kórban szenvedő betegek agyában a degeneratív folyamatokért felelős rendellenes proteineket termelő sejtek eltávolítására alkalmas gyógyszeres vagy egyéb kezelési eljárás. Folyamatos igény mutatkozik ugyanakkor az Alzheimer-kór kezelésére és megelőzésére. A találmány szerinti megoldás új, az

Alzheimer-kór kezelésére és megelőzésére alkalmas peptidket biztosít.

A találmány szerinti peptidek Down-kóros betegek kezelésére szintén alkalmazhatók.

Az alábbiakban röviden ismertetjük a találmány szerinti megoldást.

A találmány szerinti megoldás fő célja Alzheimer- és/vagy Down-kóros betegekben előforduló rendellenes β APP és Ubi-B proteinek peptidfragmenseinek megfelelő, T-sejtek stimulációjára alkalmas peptidek előállítása.

A találmány szerinti megoldás egy másik fő célja betegekben a találmány szerinti peptidekkel *in vivo* vagy *ex vivo* stimulált T-sejteknek köszönhetően kialakuló T-sejtes immunitáson alapuló, Alzheimer-kór kezelésére alkalmas terápia kifejlesztése.

A találmány szerinti megoldás harmadik fő célja a részben vagy teljes egészében a találmány szerinti peptideknek megfelelő peptideken alapuló, az Alzheimer-kór kialakulásának megelőzésére alkalmas vakcina kifejlesztése, amely alkalmas a mutáns β APP és mutáns Ubi-B proteineket termelő sejtekkel szemben citotoxikus hatású T-sejtes immunitást kiváltó T-sejtek előállítására és aktiválására.

A találmány szerinti megoldás negyedik fő célja legalább egy találmány szerinti peptid beadását magában foglaló, személyre szabott specifikus Alzheimer-kór kezelésére alkalmas terápia vagy megelőző kezelés tervezése ilyen kezelést vagy megelőzést igénylő egyén részére.

A találmány szerinti megoldás ötödik célja Down-kóros betegek kezelésére alkalmas kezelés biztosítása az Alzheimer-kór kezelésénél alkalmazottal megegyező eljárással.

A találmány ezen és további céljai a csatolt igénypontokban foglaltak által valósulnak meg.

Kereteltolódásos mutációk a génekben, valamint a transzkripció vagy az RNS poszttranszkripciós szerkesztése során következhetnek be. Ezek a mutációk korai végkodonokat alakítanak ki, ami a proteinek - néha hosszú - szakaszainak delécióját eredményezi. A kereteltolódásos mutációkat tartalmazó proteineket általában nem tekintik immunogénnek és emiatt immunterápiás célpontoknak sem. Emiatt volt meglepő az a felismerésünk, hogy Alzheimer- és Down-kór esetén kialakuló kereteltolódásos mutációkból származó rendellenes proteineknek megfelelő új peptidek egész csoportja alkalmazható eredményesen az ilyen rendellenes proteineket termelő sejtek elleni T-sejtes válaszreakció kiváltása során.

Az ismétlődő mononukleozid-bázisokból, pl. dezoxiadenozin bázisokból álló szekvenciát, vagy ismétlődő dinukleozid-bázisokból, pl. dezoxi-citozin-dezoxi-timidinből álló szekvenciát tartalmazó gének fogékonyak a kereteltolódásos mutációkra. A kereteltolódásos mutációk az ismétlődést tartalmazó szekvenciában vagy a mononukleozid-bázisok, vagy a dinukleozid egységek közül egy vagy kettő inszerciójával, vagy a mononukleozid-bázisok, vagy a dinukleozid-egységek közül egy vagy kettő deléciójával alakulnak ki. A kereteltolódásos mutációt tartalmazó gén a mu-

táció helyétől kezdve új, a természetes génterméktől teljes mértékben eltérő aminosav-szekvenciájú proteint kódol. Ez, a karboxi-terminálisán új aminosav-szekvenciával rendelkező mutáns protein a módosult gént hordozó összes sejtre nézve specifikus.

A továbbiakban a találmány szerinti részletes leírásban és igénypontokban a "kereteltolódásos mutáns peptidek" alatt az ilyen proteineket, valamint azok peptidfragmenseit értjük.

Ezek a legalább 8 aminosav hosszúságú peptidek Alzheimer- és/vagy Down-kór esetén előforduló kereteltolódásos mutáns β APP és/vagy Ubi-B proteineknek felelnek meg.

Egy találmány szerinti peptid a következő jellemzők mindegyikével rendelkezik:

(a) legalább 8 aminosav hosszúságú, és egy Alzheimer- és/vagy Down-kór esetén előforduló kereteltolódásos mutáció eredményeként keletkező mutáns β APP és/vagy Ubi-B protein fragmense; és

(b) a mutáns β APP és/vagy Ubi-B protein mutáns részéből legalább egy aminosavat tartalmaz; és

(c) a mutáns szekvencia amino-terminálisát megelőző ép proteinszekvencia karboxi-terminálisából 0-10 aminosavat tartalmaz, de a releváns kereteltolódásos mutáció által kialakított új végkodon által meghatározott módon a protein mutáns részének karboxi-terminálisáig is terjedhet; és

(d) vagy teljes hosszúságú, vagy antigénbemutató sejt általi feldolgozást követően létrejött formájában T-sejtes válaszreakciókat vált ki.

A találmány szerinti peptidek előnyösen 8-25, 9-20, 9-16, 8-12 vagy 20-25 aminosavat tartalmaznak. Így például tartalmazhatnak 9, 12, 13, 16 vagy 21 aminosavat.

Legelőnyösebb, ha a találmány szerinti peptidek legalább 9 aminosav hosszúságúak, például 9-18 aminosavat tartalmaznak, de az antigénbemutató sejtek feldolgozó képességének köszönhetően hosszabb peptidek is alkalmasak a találmány szerinti megoldásra. Így a találmány tárgyát képező kereteltolódásos mutáns peptid lehet a teljes mutáns aminosav-szekvencia is, feltéve, hogy 8 vagy több aminosavat tartalmaz.

A találmány tárgyát képezi továbbá egy, Alzheimer-kórra hajlamos személy vakcinázására alkalmas eljárás, amely a találmány szerinti legalább egy peptid egy vagy több alkalommal, a mutáns β APP és/vagy Ubi-B proteinek elleni T-sejtes immunitás kiváltásához megfelelő mennyiségben történő beadásából áll.

A találmány tárgyát képezi továbbá egy, Alzheimer-kórban szenvedő beteg kezelésére alkalmas eljárás, amely a találmány szerinti legalább egy peptid egy vagy több alkalommal, a mutáns β APP és/vagy Ubi-B proteinek elleni T-sejtes immunitás kiváltásához megfelelő mennyiségben történő beadásából áll.

A találmány tárgyát képezi továbbá egy, Down-kórban szenvedő beteg kezelésére alkalmas eljárás, amely a találmány szerinti legalább egy peptid egy vagy több alkalommal, a mutáns β APP és/vagy Ubi-B proteinek elleni T-sejtes immunitás kiváltásához megfelelő mennyiségben történő beadásából áll.

Az alábbiakban részletesen ismertetjük a találmány szerinti megoldást.

A leírásban és az igénypontokban az aminosavakat szakember számára ismert módon, egybetűs rövidítésükkel jelöljük.

A találmány szerinti peptideket az Alzheimer- és Down-kór esetén előforduló β APP és Ubi-B kereteltolódásos mutációkkal szemléltetjük.

Alzheimer- és Down-kóros betegekben a gomolyagok, neurofil fonalak és neuritikus plakkok formájában kialakuló intra- és extracelluláris proteinlerakódások összefüggésbe hozhatók a dementiához vezető rendellenes idegrendszeri működéssel [R. D. Terry és mtsai.: Alzheimer Disease 179-196; szerk.: R.D. Terry, R. Katzmann, K.L. Bick, kiad.: Raven, New York (1994)]. Ezekről a proteinlerakódásokról kimutatták, hogy rendellenes karboxi-terminálissal rendelkező β -amiloid prekursor protein (β APP) és ubiquitin-B (Ubi-B) alakokat tartalmaznak, amelyek valószínűleg a transzkripció vagy az RNS poszt-transzkripcionális szerkesztése során bekövetkező kereteltolódásos mutációk eredményeként jönnek létre (F. W. van Leeuwen és mtsai.: Science 279, 242-247).

A β APP esetében kétféle kereteltolódásos mutáció figyelhető meg; az egyik a 9-es exonon egy dezoxi-guanozin-dezoxi-adenozin (GA) dinukleozid-egységnek a (ACC)GAGAGAGA(ATG) szekvenciából, a másik a 10. exonon egy GA-egységnek a (CAT)GAGAGA(ATG) szekvenciából történő deléciójával alakul ki. A kereteltolódásos mutációk eredményeként létrejött mutáns β APP-peptideket az 1. táblázat mutatja be. A szekvencialistában az 1. és a 4. azonosítószámon a β APP proteinszekvencia mutáns részének szekvenciáit, a 2., a 3. és az 5. azonosítószámon pedig az aminos terminálison normál β APP-szekvenciában folytatódó mutáns peptideket adjuk meg.

1. táblázat

normál β APP;	RLEAKHRERMSQVMREWEEAERQAKNLPK
1. a. sz. sz.	NVPGHERMGRGRTSSKELA
2. a. sz. sz.	RLEAKHRENVPGHERMGRGRTSSKELA
3. a. sz. sz.	RLEAKHRENVPGHERMG
4. a. sz. sz.	MGRGRTSSKELA
5. a. sz. sz.	ERMSQVMRMGRGRTS

Az Ubi-B esetében szintén kétféle kereteltolódásos mutáció figyelhető meg; az egyik az exonon a dezoxi-guanozin-dezoxi-timidin (GT) dinukleozid-egységnek a (TCT)GAGAGGT(GGT) szekvenciából, a másik a 2. exonon egy dezoxi-citozin-dezoxi-timidin (CT) egységnek a (TCA)CTCT(GGA) szekvenciából történő deléciójával alakul ki. A kereteltolódásos mutációk eredményeként létrejött mu-

táns β APP-peptideket a 2. táblázat mutatja be. A szekven-
cialistában a 6. és a 9. azonosítószámon az Ubi-B protein-
szekvencia mutáns részének szekvenciáit, a 7., a 8. és a
10. azonosítószámon pedig az amino-terminálison normál Ubi-
B-szekvenciában folytatódó mutáns peptideket adjuk meg.

2.táblázat

normál Ubi-B	HLVLRLRGGMQIFVKTLTGKTITLEVEPSD
6. a. sz. sz.	YADLREDPDRQDHHPGSGAQ
7. a. sz. sz.	HLVLRLRGYADLREDPDRQDHHPGSGAQ
8. a. sz. sz.	HLVLRLRGYADLREDPD
9. a. sz. sz.	GCGAQ
10. a. sz. sz.	TLTGKTITGCGAQ

A mutáns β APP és Ubi-B proteineket csak azok a sejtek
kódolják, amelyekben megfelelő kereteltolódásos mutáció
történt és amelyek ezáltal az Alzheimer- és Down-kór speci-
fikus immunterápiájának célpontjai lehetnek.

A találmány szerinti megoldásnak megfelelően a mutáns
 β APP és mutáns Ubi-B proteineknek megfelelő peptidek alkal-
masak T-sejtes immunitás előidézésére és Alzheimer- és
Down-kóros betegekben az idegrendszer dementiához vezető
rendellenes működésével összefüggő mutáns β APP és mutáns
Ubi-B proteineket termelő sejtek specifikus elpusztítására.

A találmány tárgyát képezik a fenti, 1. és 2. táblá-
zatban szereplő peptidek fragmensei is. Ezek a fragmensek
legalább 9-16 aminosav hosszúságúak és a protein mu-
táns részéből legalább egy aminosavat tartalmaznak.

A találmány részletes leírásában és az igénypontokban alkalmazott "fragmens" kifejezés alatt egy hosszabb peptid vagy protein rövid részletét értjük.

Szintézis

A peptideket folyamatos áramlású szilárd fázisú peptidszintézissel állítottuk elő, amelyhez megfelelő oldallánc-védelemmel ellátott N-a-Fmoc-aminosavakat alkalmaztunk. Az Fmoc-aminosavakat a kapcsoláshoz pentafluorofenil-észterként aktiváltuk, vagy a kapcsolás előtt TBTU- vagy diizopropil-karbodiimid-aktiválásnak vetettük alá. Minden egyes kapcsolás után az Fmoc szelektív eltávolítására 20% piperidint tartalmazó DMF-t alkalmaztunk. A gyantáról történő lehasításra és az oldallánc-védelem végső eltávolítására megfelelő gyökfogókat tartalmazó 95%-os TFA-t vettünk igénybe. A peptideket reverz fázisú (C18) HPLC-vel tisztítottuk és vizsgáltuk. A peptidek azonosítása elektroporlasztásos tömegspektroszkópiával (Finnigan mat SSQ710) történt.

A peptidek szintézisére számos egyéb, szakember számára jól ismert eljárás is igénybevehető.

A találmány szerinti peptidek kereteltolódásos mutáns β APP és Ubi-B proteineket termelő sejtekkel rendelkező Alzheimer- és Down-kóros betegek kezelésére alkalmazhatók, amely gyógykezelés során az ilyen kezelésre szoruló betegnek a találmány szerinti legalább egy peptid *in vivo* vagy *ex vivo* beadására kerül sor.

A találmány egy további megvalósítási módjában a találmány szerinti peptidek Alzheimer-kór kialakulására hajlamos emberek vakcinázására alkalmazhatók, ami legalább egy találmány szerinti peptidnek az említett embernek történő beadásával valósítható meg.

Előnyösnek tekinthető továbbá a találmány szerinti peptidek keverékének emberbe történő juttatása is, amely peptidek mindegyike a beteg más-más típusú HLA-I vagy HLA-II osztályú molekulájához képes kötődni.

Az immunválasz fokozása érdekében a peptidek szakember számára ismert módon különböző vegyületekkel, mint pl. citokinekkal és/vagy növekedési faktorokkal, pl. interleukin-2-vel (IL-2-vel), interleukin-12-vel (IL-12-vel), granulocita makrofág kolónia stimuláló faktorral (GM-CSF-ral) stb. együttesen, egyidejűleg vagy külön-külön adva is alkalmazhatók.

A találmány tárgyát képező peptidek önmagukban vagy egyéb anyagokkal, pl. standard adjuvánsokkal, vagy lipopeptid-konjugátummal [ami szakember számára ismert módon magas affinitású citotoxikus T-lymphocyták képződését eredményezi, ld. Deres, K., Nature 342, (1989)] történő kombinációban vakcinában vagy gyógyászati hatóanyagban alkalmazhatók.

A találmány tárgyát képező peptidek eredményesen alkalmazhatók lehetnek peptid- vagy rekombináns fragmens alapú vakcinában.

A találmány tárgyát képező peptidek szokásos adalékanyagokkal, oldószerekkel, stabilizáló szerekkel vagy hasonló anyagokkal együtt szakember számára ismert módon gyógyászati hatóanyagokba vagy vakcinákba foglalhatók.

A találmány szerinti megoldásban egy gyógyászati készítmény vagy vakcina a találmány szerinti peptideket vagy önmagukban, vagy legalább egy gyógyászati szempontból elfogadható hordozóanyaggal vagy oldószerrel együtt tartalmazza.

Egy vakcina vagy gyógyászati készítmény tartalmazhat továbbá az Alzheimer- és Down-kór esetén kialakuló mutáns β APP és Ubi-B proteinek fragmenseinek megfelelő peptidsorozatot is.

A találmány szerinti vakcina Alzheimer- és Down-kórral összefüggésben kialakuló kereteltolódásos β APP és Ubi-B mutációt magukban hordozó sejtek elleni T-sejtes immunitást kiváltó peptidkeverékként beadható továbbá az általános populációnak is.

A találmány szerinti peptidek egyedileg vagy peptidkeverék részeként is alkalmazhatók. Alternatív módon, a peptideket kovalens kötéssel összekapcsolva nagyobb polipeptidek, vagy akár ciklikus polipeptidek is nyerhetők.

A találmány tárgyát képező Alzheimer- és Down-kór kezelésére alkalmas terápia *in vivo* vagy *ex vivo* is alkalmazható, fő célja az Alzheimer- és Down-kórral összefüggésben kialakuló mutáns β APP és Ubi-B géntermékek elleni specifikus T-sejtes immunitás előidézése.

A találmány szerinti kereteltolódásos mutáns peptidek különböző módokon adhatók be egy betegnek, így többek között, de nem kizárólag szubkután, intramuscularisan, intradermálisan, intraperitonealisan, intravénásan stb. A találmány egy megvalósítási módjában a peptidek beadása intradermálisan történik. A peptidek gyógyászati vagy megelőzési szempontból hatékony adagja egy vagy több helyre elosztva adható be egy betegnek.

A találmány szerinti peptidek beadhatók egy vagy több alkalommal, például 1-2 hónap alatt hetente egyszer, majd később ismételve, a kezelés alatt álló páciens igényeinek megfelelően.

A találmány szerinti peptidek dózisa egy átlagos, vakcinázandó beteg esetében 1 mikrogramm (μg) és 1 gramm (g) között változhat. A beadáshoz előnyös kisebb, 1 mikrogramm (μg) és 1 milligramm (mg) közötti dózist választani.

A találmány tárgyát képezik továbbá kereteltolódásos mutáns peptidet kódoló DNS-szekvenciák is.

A találmány szerinti peptidek DNS-vakcinaként is beadhatók egy páciensnek. A peptideket kódoló DNS klónozott plazmid DNS vagy szintetikus oligonukleotid egyaránt lehet. A DNS citokinekkal, pl. IL-2-vel és/vagy egyéb ko-stimulátor molekulákkal együtt is alkalmazható. A citokinek és/vagy ko-stimulátor molekulák maguk is plazmid vagy oligonukleotid DNS formájában alkalmazhatók. Kimutatták, hogy immunstimuláns DNS-szekvenciák (ISS) jelenlétében egy DNS-vakcina fokozott válaszreakciót vált ki. Ezek a követ-

kező képletnek megfelelő metilált CpG-t tartalmazó hexamer motívumok alakjában fordulhatnak elő: 5'-purin-purin-CG-pirimidin-pirimidin-3'. A találmány szerinti DNS-vakcinák a peptideket, a citokineket vagy egyéb ko-stimulátor molekulákat vagy mindkettőt kódoló DNS-ben magukban foglalhatnak ilyen vagy egyéb ISS-eket. A DNS-vakcinázás előnyeinek áttekintése olvasható Tighe és mtsai. közleményében [Tighe és mtsai., Immunology Today 19(2), 89-97 (1998)].

A találmány egy megvalósítási módjában a mutáns β APP és mutáns Ubi-B peptideket kódoló DNS-szekvenciák a következőket tartalmazzák.

Természetes β APP génszekvencia (9. és 10. exon)

1. ismétlődés

GAG AGG CTT GAG GCC AAG CAC CGA GAG AGA ATG TCC CAG GTC ATG

2. ismétlődés

AGA GAA TGG GAA GAG GCA GAA CGT CAA GCA AAG AAC TTG CCT AAA

Mutáns β APP génszekvencia, GA-deléció az 1. ismétlődésből.

GAG AGG CTT GAG GCC AAG CAC CGA GAG AAT GTC CCA GGT CAT GAG
AGA ATG GGA AGA GGC AGA ACG TCA AGC AAA GAA CTT GCC TAA

Mutáns β APP génszekvencia, GA-deléció a 2. ismétlődésből.

GAG AGG CTT GAG GCC AAG CAC CGA GAG AGA ATG TCC CAG GTC ATG
AGA ATG GGA AGA GGC AGA ACG TCA AGC AAA GAA CTT GCC TAA

Természetes Ubi-B gén (exon) szekvencia.

deléciós motívum

CAC CTG GTC CTG CGT CTG AGA GGT GGT ATG CAG ATC TTC GTG AAG
ACC CTG ACC GGC AAG ACC ATC ACC CTG GAA GTG GAG CCC AGT GAC

Mutáns Ubi-B génszekvencia, GT-deléció a deléciós motívumból.

CAC CTG GTC CTG CGT CTG AGA GGG TAT GCA GAT CTT CGT GAA GAC
CCT GAC CGG CAA GAC CAT CAC CCT GGA AGT GGA GCC CAG TGA

Természetes Ubi-B gén (2. exon) szekvencia

CAC CTG GTC CTG CGT CTG AGA GGT GT ATG CAG ATC TTC GTG AAG

CT-ismétlődés

ACC CTG ACC GGC AAG ACC ATC ACT CTG GAG GTG GAG CCC AGT GAC

Mutáns Ubi-B génszekvencia, CT-deléció a CT-ismétlődésből.

CAC CTG GTC CTG CGT CTG AGA GGT GGT ATG CAG ATC TTC GTG AAG
ACC CTG ACC GGC AAG ACC ATC ACT GGA GGT GGA GCC CAG TGA

A találmány tárgyát képezik továbbá legalább egy kereteltolódásos mutáns β APP és Ubi-B peptidet kódoló DNS-szekvenciát tartalmazó vektorok és plazmidok is. Ilyen vektorok többek között, de nem kizárólag az *E. coli* plazmid, egy *Listeria* vektor és a rekombináns vírusvektorok. Rekombináns vírusvektorok többek között az ortopox vírus, a kanárivírus, a capripox vírus, a suipox vírus, a vaccinia-vírus, a baculovírus, az emberi adenovírus, az SV40 vírus, a szarvasmarha papillomavírus és a mutáns β APPP és/vagy

Ubi-B peptideket kódoló DNS szekvenciát tartalmazó további vírusok.

Alzheimer- és Down-kór kezelésére vagy Alzheimer-kór megelőzésére alkalmas hatás érhető el egy kereteltolódásos mutáns peptidet kódoló DNS-szekvenciát tartalmazó, legalább egy inszerciós helyet magában foglaló rekombináns vírusvektor vagy plazmid hatékony mennyiségének páciensbe juttatásával, amennyiben a páciens antigénbemutató sejtjei a vektor/plazmid szempontjából gazdasejtté válnak és megvalósul a HLA-kereteltolódásos mutáns peptid komplex bemutatása.

Szakember a találmány szerinti peptidek alkalmazására egyéb módokat is találhat, amelyeket szintén a csatolt szabadalmi igénypontok oltalmi körébe tartozónak tekintünk.

A találmány szerinti peptidek szakember számára ismert hagyományos eljárásokkal, így pl. kémiai peptid-szintézissel, rekombináns DNS-technológiával vagy egy kereteltolódásos mutáns β APP- és Ubi-B gén által kódolt protein vagy peptid proteázzal végzett hasításával állíthatók elő. A kémiai szintézis egy eljárását ismertetjük a leírásban.

A találmány szerinti megoldás a következő előnyöket nyújtja.

Lehetővé teszi kereteltolódásos mutáns β APP és Ubi-B géntermékekkel összefüggésben kialakult Alzheimer- és Down-kórban szenvedő betegek gyógykezelését, akik számára jelenleg nem állnak rendelkezésre hatékony kezelési alternatívák.

A találmány szerinti megoldás lehetőséget biztosít továbbá emberek Alzheimer-kór elleni megelőző célzatú vakcinázására.

SZEKVENCIALISTA

A SZEKVENCIÁK JELLEMZŐI:

TÍPUSA: peptid

SZEKVENCIA EGYSÉG: aminosav

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

AZ 1. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA HOSSZA: 19 aminosav

N V P G H E R M G R G R T S S K E L A

1 5 10 15

A 2. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA HOSSZA: 27 aminosav

R L E A K H R E N V P G H E R M G R G R T S S K E L A

1 5 10 15 20 25

A 3. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA HOSSZA: 17 aminosav

R L E A K H R E N V P G H E R M G

1 5 10 15

A 4. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA HOSSZA: 12 aminosav

M G R G R T S S K E L A

1 5 10

AZ 5. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA HOSSZA: 15 aminosav

E R M S Q V M R M G R G R T S

1 5 10 15

A 6. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA HOSSZA: 20 aminosav

Y A D L R E D P D R Q D H H P G S G A Q

1 5 10 15 20

A 7. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA HOSSZA: 28 aminosav

H L V L R L R G Y A D L R E D P D R Q D H H P G S G A Q

1 5 10 15 20 25

A 8. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA HOSSZA: 17 aminosav

H L V L R L R G Y A D L R E D P D

1 5 10 15

A 9. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA HOSSZA: 5 aminosav

G G G A Q

1 5

A 10. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA HOSSZA: 13 aminosav

T L T G K T I T G G G A Q

1 5 10

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Alzheimer-kór vagy Down-kór kezelésére alkalmas peptid, amely

a, Alzheimer-kórral vagy Down-kórral összefüggő kereteltolódásos mutáció eredményeként keletkezett mutáns β APP vagy Ubi-B protein fragmense, és

b, a mutáns β APP vagy Ubi-B protein mutáns részéből legalább egy aminosavat tartalmaz, és

c, a mutáns szekvencia amino-terminálisát megelőző ép proteinszekvencia karboxi-terminálisából 0-10 aminosavat tartalmaz és a protein mutáns részének a kereteltolódásos mutáció eredményeként kialakult új végkodon által meghatározott karboxi-terminálisáig terjedhet,

ahol a b, és c, pontban szereplő aminosavak száma összesen legalább 8, és

d) vagy teljes hosszúságú vagy antigénbemutató sejt által végzett feldolgozását követően elnyert alakjában T-sejtes válaszreakció kiváltására képes.

2. Az 1. igénypont szerinti peptid, amely 8-25 aminosav hosszúságú.

3. Az 1. igénypont szerinti peptid, amely 9-20 aminosav hosszúságú.

4. Az 1. igénypont szerinti peptid, amely 9-16 aminosav hosszúságú.

5. Az 1. igénypont szerinti peptid, amely 8-12 aminosav hosszúságú.

6. Az 1. igénypont szerinti peptid, amely 20-25 aminosav hosszúságú.

7. Az 1. igénypont szerinti peptid, amely 9 aminosav hosszúságú.

8. Az 1. igénypont szerinti peptid, amely 12 aminosav hosszúságú.

9. Az 1. igénypont szerinti peptid, amely 13 aminosav hosszúságú.

10. Az 1. igénypont szerinti peptid, amely az 1-10. azonosítószámon megadott szekvenciákat vagy fragmenseik bármelyikét tartalmazó peptidek bármelyike.

11. Gyógyászati készítmény, amely a fenti igénypontok bármelyike szerinti peptidet és gyógyászati szempontból elfogadható vivőanyagot vagy oldószert tartalmaz.

12. Alzheimer-kór elleni vakcina, amely az 1-10. igénypontok bármelyike szerinti peptidet és gyógyászati szempontból elfogadható vivőanyagot vagy oldószert tartalmaz.

13. Az 1-10. igénypontok bármelyike szerinti peptid alkalmazása Alzheimer-kór kezelésére vagy megelőzésére vagy Down-kór kezelésére szolgáló gyógyászati készítmény előállítására.

14. Alzheimer-kórra hajlamos vagy abban szenvedő személy vakcinázására szolgáló eljárás, azzal jellemezve, hogy az 1-10. igénypontok bármelyike szerinti legalább egy peptidet egy vagy több alkalommal, az Alzheimer- és/vagy Down-kórral összefüggő mutáns β APP és/vagy mutáns Ubi-B

peptidek elleni specifikus T-sejtes immunitás kiváltásához elegendő mennyiségben adjuk be.

15. A 14. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy minden alkalommal 1 mikrogramm (1 μ g) és 1 gramm (1 g), előnyösebben pedig 1 mikrogramm (1 μ g) és 1 milligramm (1 mg) közötti mennyiségű peptidet vagy proteint adunk be.

16. Eljárás Alzheimer- vagy Down-kórban beteg kezelésére, *azzal jellemezve*, hogy az 1-10. igénypontok bármelyike szerinti egy peptiddel *in vivo* vagy *ex vivo* stimulációt végzünk.

17. A 16. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy minden alkalommal 1 mikrogramm (1 μ g) és 1 gramm (1 g), előnyösebben pedig 1 mikrogramm (1 μ g) és 1 milligramm (1 mg) közötti mennyiségű peptidet vagy proteint adunk be.

18. Alzheimer- vagy Down-kór kezelésére alkalmas izolált DNS-szekvencia, amely az 1. igénypont szerinti kereteltolódásos mutáns peptidet kódoló DNS-szekvenciát vagy annak variánsait tartalmazza.

19. A 18. igénypont szerinti izolált DNS-szekvencia, amely az 1-10. azonosítószámú szekvenciákat vagy azok variánsait tartalmazó peptideket kódolja.

20. A 19-20. igénypontok bármelyike szerinti DNS-szekvencia alkalmazása Alzheimer-kór kezelésére vagy megelőzésére, vagy Down-kór kezelésére szolgáló gyógyászati készítmény előállítására.

10954

21. Eljárás Alzheimer-kórban szenvedő vagy arra hajlamos, vagy Down-kórban szenvedő páciens kezelésére, azzal jellemezve, hogy a 18-19. igénypontok szerinti DNS-szekvenciával *in vivo* vagy *ex vivo* stimulációt végzünk.

22. A 17. igénypont szerinti DNS-szekvenciát tartalmazó plazmid vagy vírusvektor, amely Alzheimer- vagy Down-kórral összefüggő kereteltolódásos mutáns β APP és/vagy Ubi-B peptideket kódol.

23. A 22. igénypont szerinti vektor, amely vektor *E. coli* plazmid, egy *Listeria* vektor vagy rekombináns vírusvektor. A rekombináns vírusvektor többek között, de nem kizárólag ortopox vírus, kanári vírus, capripox vírus, suipox vírus, vacciniavírus, baculovírus, emberi adenovírus, SV40 vagy szarvasmarha papillomavírus.

24. A 22. igénypont szerinti plazmid vagy vírusvektor alkalmazása Alzheimer-kór kezelésére vagy megelőzésére vagy Down-kór kezelésére szolgáló gyógyászati készítmény előállítására.

25. Eljárás Alzheimer-kórban szenvedő vagy arra hajlamos vagy Down-kórban szenvedő páciens kezelésére, azzal jellemezve, hogy a 22. igénypont szerinti vektorral *in vivo* vagy *ex vivo* stimulációt végzünk.

A meghatalmazott:

Danubia

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

Svingor Ádám

29.08.

Irodah.