

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

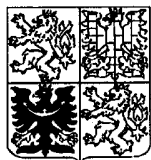
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

3333-98

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **15. 04. 97**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **18.04.96**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **96/634493**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **17. 03. 99**
(Věstník č. 3/99)

(86) PCT číslo: **PCT/EP97/01903**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 97/40149**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

C 12 N	15/12
C 07 K	14/47
A 61 K	38/17
A 01 K	67/027

(71) Přihlášovatel:

AKZO NOBEL N. V., Arnhem, NL;

(72) Původce:

Boots Anna Maria Helena, Megen, NL;
Verheijden Gijsbertus Franciscus Maria,
Oss, NL;
Bos Ebo Sybren, Oss, NL;

(74) Zástupce:

Korejzová Zdeňka JUDr., Břehová 1, Praha
1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Protein a farmaceutický prostředek
s jeho obsahem

(57) Anotace:

Použití autoantigenu HC gp-39 a proteinů obsahujících aminokyselinovou sekvenci, jež vykazuje alespoň 50 % homologi a aminokyselinovou sekvenci HC gp-39, obzvláště s aminokyselinovou sekvencí YKLVCYYTSWSQY-REGDGSCFPDALDRFLCTHIIYSFANISND /SEQ ID NO: 1/ pro antigen-specifickou léčbu destrukce kloubní chrupavky v autoimunitních chorobách savců tím, že se navodí systémová tolerance imunitního systému. Autoantigen HC gp-39 a artritogenní proteiny obsahující aminokyselinovou sekvenci, jež vykazuje alespoň 50 % homologi s aminokyselinovou sekvencí YKLVCYYTSWSQY-EEGSGSCFPDALDRFLCTHIIYSFANISND /SEQ ID NO:1/ jsou rovněž vhodné pro vyvolání artritidy u zvířat, s výhodou u myši. Farmaceutické prostředky, obsahují uvedený autoantigen a/nebo uvedené artritogenní proteiny, způsob diagnostiky na určení autoreaktivních buněk T v testovaném vzorku a testovací soupravy pro použití v uvedeném způsobu diagnostiky.

CZ 3333-98 A3

Protein a farmaceutický prostředek s jeho obsahem

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká nového autoantigenu a jemu příbuzných proteinů, jejich použití v léčbě chronické destrukce kloubní chrupavky při autoimunitních onemocněních, farmaceutických prostředků obsahujících uvedený autoantigen a/nebo proteiny, způsobu diagnostiky pro určení autoreaktivních buněk T v testovaném vzorku a testovací soupravy pro uvedenou diagnostickou metodu.

10 Dosavadní stav techniky

Imunitní systém je založen na schopnosti rozlišit mezi cizími antigeny („non-self“ antigeny) a autoantigeny („self“ antigeny, odvozené z vlastního organismu), již je dosaženo vytvořením tolerance vůči autoantigenům.

15 Imunitní systém chrání jedince před cizími antigeny a na setkání s cizím antigenem odpovídá tím, že aktivuje specifické buňky, jako jsou lymfocyty T a B, a produkuje rozpustné faktory jako interleukiny, protilátky a komplementový systém. Antigen, vůči němuž imunitní systém reaguje, je degradován buňkami prezentujícími antigen (APCs, antigen presenting cells) a fragment antigenu je 20 exprimován na buněčném povrchu v kombinaci s glykoproteiny hlavního histokompatibilitního komplexu (MHC) II. třídy. Komplex glykoprotein MHC - fragment antigenu je předkládán buňce T, která prostřednictvím svého T receptoru rozpozná fragment antigenu 25 společně s proteinem MHC II. třídy, s nímž je svázán. Buňka T je aktivována, tzn. prolifерuje a/nebo produkuje interleukiny, což vede k expansi aktivovaných lymfocytů namířených proti danému antigenu (Grey et al., Sci.Am., 261: 38-46, 1989).

Vlastní antigeny jsou rovněž průběžně degradovány a jako fragmenty antigenu vázané na glykoproteinech MHC předkládány buňkám T (Jardetsky et al., Nature 353:326-329,1991). Sebe rozpoznávání je tedy vlastní imunitnímu systému. Za normálních
5 okolností je imunitní systém tolerantní vůči svým vlastním antigenům a k aktivaci imunitní odpovědi těmito autoantigeny nedochází.

Při ztrátě tolerance vůči vlastním antigenům je imunitní systém aktivován proti jednomu nebo více vlastním antigenům, což vede k aktivaci autoreaktivních buněk T a k produkci autoprotilátek.
10 Tento jev se nazývá autoimunita. Jelikož imunitní odpověď je obecně vzato destruktivní, tzn. má za úkol zničit cizí antigen, který vnikl do organismu, může autoimunitní odpověď způsobit destrukci vlastní tkáně.

Role buněk T v autoimunitních chorobách byla prokázána
15 několika studiemi. U myší je experimentální autoimunitní encefalomyelitida (EAE) zprostředkována velmi úzkou skupinou buněk T, majících společnou specifitu k jedinému epitopu myelinového basického proteinu (MBP) v komplexu s molekulou MHC II. třídy. U laboratorních potkanů inbredního kmene Lewis, tj. kmene s velkou
20 náchylností k různým autoimunitním chorobám, bylo prokázáno, že choroba je zprostředkována buňkami T. U lidí se rovněž předpokládá, že autoimunitní choroby souvisejí se vznikem autoagresivních buněk T.

Na autoimunitní destruktivní odpověď se usuzuje u různých
25 chorob jako je např. revmatoidní artritida (RA), při které dochází k poškození kloubní chrupavky chronickým zánětlivým procesem způsobeným přítomností velkého počtu aktivovaných lymfocytů a buněk exprimujících MHC II. třídy. Pouhá přítomnost chrupavky se zdá být postačující k udržení lokální zánětlivé reakce: bylo prokázáno,
30 že poškození chrupavky při RA souvisí s aktivitou autoreaktivních buněk T namířených proti chrupavce (Sigall et al., Clin.Exp.Rheumat.

6:59, 1988; Glant et al., Biochem.Soc.Trans. 18:796, 1990; Burmester et al., Rheumatoid arthritis, Smolen, Kalden, Maini (Eds) Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1992). Kromě toho, chirurgické odstranění chrupavky vedlo u pacientů s RA k potlačení zánětlivého procesu (G.S.Panayi et al., Clin.Exp.Rheumatol. 11 (suppl.8):S1-S8, 1993). Bílkoviny chrupavky jsou proto považovány za cílové autoantigeny, schopné stimulovat buňky T. Aktivace těchto autoreaktivních buněk T vede ke vzniku autoimunitní choroby. Autoantigenní komponenty, které hrají roli při nastartování revmatoidní artritidy však dosud zůstávají neznámé.

Zánětlivá odpověď vedoucí k destrukci chrupavky může být léčena několika typy léčiv jako jsou například steroidní antirevmatika. Tyto léky však často působí jako imunosupresíva, která jsou nespecifická a mají toxické vedlejší účinky. Vzhledem k nespecifické imunosupresi není tato terapie příliš výhodná.

Lákavou alternativu k nespecifické imunosupresi představuje netoxická, k antigenu specifická, imunosupresivní terapie. Tato terapie specifická vůči antigenu spočívá v tom, že pacientům je podáván cílový autoantigen nebo antigeny mající aminokyselinovou sekvenci, jež vykazuje sekvenční homologii s aminokyselinovou sekvencí cílového autoantigenu, nebo syntetické peptidy odvozené z uvedeného autoantigenu nebo uvedeného antigenu. Tyto syntetické peptidy odpovídají epitopům, vůči nimž jsou namířeny buňky T, a mohou být použity k indukci specifické T-buněčné tolerance jak vůči sobě samým, tak vůči autoantigenu. Ačkoliv se může zdát paradoxní desenzibilizovat imunitní systém právě tím antigenem, který je zodpovědný za aktivaci imunitního systému, regulované podávání cílového (auto)antigenu může být velmi účinným při desenzibilizaci imunitního systému. Desenzibilizace nebo imunologická tolerance imunitního systému je založena na dávno pozorovaném jevu, že zvířata, která byla krmena nebo inhalovala

antigen nebo jeho epitop byla méně schopná vytvořit systémovou imunitní odpověď vůči uvedenému antigenu nebo epitopu, když jim byl následně uvedený antigen nebo epitop podán standardním způsobem.

- 5 Pro účinné využití toleranční terapie na léčbu destrukce chrupavky zprostředkované buňkami T je velmi žádoucí určit zodpovědný autoantigen nebo antigeny mající aminokyselinovou sekvenci, jež vykazuje sekvenční homologii s aminokyselinovou sekvencí cílového autoantigenu, aby bylo možné desenzibilizovat
- 10 pacienty proti autoantigenu, který aktivuje buňky T zodpovědné za zánětlivý proces.

Podstata vynálezu

- Předmětem vynálezu je poskytnout autoantigen a proteiny
- 15 mající aminokyselinovou sekvenci, která vykazuje dostatečnou homologii s aminokyselinovou sekvencí autoantigenu, přičemž uvedený autoantigen a/nebo protein je vhodný k indukci specifické T-buněčné tolerance vůči antigenu chrupavky a je u pacientů trpících destrukcí chrupavky zprostředkovanou buňkami T zodpovědný za
- 20 tento stav. Dalším předmětem vynálezu je poskytnout zvířecí modely artritidy, které by byly vhodné pro systematické testování nových léků pro potlačení symptomů artritidy. Dalším cílem vynálezu je poskytnout způsob detekce autoreaktivních buněk T, které se účastní destrukce kloubní chrupavky a testovací soupravy k použití
- 25 při uvedeném způsobu detekce.

U pacientů trpících RA bylo překvapivě zjištěno, že lidský chrupavkový glykoprotein 39 (dále zde označovaný jako HC gp-39) je cílovým autoantigenem, který aktivuje specifické buňky T, a tím

způsobuje či se podílí na zánětlivém procesu. Artritogenní potenciál HC gp-39 byl potvrzen u myši kmene Balb/c. Jediná podkožní injekce uvedeného proteinu byla u myši Balb/c schopná vyvolat artritické příznaky. Průběh onemocnění vyvolaného HC gp-39 proteinem se vyznačoval pravidelnými relapsy na předních a/nebo zadních tlapkách, a postupným přechodem od mírné artritidy do těžší formy. Rovněž bylo pozorováno symetrické postižení kloubů, což spolu s opakovanými relapsy a tvorbou nodulů připomíná progresi choroby při artritidě, zejména RA.

Ještě překvapivější byl nález, že podávání HC gp-39 vedlo k imunologické toleranci, a co je ještě důležitější, že došlo k oddálení a/nebo potlačení rozvoje artritidy.

Dále bylo překvapivě zjištěno, že proteiny obsahující aminokyselinovou sekvenci, jež vykazuje alespoň 50% homologii s aminokyselinovou sekvencí HC gp-39 jsou schopné po injikování do zvířat vyvolat artritidu. Obzvláště proteiny obsahující aminokyselinovou sekvenci, která vykazuje alespoň 50% homologii s aminokyselinovou sekvencí YKLVCYYTSWSQYREGDGSCFPDALDRFLCTHIIYSFANISND (SEQ ID NO: 1) byly schopné indukovat ve zvířatech artritidu stejným způsobem, jak bylo popsáno pro HC gp-39.

Tyto artritogenní proteiny s výhodou obsahují aminokyselinovou sekvenci, která vykazuje alespoň 70%, výhodněji 80%, ještě výhodněji 90% homologii s aminokyselinovou sekvencí proteinu HC gp-39, obzvláště s aminokyselinovou sekvencí YKLVCYYTSWSQYREGDGSCFPDALDRFLCTHIIYSFANISND (SEQ ID NO: 1).

Procento sekvenční homologie mezi artritogenními proteiny podle vynálezu a aminokyselinovou sekvencí SEQ ID NO: 1 se stanovuje pomocí programů obecně užívaných pro srovnávání

sekvencí, např. FASTA (W.R. Pearson a D. J. Lipman, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 85,2444-2448,1988).

Vhodné artritogenní proteiny podle vynálezu jsou např. prasečí heparin-vazebný 38kDa protein, hovězí syrovátkový 39kDa protein, lidský YKL-39 protein, myší 39kDa protein regredující mléčnou žlázu (brp39, breast regressing protein), lidský ovidukt-specifický glykoprotein, myší ovidukt-specifický glykoprotein, křeččí ovidukt-specifický glykoprotein, hovězí ovidukt-specifický glykoprotein, prekursor lidské chitotriosidasy a prekursor myšího sekrečního proteinu YM-1. Artritogenní proteiny podle vynálezu jsou velmi vhodné k indukci systémové tolerance imunitního systému vůči homologním autoantigenům a mohou být použity k oddálení a/nebo potlačení rozvoje artritidy u savců.

HC gp-39 je přítomen v séru jak pacientů, tak zdravých dospělých jedinců, přičemž koncentrace proteinu je asi dvakrát vyšší u pacientů než u zdravých dospělých. Mimoto se mRNA kódující HC gp-39 protein vyskytuje v synoviálních vzorcích nebo v chrupavce pacientů trpících RA, zatímco chrupavka získaná při chirurgických zákrocích od zdravých dospělých jedinců neobsahuje významné množství této mRNA. Při kultivaci kloubních chondrocytů a synoviálních buněk se jako hlavní sekreční produkt nachází HC gp-39 (Hakala et al., J Biol.Chem. 268 (34):25803,1993). Artritogenní povaha HC gp-39 nebyla ani popsána, ani zmíněna v publikaci Hakala et al., ani v žádné jiné práci.

Byly popsány proteiny, jejichž aminokyselinová sekvence vykazuje alespoň 50% homologii s aminokyselinovou sekvencí HC gp-39, obzvláště s aminokyselinovou sekvencí YKLVCYYTSWSQYREGDGSCFPDALDRFLCTHIIYSFANISND (SEQ ID NO: 1). Shackelton et al. (1995), J Biol.Chem. 270 (22): 13076-13083 popsal prasečí heparin-vazebný 38kDa protein, avšak žádnou funkci tohoto proteinu nestanovil. Izolaci a charakterizaci hovězího

syrovátkového 39kDa proteinu popsal J. J. Rejman et al. (1988), Biochem.Biophys.Res.Comm. 150 (1), 329-334. Myší 39kDa protein regredující mléčnou žlázu (brp39) popisují Morrison a Leder, 1994, Oncogene 9, 3417. Naklonování cDNA kódující lidský ovidukt-
5 specifický glykoprotein a odpovídající aminokyselinová sekvence jsou popsány v Arias et al. (1994), Biology of Reproduction 51, 685-694. Další savčí ovidukt-specifické glykoproteiny jako jsou myší a křeččí ovidukt-specifický glykoprotein jsou zveřejněny v JP-A-07107979, Kinosei Peptide Kenkyusho KK. Purifikace a molekulární klonování
10 hovězího ovidukt-specifického glykoproteinu je popsána v Y. Senday et al., 1994, Biol. of Reprod. 50, 927-934. Prekursor lidské chitotriosidasy je secernován aktivovanými lidskými makrofágy, a klonování odpovídající cDNA a aminokyselinová sekvence jsou popsány v Boot et al. (1995) J Biol.Chem. 270 (44), 26252-26256.
15 Aminokyselinová sekvence prekursoru myšího sekrečního proteinu YM-1 byla postoupena do databáze EMBL Data Library, June 1992, Accession No. M94584 (Chang et al., nepublikováno). Aminokyselinovou sekvenci lidského chondrocytového proteinu YKL-39 popsal Hu et al. (1996), J Biol.Chem. 271 (32), 19415-19420.
20 Žádná z výše uvedených publikací však ani v nejmenším nenaznačuje cokoli o artritogenní povaze proteinů podle vynálezu, ani neuvádí skutečnost, že tyto proteiny by mohly být použity v terapii jako léčebný prostředek k indukci specifické T-buněčné tolerance vůči HC gp-39 u savců, přesněji u lidí, trpících destrukcí chrupavky
25 zprostředkovanou buňkami T, jako je např. artritida, přesněji revmatoidní artritida.

Podle vynálezu jsou tedy HC gp-39 a proteiny obsahující aminokyselinovou sekvenci, jež vykazuje alespoň 50% homologii
30 s aminokyselinovou sekvencí proteinu HC gp-39, obzvláště s aminokyselinovou sekvencí

YKLVCIYYTWSQYREGDGSCFPDALDRFLCTHIIYSFANISND (SEQ ID NO: 1) velmi vhodné pro terapii, kdy indukují specifickou T-buněčnou toleranci vůči HC gp-39 u pacientů trpících destrukcí chrupavky zprostředkovanou buňkami T, jako je např. artritida, přesněji revmatoidní artritida. Vynález se rovněž týká fragmentů proteinu HC gp-39 a artritogenních proteinů podle vynálezu, které jsou schopné v napadené chrupavce indukovat T-buněčnou toleranci vůči HC gp-39 autoantigenu.

Diagnostické využití HC gp-39 jako markeru pro RA je popsáno v dokumentech WO 95/01995 a WO 95/02188, avšak artritogenní povaha HC gp-39 v nich není ani zveřejněna ani navržena. Není v nich ani zmínky či náznaku ohledně použití v předkládaném vynálezu uvedeného proteinu HC gp-39 nebo jeho fragmentů nebo peptidů, vůči nimž reagují buňky T v antigen-specifické terapii navozující v napadené chrupavce T-buněčnou toleranci vůči HC gp-39.

Glykoprotein HC gp-39, artritogenní proteiny obsahující aminokyselinovou sekvenci, jež vykazuje alespoň 50% homologii s aminokyselinovou sekvencí HC gp-39, obzvláště s aminokyselinovou sekvencí YKLVCIYYTWSQYREGDGSCFPDALDRFLCTHIIYSFANISND (SEQ ID NO: 1), a fragmenty odvozené z uvedených artritogenních proteinů podle vynálezu mohou být připraveny pomocí technik rekombinantní DNA. K tomuto účelu se vloží do expresního vektoru nukleová kyselina kódující HC gp-39 nebo protein obsahující aminokyselinovou sekvenci, jež vykazuje alespoň 50% homologii s aminokyselinovou sekvencí HC gp-39, obzvláště s aminokyselinovou sekvencí YKLVCIYYTWSQYREGDGSCFPDALDRFLCTHIIYSFANISND (SEQ ID NO: 1), nebo fragment odvozený z proteinů podle vynálezu nebo

multimér uvedeného fragmentu. Vhodné expresní vektory jsou mj. plasmidy, kosmidy, viry a YACy (Yeast Artificial Chromosome, tj. kvasinkový umělý chromosom), které obsahují potřebné kontrolní oblasti pro replikaci a expresi. Expresní vektor se může přivést
5 k expresi v hostitelské buňce. Vhodné hostitelské buňky jsou např. bakterie, kvasinky a savčí buňky. Takovéto techniky jsou v oboru dobře známé (manuál Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989).

10 Těmito technikami rekombinantní DNA lze připravit v hostitelské buňce hovězí syrovátkový protein, jehož sekvence je zde zveřejněna.

Předkládaný vynález tedy poskytuje rovněž izolovanou cDNA, uvedenou v SEQ ID NO:3, jež kóduje hovězí syrovátkový protein,
15 jakož i hovězí syrovátkový protein podle sekvence SEQ ID NO:2. Je zřejmé, že na základě faktů plynoucích z předkládaného vynálezu mohou být připraveny rovněž fragmenty. Termínem „fragment“ se označuje jakákoli aminokyselinová sekvence, která je částí proteinu a která má společné prvky původu, struktury a mechanismu účinku,
20 jichž se týká předkládaný vynález.

Vhodné fragmenty odvozené z artritogenních proteinů podle vynálezu mohou být též připraveny metodami známými v organické chemii pro syntézu peptidů. Metody organické chemie pro peptidovou syntézu zahrnují spojování požadovaných aminokyselin pomocí
25 kondenzační reakce, buď v roztoku nebo s použitím tzv. pevné fáze. Nejběžnější způsoby provedení výše uvedených kondenzačních reakcí jsou: metoda karbodiimidová, metoda azidová, metoda užívající směsného anhydridu a metoda užívající aktivovaných esterů, jak jsou popsány v The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology Vol. 1-3 (Ed.
30 Gross, E. A Meienhofer, J.) 1979, 1980, 1981 (Academic Press, Inc.).

Příprava vhodných fragmentů výše uvedeného proteinu HC gp-39 a artritogenních proteinů podle vynálezu metodou „pevné fáze“ je popsána např. v J.Am.Chem.Soc. 85: 2149 (1963) a v Int.J.Peptide Protein Res. 35: 161-214 (1990).

5 Obzvláště vhodná pevná fáze je např. p-alkoxybenzyl alkoholová pryskyřice (4-hydroxy-metyl-fenoxy-metyl-kopolystyren-1% divinylbenzen), kterou popsal Wang (1974) J.Am.Chem.Soc. 95:1328. Po syntéze mohou být peptidy od takovéhoho nosiče za mírných podmínek odštěpeny.

10 Po syntéze požadované aminokyselinové sekvence následuje odštěpení peptidu z pryskyřice, např. kyselinou trifluoroctovou v přítomnosti akceptorů, např. triisopropyl silanu, anisolu nebo etandithiolu nebo thioanisolu.

Reaktivní skupiny, které se nemají účastnit kondenzační reakce je třeba účinně chránit skupinami, které mohou být opět
15 snadno odstraněny hydrolyzou pomocí kyseliny, báze nebo redukci. Podrobnější rozbor možných chránících skupin lze najít v The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology Vol. 1-9 (Eds. Gross, Udenfriend a Meienhofer) 1979 - 1987 (Academic Press, Inc.).

20 Chránící skupiny mohou být odštěpeny různými obvyklými metodami v závislosti na povaze konkrétní skupiny, např. pomocí kyseliny trifluoroctové nebo mírnou redukcí, např. vodíkem v přítomnosti katalyzátoru, např. paladia, nebo pomocí HBr v ledové kyselině octové.

25 Přestože se desenzibilizace imunitního systému přesně týmž antigenem, který je za jeho aktivaci zodpovědný může zdát paradoxní, je tento postup založen na dlouho známém úkazu, že zvířata, která byla krmena nebo která vdechla antigen nebo jeho epitop byla méně schopná vytvořit systémovou imunitní odpověď vůči uvedenému
30 antigenu nebo epitopu, když jim byl následně uvedený antigen nebo epitop injikován standardním způsobem. Takže regulované podávání

HC gp-39 a/nebo proteinů obsahujících aminokyselinovou sekvenci, jež vykazuje alespoň 50% homologii s aminokyselinovou sekvencí HC gp-39, obzvláště s aminokyselinovou sekvencí YKLVCYYTWSQYREGDGSCFPDALDRFLCTHIIYSFANISND (SEQ ID NO: 1) může účinně desenzibilizovat imunitní systém. Fragmenty proteinů podle vynálezu, jež jsou schopné desenzibilizovat pacienty vůči HC gp-39 jsou rovněž součástí vynálezu.

Pacienti, jejichž chrupavka je napadána autoreaktivními buňkami T, mohou být podle vynálezu léčeni farmaceutickým prostředkem obsahujícím HC gp-39, jeden nebo více proteinů obsahujících aminokyselinovou sekvenci, jež vykazuje alespoň 50% homologii s aminokyselinovou sekvencí HC gp-39, obzvláště s aminokyselinovou sekvencí YKLVCYYTWSQYREGDGSCFPDALDRFLCTHIIYSFANISND (SEQ ID NO: 1) nebo jeden nebo více fragmentů odvozených z proteinu podle vynálezu, a farmaceuticky přijatelný nosič, aby se specifické autoreaktivní buňky T těchto pacientů staly tolerantními vůči HC gp-39 v napadené chrupavce a došlo ke snížení zánětlivé odpovědi.

Proteiny použitelné pro farmaceutický prostředek podle vynálezu jsou proteiny obsahující aminokyselinovou sekvenci, jež vykazuje alespoň 70%, s výhodou 80%, ještě výhodněji 90% homologii s aminokyselinovou sekvencí HC gp-39, obzvláště s aminokyselinovou sekvencí YKLVCYYTWSQYREGDGSCFPDALDRFLCTHIIYSFANISND (SEQ ID NO: 1).

Proteiny velmi vhodné na použití do farmaceutického prostředku podle vynálezu jsou např. prasečí heparin-vazebný 38kDa protein, hovězí syrovátkový 39kDa protein, myší 39kDa protein regredující mléčnou žlázu (brp39), myší ovidukt-specifický glykoprotein, křeččí ovidukt-specifický glykoprotein, hovězí ovidukt-specifický glykoprotein, lidský YKL-39, lidský ovidukt-specifický glykoprotein,

prekursor lidské chitotriosidasy a prekursor myšního sekrečního proteinu YM-1.

Velmi vhodné pro použití jako farmaceutický prostředek podle vynálezu jsou rovněž DNA (expresní) vektory obsahující DNA, která
5 kóduje HC gp-39 nebo protein obsahující aminokyselinovou sekvenci, jež vykazuje alespoň 50% homologii s aminokyselinovou sekvencí HC gp-39, obzvláště s aminokyselinovou sekvencí YKLVCYYTSWSQYREGDGSCFPDALDRFLCTHIIYSFANISND (SEQ ID NO: 1), nebo jeden nebo více fragmentů odvozených z proteinů
10 podle vynálezu. Po vnesení může DNA (expresní) vektor exprimovat rekombinantní HC gp-39 nebo protein obsahující aminokyselinovou sekvenci, jež vykazuje alespoň 50% homologii s aminokyselinovou sekvencí HC gp-39, obzvláště s aminokyselinovou sekvencí
15 YKLVCYYTSWSQYREGDGSCFPDALDRFLCTHIIYSFANISND (SEQ ID NO: 1), nebo fragmenty podle vynálezu v hladině, která je podobná hladině, jež by byla dosažena přímým podáním farmaceutického prostředku obsahujícího HC gp-39 protein nebo peptidy.

Autoantigen HC gp-39, artritogenní proteiny obsahující
20 aminokyselinovou sekvenci, jež vykazuje alespoň 50% homologii s aminokyselinovou sekvencí HC gp-39, obzvláště s aminokyselinovou sekvencí YKLVCYYTSWSQYREGDGSCFPDALDRFLCTHIIYSFANISND (SEQ ID NO: 1) a fragmenty odvozené z uvedených artritogenních proteinů
25 podle vynálezu jsou výhodné v tom, že narozdíl od nespecifického supresivního účinku steroidních imunosupresív, mají specifický tolerizující účinek na autoreaktivní buňky T, zatímco ostatní složky imunitního systému ponechávají intaktní. Léčba autoantigenem nebo proteiny obsahujícími aminokyselinovou sekvenci, jež vykazuje
30 alespoň 50% homologii s aminokyselinovou sekvencí HC gp-39, obzvláště s aminokyselinovou sekvencí

YKLVCYYTSWSQYREGDGSCFPDALDRFLCTHIIYSFANISND (SEQ ID NO: 1), nebo fragmenty podle vynálezu bude bezpečná, bez toxických vedlejších účinků.

5 Tolerance může být dosaženo podáváním vysokých nebo nízkých dávek autoantigenů nebo proteinů podle vynálezu. Množství autoantigenů nebo proteinů bude závislé na způsobu a délce aplikace, věku pacienta, jakož i na jeho všeobecném zdravotním stavu a výživě.

10 Obecně mohou být použity dávky 0,01 až 1000 μ g, s výhodou 0,5 až 500 μ g, ještě výhodněji 0,1 až 100 μ g proteinu na kg tělesné váhy.

15 Farmaceuticky přijatelné nosiče jsou dobře známé pracovníkům v oboru a zahrnují například sterilní fyziologický roztok, laktosu, sacharosu, fosforečnan vápenatý, želatinu, dextrin, agar, pektin, podzemnicový olej, olivový olej, sezamový olej a vodu. Další nosiče, například molekuly MHC II.třídy, mohou být, je-li to žádoucí, zabudované v liposomech.

20 Farmaceutický prostředek podle vynálezu může navíc obsahovat jedno nebo více adjuvans. Vhodná adjuvans zahrnují mimo jiné hydroxid hlinitý, fosforečnan hlinitý, amfigen, tokofenoly, monofosfenyl lipid A, muramyl dipeptid a saponiny jako je Quill A. Množství adjuvans závisí na vlastnostech samotného adjuvans.

25 Mimoto může farmaceutický prostředek podle vynálezu obsahovat jeden nebo více stabilizátorů jako jsou například karbohydráty vč. sorbitolu, manitolu, škrobu, sacharodextrinu a glukosy, proteiny jako jsou albumin nebo kasein a pufrý, např. fosfátové.

Vhodné způsoby aplikace jsou nitrosvalové injekce, podkožní injekce, nitrožilní injekce nebo intraperitoneální injekce, orální a

intranazální podávání. Orální a intranazální podávání je preferovaným způsobem aplikace.

HC gp-39, jakož i proteiny obsahující aminokyselinovou sekvenci, jež vykazuje alespoň 50% homologii s aminokyselinovou sekvencí HC gp-39, obzvláště s aminokyselinovou sekvencí YKLVCYYTSWSQYREGDGSCFPDALDRFLCTHIIYSFANISND (SEQ ID NO: 1), mohou být díky svým artritogenním vlastnostem použity na vyvolání klinické artritidy u zvířat. Po podání malých množství HC gp-39 nebo jednoho nebo více proteinů obsahujících aminokyselinovou sekvenci, jež vykazuje alespoň 50% homologii s aminokyselinovou sekvencí HC gp-39, obzvláště s aminokyselinovou sekvencí YKLVCYYTSWSQYREGDGSCFPDALDRFLCTHIIYSFANISND (SEQ ID NO: 1) nebo jednoho nebo více fragmentů proteinů podle vynálezu se u uvedených zvířat objeví artritické příznaky vedoucí k obrazu choroby, který připomíná progresi choroby u artritidy, zejména revmatoidní artritidy. Když byly myši kmene Balb/c injikovány podkožně proteinem HC gp-39 nebo proteinem obsahujícím aminokyselinovou sekvenci, jež vykazuje alespoň 50% homologii s aminokyselinovou sekvencí HC gp-39, obzvláště s aminokyselinovou sekvencí YKLVCYYTSWSQYREGDGSCFPDALDRFLCTHIIYSFANISND (SEQ ID NO: 1) objevily se u zvířat artritické příznaky. Průběh choroby vyvolané proteinem HC gp-39, jakož i choroby indukované proteinem obsahujícím aminokyselinovou sekvenci, jež vykazuje alespoň 50% homologii s aminokyselinovou sekvencí HC gp-39, obzvláště s aminokyselinovou sekvencí YKLVCYYTSWSQYREGDGSCFPDALDRFLCTHIIYSFANISND (SEQ ID NO: 1) se vyznačoval pravidelně opakovanými relapsy v předních a/nebo zadních tlapkách a postupným rozvojem artritidy od mírné do těžší formy. Rovněž bylo pozorováno symetrické postižení kloubů ,

což spolu s pozorovanými relapsy a tvorbou nodulů připomíná progresi choroby při artritidě, zejména RA.

Tato postižená zvířata tedy poskytují vhodný zvířecí model pro studium mechanismu vzniku a postupného rozvoje artritidy. Navíc
5 mohou takto postižená zvířata sloužit při vyhledávání nových léků na artritidu a studiu jejich účinku. Jako zvířecí model artritidy, zejména revmatoidní artritidy jsou s výhodou používány myši.

K vyvolání artritidy u uvedených zvířat jim musí být podáno vhodné množství HC gp-39 nebo jednoho nebo více proteinů podle
10 vynálezu. Vhodná množství jsou 0,1 - 1000 μg, s výhodou 1 - 100 μg, ještě výhodněji 10 - 50 μg na kg tělesné váhy. Množství HC gp-39 nebo proteinů obsahujících aminokyselinovou sekvenci, jež vykazuje alespoň 50% homologii s aminokyselinovou sekvencí HC gp-39, obzvláště
15 s aminokyselinovou sekvencí YKLVCYYTSWSQYREGDGSCFPDALDRFLCTHIIYSFANISND (SEQ ID NO: 1) nebo jejich fragmentů bude záviset na způsobu a délce aplikace a na typu použitého zvířete. Vhodné způsoby aplikace jsou shodné s již dříve uvedenými. HC gp-39 protein nebo proteiny obsahující aminokyselinovou sekvenci, jež vykazuje alespoň 50%
20 homologii s aminokyselinovou sekvencí HC gp-39, obzvláště s aminokyselinovou sekvencí YKLVCYYTSWSQYREGDGSCFPDALDRFLCTHIIYSFANISND (SEQ ID NO: 1), nebo peptidy podle vynálezu mohou k vyvolání artritidy obsahovat jeden nebo více stabilizátorů nebo adjuvans, jak již bylo
25 uvedeno.

HC gp-39, proteiny obsahující aminokyselinovou sekvenci, jež vykazuje alespoň 50% homologii s aminokyselinovou sekvencí HC gp-39, obzvláště s aminokyselinovou sekvencí
YKLVCYYTSWSQYREGDGSCFPDALDRFLCTHIIYSFANISND (SEQ ID
30 NO: 1), nebo jejich fragmenty podle vynálezu jsou rovněž velmi vhodné pro využití v diagnostice na určení přítomnosti aktivovaných

autoreaktivních buněk T zúčastněných v chronickém zánětu kloubní chrupavky.

Způsob diagnostiky podle vynálezu zahrnuje následující kroky:

- a) izolace mononukleárních buněk periferní krve (PBMC)
5 ze vzorku odebrané krve,
- b) kultivace uvedených PBMC za vhodných podmínek,
- c) inkubace uvedené kultury PMBC v přítomnosti autoantigenu nebo proteinů podle vynálezu a jejich fragmentů, a
- d) detekce odpovědi buněk T, například proliferační odpovědi,
10 jež indikuje přítomnost aktivovaných autoreaktivních buněk T u testované osoby.

Při detekci odpovědi měřením proliferační odpovědi autoreaktivních buněk T je mírou proliferace inkorporace radioizotopu jako je například ^3H -thymidin. Odpověď autoreaktivních buněk T
15 přítomných v PBMC může být též určena stanovením uvolněného cytokinu pomocí cytokin - specifického testu ELISA nebo stanovením cytotoxicity pomocí testu na uvolnění ^{51}Cr . Další detekční metodou je stanovení exprese markerů aktivace, např. receptoru IL-2R, pomocí FACS analýzy. Diagnostický prostředek obsahující jeden nebo více
20 peptidů podle vynálezu a vhodné detekční činidlo je tedy součástí vynálezu. V závislosti na typu detekce může detekčním činidlem být radioizotop, enzym nebo protilátky specifické pro buněčné povrchové nebo aktivační markery.

Vynález rovněž zahrnuje testovací soupravy, které obsahují
25 jeden nebo více peptidů podle vynálezu. Tyto soupravy jsou vhodné pro použití při způsobu diagnostiky podle vynálezu.

Předkládaný vynález tak poskytuje způsob jak určit, zda pacienti trpící destrukcí chrupavky zprostředkovanou buňkami T, jako např. artritidou, obzvláště revmatoidní artritidou, mají přítomny

autoagresivní buňky T reaktivní vůči proteinu HC gp-39. Jsou-li tyto HC gp-39 - specifické buňky T přítomny, lze oddálit nebo potlačit progresi artritidy tolerizací těchto buněk T pomocí farmaceutického prostředku, který obsahuje HC gp-39 nebo jeden či více artritogenních proteinů obsahujících aminokyselinovou sekvenci, jež vykazuje alespoň 50% homologii s aminokyselinovou sekvencí HC gp-39, obzvláště s aminokyselinovou sekvencí YKLVCYYTSWSQYREGDGSCFPDALDRFLCTHIIYSFANISND (SEQ ID NO: 1), nebo peptidy podle předkládaného vynálezu, nebo nějakou jejich kombinací.

Přehled obrázků na výkresech

Obrázek 1: Začátek a progresse artritidy u myší kmene Balb/c tolerizovaných a netolerizovaných proteinem HC gp-39. AS = celkové artritické skóre postižených zvířat na den po senzibilizaci. N = počet postižených zvířat na den po senzibilizaci.

Obrázek 2: Začátek a progresse artritidy u myší kmene Balb/c po podání 0,2 µg, 1 µg, 5 µg a 25 µg hovězího syrovátkového 39 kDa proteinu. Začátek/progrese je vyjádřen jako kumulativní skóre (celkové arthritické skóre postižených zvířat) na den po senzibilizaci

Následující příklady slouží k ilustraci vynálezu a v žádném případě je nelze chápat jako omezení rozsahu vynálezu.

Příklady provedení vynálezu

PŘÍKLAD 1

METODY

Purifikace HC gp-39 z buněčné linie osteosarkomu MG63

5 Buňky MG63 (lidský osteosarkom, ATCC CRL 1427) byly kultivovány v kultivatorech v bezsérovém médiu DMEM/HAM F12. Protein HC gp-39 byl vyčištěn z buněčného supernatantu afinitní chromatografií na heparinu a dále chromatografií na Superdexu 75. Čistota byla kontrolována pomocí SDS-PAGE. Kromě toho bylo
10 stanovením N-koncové aminokyselinové sekvence potvrzeno, že purifikovaný protein je identický s proteinem, který popsali Hakala et al.

Artritogenita HC gp-39 u myši kmene Balb/c

10 nebo 50 µg purifikovaného HC gp-39 ve 100 µl PBS (0,5M
15 NaCl, 0,01M pufr fosforečnanu sodného pH 7,5) smíchaných v poměru 1:1 s nekompletním Freundovým adjuvans (IFA) bylo injikováno podkožně v hrudní oblasti 2 x 4 samic myši kmene Balb/c (Harlan CPB, Zeist, Holandsko), zatímco 4 kontroly byly injikovány roztokem PBS (1:1 v IFA). U myši byly denně vyšetřovány klinické
20 příznaky artritidy. Závažnost artritidy byla hodnocena skórem pro každou tlapku podle stupnice 0 - 3 (viz článek Glant et al.). Stručně, hodnota skóre 0 = žádné změny, skóre 1 = zarudnutí a zduření, skóre 2 = zduření a výskyt deformit, skóre 3 = nepohyblivost způsobená ztrátou schopnosti ohybu a natažení.

25

Navození tolerance intranazální aplikací HC gp-39

28 µg proteinu bylo aplikováno intranazálně (2 x 10 µl) 10 samicím myši kmene Balb/c (lehce znecitlivěným preparátem

Enflurance) pomocí mikrotubičky PT45 a injekční stříkačky Hamilton. Antigen byl podáván 15., 10., a 5. den před indukci artritidy. Kontrolní myši ($n = 10$) byly podrobeny stejné proceduře, ale jim byl podáván pouze nosič (PBS) (Tabulka 1).

- 5 Imunologická tolerance byla hodnocena stanovením přecitlivělosti oddáleného typu (DTH, delayed type hypersensitivity), která následovala po senzibilizaci v den 0, jak je popsáno výše, při použití $10 \mu\text{g}$ proteinu. Senzibilizaci v den 0 následovala 8.den výzevná dávka (challenge) ve formě injekce $10 \mu\text{g}$ HC gp-39 v objemu
- 10 $50 \mu\text{l}$ do levé zadní tlapky. DTH reakce byly měřeny jako zvětšení tlapky ($[\text{zduření levé (mm} \times 10^{-3}) - \text{zduření pravé (mm} \times 10^{-3})] / \text{zduření pravé (mm} \times 10^{-3}) \times 100\%$). Zduření tlapky bylo měřeno pomocí mikrometru vlastní konstrukce v časovém odstupu 0, 24 a 48 hodin po výzevné dávce.
- 15 Tolerance k vyvolání artritidy u těchto myší byla dále monitorovaná až do 31.dne po senzibilizaci a u myší byly denně vyšetřovány klinické příznaky. Závažnost artritidy byla hodnocena jak uvedeno výše.

Tabulka 1. Tolerizační schéma.

DEN	tolerizace vůči HC gp-39	bez tolerizace
- 15	28µgHC gp-39 intranazálně	PBS
-10	28µgHC gp-39 intranazálně	PBS
-5	28µgHC gp-39 intranazálně	PBS
0	10µgHC gp-39 subkutánně	10µgHC gp-39 subkutánně
8	10µgHC gp-39 do tlapky	10µgHC gp-39 do tlapky
9	24 hodin DTH	24 hodin DTH
10	48 hodin DTH	48 hodin DTH
0 - 31	hodnocení příznaků artritidy	hodnocení příznaků artritidy

DTH =přecitlivělost oddáleného typu, PBS = 0,5M NaCl, 0,01M pufr fosforečnanu sodného pH 7,5

5 VÝSLEDKY

Artritogenita HC gp-39

Po jedné injekci 50 µg HC gp-39 smíchaného s IFA se u všech myší postupně vyvinula těžká artritida (Tabulka 2). První příznaky artritidy se objevily 15 až 20 dnů po senzibilizaci v předních tlapkách u 3 ze 4 zvířat. U myši, která v předních tlapkách neměla žádný nález, se artritida projevila v zadních tlapkách do 34. dne po senzibilizaci. Průběh choroby vyvolané proteinem HC gp-39 se vyznačoval pravidelnými relapsy v předních nebo zadních tlapkách a mírná artritida se postupně vyvinula v těžší formu (progrese choroby byla sledována po dobu 62 dnů). Velmi často (víc než v 50%) byla

pozorována symetrie v postižení kloubů, tzn., že příznaky artritidy se objevily současně v obou předních tlapkách nebo v obou zadních tlapkách.

Vyvolání artritidy bylo podobně docíleno při použití 10 μ g namísto 50 μ g HC gp-39 smíchaného s IFA. Hodnoty (skóre) artritických příznaků však byly poněkud nižší (data neukázána). U tři ze čtyř myší se vyvinula těžká artritida. U jedné myši byly po dobu trvání experimentu pozorovány pouze mírné příznaky. Kontrolní myši nevykázaly po celou dobu trvání experimentu žádné příznaky artritidy.

V souhrnu, jak 10 μ g tak 50 μ g proteinu postačovalo na vyvolání progresivní artritidy u myší kmene Balb/c. Artritida vyvolaná proteinem HC gp-39 připomíná svoji chronickou povahou, vyznačující se opakovanými relapsy, společně se symetrickým postižením kloubů, progresi choroby při revmatoidní artritidě (RA).

15

Tabulka 2. Vznik a progrese artritidy u myší kmene Balb/c senzibilizovaných HC gp-39.

Senzibilizace (n=4)	nástup artritidy (den)		příznaky artritidy		
	FP	HP	žádné	mírné	těžké
PBS kontroly	-	-	4	0	0
10 μ g HC gp-39	-, 13, 15, 57	32,34,36,43	0	1	3
50 μ g HC gp-39	13,15,15,48	29,34,34,53	0	0	4

FP=přední tlapka. HP= zadní tlapka. Příznaky artritidy: žádné: skóre=0, mírné: skóre na zvíře nepřevyšuje 2, těžké: skóre na zvíře $\geq$ 3.

20

Imunologická tolerance měřená DTH testem

Kontrolní myši injikované proteinem HC gp-39 v den 0 vykazovaly silnou, antigen-specifickou DTH odpověď, což naznačuje, že senzibilizací byla vyvolána buněčná imunitní odpověď vůči HC gp-39 (Tabulka 3). Intranasální podání HC gp-39 však zcela zrušilo tuto DTH odpověď na výzvu autoantigenem, čímž bylo prokázáno, že HC gp-39-specifické buňky T byly vskutku tolerizovány.

Pozoruhodné je, že u 4 z 10 zvířat netolerizované skupiny se vyvinula artritida v kotníku sousedícím s místem, kam byla aplikována injekce výzevné dávky. Naopak, u myši z tolerizované skupiny se artritida v kloubech sousedících s místem vpichu nevyvinula, což naznačuje, že imunologická tolerance vůči HC gp-39 vede k ochraně před vznikem artritidy.

15

Tabulka 3. DTH odpovědi na HC gp-39 po tolerizaci nazální aplikací

ošetření	střední % zduření			artritický kotník
	0 hod	24 hod	48 hod	
kontroly (n=10)	-1,3	31,4	38,6	4/10
tolerizované (n=9)	-0,05	3,7	1,5	0/9

Tolerance vůči vyvolání nebo progresi artritidy

U myši kmene Balb/c, tolerizovaných proteinem HC gp-39 a netolerizovaných kontrol, byl sledován vznik a progresi artritidy.

U všech myši kontrolní (netolerizované) skupiny byl po senzibilizaci proteinem HC gp-39 zaznamenán počátek choroby (Tabulka 4). U sedmi myši se postupně vyvinula těžká artritida,

20

zatímco u tří myší se projeví jen mírné příznaky (nejvyšší skóre 2). Naproti tomu pět myší ze skupiny tolerizované proteinem HC gp-39 bylo po celou dobu experimentu ochráněno před chorobou. Kromě toho, u dvou zvířat z tolerizované skupiny se po krátká časová období
 5 projeví jen mírné příznaky. U tří zvířat se vyvinula těžší artritida s hodnotou skóre 4.

Je zajímavé, že u tolerizovaných zvířat byl nástup artritidy oddálen jak v zadních tak v předních tlapkách, a to minimálně o 7-9 dnů (Obrázek 1). Přestože v tolerizované skupině bylo méně
 10 postižených zvířat, artritické skóre na zvíře pro přední tlapy bylo srovnatelné s hodnotami nalezenými u netolerizovaných zvířat. Artritické skóre na zvíře pro zadní tlapy však bylo u tolerizovaných zvířat poněkud nižší (Obrázek 1).

15

Tabulka 4. Vznik a progres artritidy u HC gp-39 - tolerizovaných a netolerizovaných myší kmene Balb/c.

zvířata	nástup artritidy (den)	příznaky artritidy		
		žádné	mírné	těžké
kontroly (n=10)	13 - 16	0	3	7
tolerizované (n=10)	23 - 24	5	2	3

*Nástup artritidy: výskyt prvních příznaků - nejvyšší počet postižených zvířat. Příznaky artritidy: žádné: skóre = 0, mírné: skóre na zvíře
 20 nepřevyšuje 2, těžké: skóre na zvíře je ≥ 4 .*

Výše uvedené experimenty prokazují artritogenní účinek HC gp-39 u myší kmene Balb/c. Průběh choroby vyvolané HC gp-39 proteinem se vyznačoval pravidelnými relapsy v předních a/nebo zadních tlapkách a mírná artritida postupně přecházela do těžší formy.

Rovněž bylo pozorováno symetrické poškození kloubů, což spolu s opakovanými relapsy připomíná progresi onemocnění při revmatoidní artritidě. Výrazně artritogenní vlastnosti proteinu HC gp-39 byly patrné po jediné podkožní injekci 10 nebo 50 µg proteinu, která vyvolala příznaky artritidy u všech zvířat. Že senzibilizace proteinem HC gp-39 skutečně způsobí aktivaci HC gp-39 - specifických buněk T bylo prokázáno navozením HC gp-39 - specifických DTH odpovědi. Tyto výsledky byly dále potvrzeny průkazem HC gp-39- specifických *in vitro* proliferačních odpovědí u zvířat, jež byla imunizovaná proteinem HC gp-39 do tlapky (data neukázána). Je důležité, že u netolerizovaných zvířat se vyvinula artritida v kotníku sousedícím s místem injekce, což skutečně svědčí o účasti HC gp-39-specifických buněk T v indukci artritidy.

Intranazální podání peptidového antigenu se používá k navození antigen-specifické imunitní tolerance. Pokusy ukázaly, že intranazální aplikace HC gp-39 vede k imunologické neodpovídavosti. DTH odpověď následující po desenzibilizaci byla úplně zrušena u HC gp-39-tolerizovaných myší, zatímco kontrolní myši vykázaly antigen-specifické zduření. Tato pozorování naznačují, že podání HC gp-39 vede k periferní imunitní toleranci.

Ve skupině netolerizovaných zvířat byly DTH odpovědi u čtyř myší z deseti provázeny artritidou v kotníku (sousedícím s místem injekce výzevné dávky). Naproti tomu kotníky HC gp-39-tolerizovaných zvířat byly plně chráněné, což svědčí o tom, že autoreaktivní buňky T byly účinně umlčeny. Představa, že tolerizace proteinem HC gp-39 chrání před rozvinutím choroby byla dále podpořena zjištěním, že 5 z 10 zvířat v tolerizované skupině bylo zcela ochráněno po celou dobu trvání experimentu. Přestože ostatních pět zvířat ze skupiny nakonec vykázalo klinické příznaky, nástup artritidy byl značně oddálen. Lze tedy učinit závěr, že HC gp-39-specifické buňky T se účastní artritogenního procesu, a co je důležitější, že tolerizací těchto T-

buněk farmaceutickým prostředkem podle předkládaného vynálezu lze oddálit nebo potlačit vznik artritidy.

PŘÍKLAD 2

5 METODY

Artritogenita hovězího syrovátkového 39 kDa proteinu u myši kmene Balb/c

0,2, 1, 5 nebo 25 µg purifikovaného hovězího 39 kDa syrovátkového proteinu v objemu 100 µl (0,5M NaCl, 0,01M pufr
10 fosforečnanu sodného, pH 7,5) smíchaných v poměru 1:1 s nekompletním Freundovým adjuvans (IFA) bylo injikováno podkožně v hrudní oblasti 4 x 10 myších samic kmene Balb/c (Charles River, Sulzfeld, Germany), zatímco 10 kontrol bylo injikováno roztokem PBS (1:1 v IFA). U myší byly každý druhý den vyšetřovány klinické
15 příznaky artritidy. Závažnost artritidy byla hodnocena skórem pro každou tlapku podle stupnice 0 - 3 (viz článek Glant et al.). Stručně, hodnota skóre 0 = žádné změny, skóre 1 = zarudnutí a/nebo zduření, skóre 2 = silné zduření a/nebo výskyt deformit, skóre 3 = nepohyblivost způsobená ztrátou schopnosti ohybu a natažení.

20

Klonování cDNA hovězího syrovátkového gp39

Lambda Bluemid(-) cDNA knihovna připravená z kravské mléčné žlázy (jako primery použity oligo-dT a randomní oligonukleotidy, na zakázku
25 zhotovená v Clontech Laboratories Inc.) byla amplifikovaná v hostitelském kmeni XL1 Blue MRF. Vyšetí knihovny a příprava replik na filtrech byly provedeny podle instrukcí výrobce. Filtry byly hybridizovány s ³²P značeným PvuII fragmentem z HC gp-39 cDNA

(ke značení byl použit oligonukleotidový značící kit firmy Pharmacia). Pozitivní plaky byly amplifikovány, znovu hybridizovány se značenou sondou a DNA inserty z odpovídajících fágů byly osekvenovány s použitím Thermosequenasového kitu (Amersham). Sekvence je
5 uvedena v SEQ ID NO:3. V nukleotidové pozici 954 obsahoval jeden klon C, zatímco jiný klon měl v této pozici T.

VÝSLEDKY

Artritogenita hovězího syrovátkového 39 kDa proteinu

Po jedné injekci 25 μ g hovězího syrovátkového 39 kDa proteinu
10 smíchaného s IFA se u všech myší postupně vyvinula artritida (Tabulka 5). První příznaky artritidy byly pozorovány v předních nebo zadních tlapkách 8-20 dnů po senzibilizaci. Průběh artritidy vyvolané hovězím syrovátkovým 39 kDa proteinem se vyznačoval periodickými relapsy v zadních tlapkách a mírná artritida se postupně vyvinula do
15 těžší podoby (progrese choroby byla sledována po dobu 70 dnů). Velmi často bylo pozorováno symetrické postižení kloubů, tj. příznaky artritidy byly zaznamenány současně v obou předních tlapkách nebo v obou zadních tlapkách.

Vyvolání artritidy bylo podobně docíleno při použití 5, 1, nebo
20 0,2 μ g namísto 25 μ g hovězího syrovátkového 39 kDa proteinu smíchaného s IFA.

U myší, kde bylo použito 1 nebo 0,2 μ g hovězího syrovátkového 39 kDa proteinu byla pozorována mírnější forma artritidy: u 7, případně u 6 myší se vyvinula mírná artritida, zatímco pouze u 3,
25 případně u 4 myší se vyvinula těžká artritida.

Na konci experimentu byla vypočtena kumulativní skóre na den pro všechny skupiny myší (Obrázek 2). Po imunizaci pomocí 25 μ g hovězího syrovátkového 39 kDa proteinu bylo dosaženo maximálního skóre 27 (25 μ g) po 30 dnech a pak následovaly zřetelné relapsy. Při

imunizaci nižšími dávkami hovězího syrovátkového 39 kDa proteinu vykazovala zvířata poněkud nižší artritické skóre ve srovnání se zvířaty, která obdržela dávku 25 μ g. Přes nižší docílené skóre byla artritida ve všech skupinách provázena typickými relapsy.

- 5 U kontrolních myší, které byly injikovány roztokem PBS, bylo někdy pozorováno lehké a přechodné zduření zadních tlapek. Tento jev byl též pozorován u naivních, neinjikovaných zvířat. Střední kumulativní zduření připadající na hodnotící (skórovací) den mělo v těchto skupinách myší střední hodnotu 3,4 a bylo považováno za
10 biologicky variabilní pozadí.

- Závěrem, hovězí syrovátkový 39 kDa protein (25, 5, 1 i 0,2 μ g) je schopen u myších samic kmene Balb/c vyvolat progresivní artritidu. Artritida vyvolaná hovězím syrovátkovým 39 kDa proteinem připomíná svoji chronickou povahou, vyznačující se opakovanými
15 relapsy, společně se symetrickým postižením kloubů, progresi choroby při revmatoidní artritidě (RA).

28.10.98

Tabulka 5: Vznik a progres artritidy u myší kmene Balb/c senzibilizovaných hovězím syrovátkovým 39 kDa proteinem.

senzibilizace (n=10)	nástup artritidy (den)		příznaky artritidy		
	FP	HP	žádné	mírné	těžké
0,2 µg hovězího 39kDa syrovátkového proteinu	-,-,-,-,- -,-,-,14,18	8,14,14,14, 18 18,18,18, 30,54	0	6	4
1 µg hovězího 39kDa syrovátkového proteinu	-,-,-,-,- 8,12,12, 16,18	8,8,8,8,8 8,14,16,18, 18	0	7	3
5 µg hovězího 39kDa syrovátkového proteinu	-,-,-,-,- 8,10,10,12 ,14	6,6,8,10,10 16,16,18, 20,30	0	0	10
25 µg hovězího 39kDa syrovátkového proteinu	-,-,-,-,- -,-,-,-,12	8,8,10,12, 12 14,14,18, 18,20	0	1	9

FP=přední tlapka, HP=zadní tlapka. Příznaky artritidy: žádné:skóre=0, mírné: skóre na zvíře nepřevyšuje 2, těžké:skóre na zvíře ≥ 3.

SEZNAM SEKVENCÍ

(1) OBECNÉ INFORMACE:

(i) PŘIHLAŠOVATEL:

- (A) JMÉNO: AKZO NOBEL N V.
- 5 (B) ULICE: Velperweg 76
- (C) MĚSTO: Arnhem
- (E) ZEMĚ: Holandsko
- (F) PSČ (ZIP): 6824 BM
- (G) TELEFON: 0412 666376
- 10 (H) TELEFAX: 0412 650592
- (I) TELEX: 37503 akpha nl

(ii) NÁZEV VYNÁLEZU: Nové peptidy odvozené z autoantigenu pro použití v imunoterapii autoimunitních chorob

15 (iii) POČET SEKVENCÍ: 3

(iv) POČÍTAČOVÝ FORMÁT:

- (A) TYP MÉDIA: Disketa
- (B) POČÍTAČ: IBM PC kompatibilní
- (C) OPERAČNÍ SYSTÉM: PC-DOS/MS-DOS
- 20 (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPO)

(2) INFORMACE O SEQ ID NO: 1:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 42 aminokyselin
- 25 (B) TYP: aminokyselinová
- (C) TYP ŘETĚZCE: jednořetězová
- (D) TOPOLOGIE: lineární

28.10.98

- 30 -

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 1:

Tyr Lys Leu Val Cys Tyr Tyr Thr Ser Trp Ser Gln Tyr Arg Glu Gly
 1 5 10 15
 Asp Gly Ser Cys Phe Pro Asp Ala Leu Asp Arg Phe Leu Cys Thr His
 20 25 30
 Ile Ile Tyr Ser Phe Ala Asn Ile Ser Asn Asp
 35 40

10 (2) INFORMACE O SEQ ID NO: 2:

(ii) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 383 aminokyselin

(B) TYP: aminokyselinová

(C) TYP ŘETĚZCE: dvouřetězcová

15 (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 2:

Met Gly Leu Arg Ala Ala Gln Thr Gly Phe Val Val Leu Val Leu Leu
 1 5 10 15
 Gln Ser Cys Ala Ala Tyr Lys Leu Ile Cys Tyr Tyr Thr Ser Trp Ser
 20 25 30
 Gln Tyr Arg Glu Gly Asp Gly Ser Cys Phe Pro Asp Ala Ile Asp Pro
 35 40 45
 Phe Leu Cys Thr His Val Ile Tyr Ser Phe Ala Asn Ile Ser Asn Asn
 50 55 60
 Glu Ile Asp Thr Trp Glu Trp Asn Asp Val Thr Leu Tyr Asp Thr Leu
 65 70 75 80
 Asn Thr Leu Lys Asn Arg Asn Pro Asn Leu Lys Thr Leu Leu Ser Val
 85 90 95

Gly Gly Trp Asn Phe Gly Ser Gln Arg Phe Ser Lys Ile Ala Ser Lys
 100 105 110

Thr Arg Ser Arg Arg Thr Phe Ile Lys Ser Val Pro Pro Phe Leu Arg
 115 120 125

Thr His Gly Phe Asp Gly Leu Asp Leu Ala Trp Leu Tyr Pro Gly Trp
 130 135 140

Arg Asp Lys Arg His Leu Thr Thr Leu Val Lys Glu Met Lys Ala Glu
 145 150 155 160

Phe Val Arg Glu Ala Gln Ala Gly Thr Glu Gln Leu Leu Leu Ser Ala
 165 170 175

Ala Val Pro Ala Gly Lys Ile Ala Ile Asp Arg Gly Tyr Asp Ile Ala
 180 185 190

Gln Ile Ser Arg His Leu Asp Phe Ile Ser Leu Leu Thr Tyr Asp Phe
 195 200 205

His Gly Ala Trp Arg Gln Thr Val Gly His His Ser Pro Leu Phe Arg
 210 215 220

Gly Gln Glu Asp Ala Ser Ser Asp Arg Phe Ser Asn Ala Asp Tyr Ala
 225 230 235 240

Val Ser Tyr Met Leu Arg Leu Gly Ala Pro Ala Asn Lys Leu Val Met
 245 250 255

Gly Ile Pro Thr Phe Gly Arg Ser Tyr Thr Leu Ala Ser Ser Lys Thr
 260 265 270

Asp Val Gly Ala Pro Ile Ser Gly Pro Gly Ile Pro Gly Gln Phe Thr
 275 280 285

Lys Glu Lys Gly Ile Leu Ala Tyr Tyr Glu Ile Cys Asp Phe Leu His
 290 295 300

Gly Ala Thr Thr His Arg Phe Arg Asp Gln Gln Val Pro Tyr Ala Thr
 305 310 315 320

Lys Gly Asn Gln Trp Val Ala Tyr Asp Asp Gln Glu Ser Val Lys Asn
 325 330 335

Lys Ala Arg Tyr Leu Lys Asn Arg Gln Leu Ala Gly Ala Met Val Trp
340 345 350

Ala Leu Asp Leu Asp Asp Phe Arg Gly Thr Phe Cys Gly Gln Asn Leu
355 360 365

Ala Phe Pro Leu Thr Ser Ala Ile Lys Asp Val Leu Ala Glu Val
370 375 380

(2) INFORMACE O SEQ ID NO: 3:

(ii) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- 10 (A) DÉLKA: 1152 párů bází
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) TYP ŘETĚZCE: jednořetězcová
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA

15

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 3:

ATGGGGCTGA GGGCGGCTCA GACAGGTTTT GTGGTCCTGG TGCTGCTCCA GAGCTGTGCT	60
GCATACAAGC TGATCTGCTA CTACACCAGC TGGTCCCACT ACCGGGAGGG TGATGGGAGC	120
TGCTTCCCAG ACGCCATCGA CCCCTTCCTG TGCACCCATG TCATCTACAG CTTTGCCAAC	180
ATAAGCAACA ATGAGATCGA CACCTGGGAG TGAATGACG TGACGCTCTA TGACACACTG	240
AACACACTCA AGAACAGGAA CCCCAACCTG AAGACCCTCC TATCTGTTGG AGGATGGAAC	300
TTCGGTTCTC AAAGATTTTC CAAGATAGCT TCCAAGACCC GGAGTCGCAG GACTTTCATC	360
AAGTCGGTGC CACCATTCTT GCGGACCCAT GGCTTTGATG GACTGGACCT AGCATGGCTC	420
TACCCCGGGT GGAGAGACAA GCGGCATCTC ACCACTCTGG TCAAGGAAAT GAAGGCTGAG	480
TTTGTAAGGG AAGCCCAAGC AGGCACAGAG CAGCTTCTGC TCAGTGCAGC AGTACCTGCA	540

GGGAAGATTG CTATTGACAG AGGCTATGAC ATCGCCCAGA TATCCCGACA CCTGGACTTC	600
ATCAGCCTTT TGACCTATGA CTTTCACGGA GCCTGGCGCC AGACAGTCGG ACACCACAGC	660
CCCCTGTTTC GAGGCCAGGA AGATGCAAGT TCTGACAGAT TCAGTAACGC TGACTACGCT	720
GTGAGCTACA TGCTGAGGCT GGGGGCTCCA GCCAATAAGC TGGTGATGGG TATCCCCACT	780
TTTGGGAGGA GCTACACTCT GGCCTCTTCC AAGACAGATG TGGGAGCCCC CATCTCAGGG	840
CCAGGAATTC CAGGCCAGTT CACCAAGGAG AAAGGGATCC TTGCCTATTA TGAGATCTGT	900
GACTTCCTCC ACGGAGCCAC CACCCACAGA TTCCGTGACC AGCAGGTCCC CTATGCCACC	960
AAGGGCAACC AGTGGGTGGC GTATGACGAC CAGGAGAGTG TCAAAAACAA GGCACGGTAC	1020
CTGAAGAACA GGCAGCTGGC TGGCGCCATG GTGTGGGCCC TGGACTTGGA TGACTTCCGG	1080
GGCACCTTCT GTGGGCAGAA CCTGGCCTTT CCTCTCACAA GTGCCATCAA AGATGTGCTT	1140
GCTGAGGTGT AG	1152

Zastupuje:

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Protein obsahující aminokyselinovou sekvenci, jež vykazuje alespoň 50% homologii s aminokyselinovou sekvencí YKLVCYYTSWSQYREGDGSCFPDALDRFLCTHIIYSFANISND (SEQ ID NO: 1) pro použití jako látky k terapeutickým účelům.
5
2. Použití podle nároku 1, vyznačující se tím, že uvedený protein je hovězí syrovátkový 39 kDa protein nebo lidský YKL-39 protein.
10
3. Farmaceutický prostředek, vyznačující se tím, že obsahuje jeden nebo více proteinů obsahujících aminokyselinovou sekvenci, jež vykazuje alespoň 50% homologii s aminokyselinovou sekvencí YKLVCYYTSWSQYREGDGSCFPDALDRFLCTHIIYSFANISND (SEQ ID NO: 1), a farmaceuticky přijatelný nosič.
15
4. Farmaceutický prostředek podle nároku 3, vyznačující se tím, že uvedený protein je hovězí syrovátkový 39 kDa protein nebo lidský YKL-39 protein.
20
5. Použití proteinu obsahujícího aminokyselinovou sekvenci, jež vykazuje alespoň 50% homologii s aminokyselinovou sekvencí YKLVCYYTSWSQYREGDGSCFPDALDRFLCTHIIYSFANISND (SEQ ID NO: 1) na výrobu farmaceutického prostředku pro indukci specifické T- buněčné tolerance vůči homolognímu autoantigenu u savců trpících destrukcí chrupavky zprostředkovanou buňkami T.
25



6. Použití podle nároku 5, vyznačující se tím, že uvedený protein je hovězí 39 kDa syrovátkový protein nebo lidský YKL-39 protein.
7. Jeden nebo více proteinů, obsahujících aminokyselinovou
5 sekvenci, jež vykazuje alespoň 50% homologii s aminokyselinovou sekvencí
YKLVCYYTSWSQYREGDGSCFPDALDRFLCTHIIYSFANISND (SEQ ID NO: 1) pro použití pro vyvolání artritidy u zvířat, s výhodou u myši.
- 10 8. Způsob podle nároku 7, vyznačující se tím, že uvedený protein je hovězí 39 kDa syrovátkový protein nebo lidský YKL-39 protein.
9. Zvířata, která trpí artritidou, přičemž uvedená artritida byla
15 vyvolána způsobem podle nároku 7 nebo 8.
10. Použití zvířat podle nároku 9 pro systematické testování nových léků pro léčbu artritidy, zejména revmatoidní artritidy.
- 20 11. Protein, mající aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:2.
12. Izolovaná DNA, kódující aminokyselinovou sekvenci podle nároku 11.
- 25 13. Izolovaná DNA podle nároku 12, mající nukleotidovou sekvenci SEQ ID NO:3

Zastupuje:

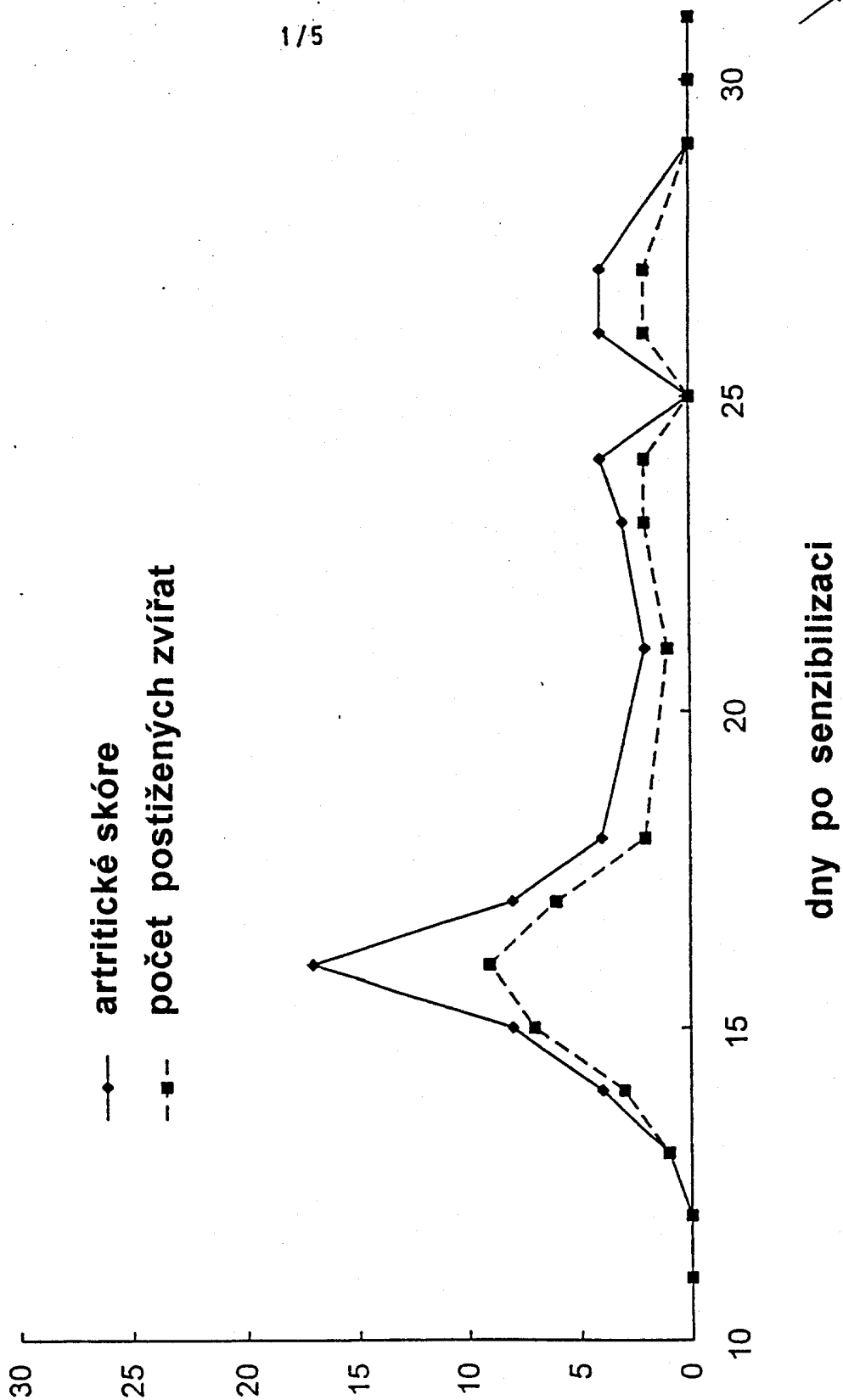
28.12.98

PV3333-90

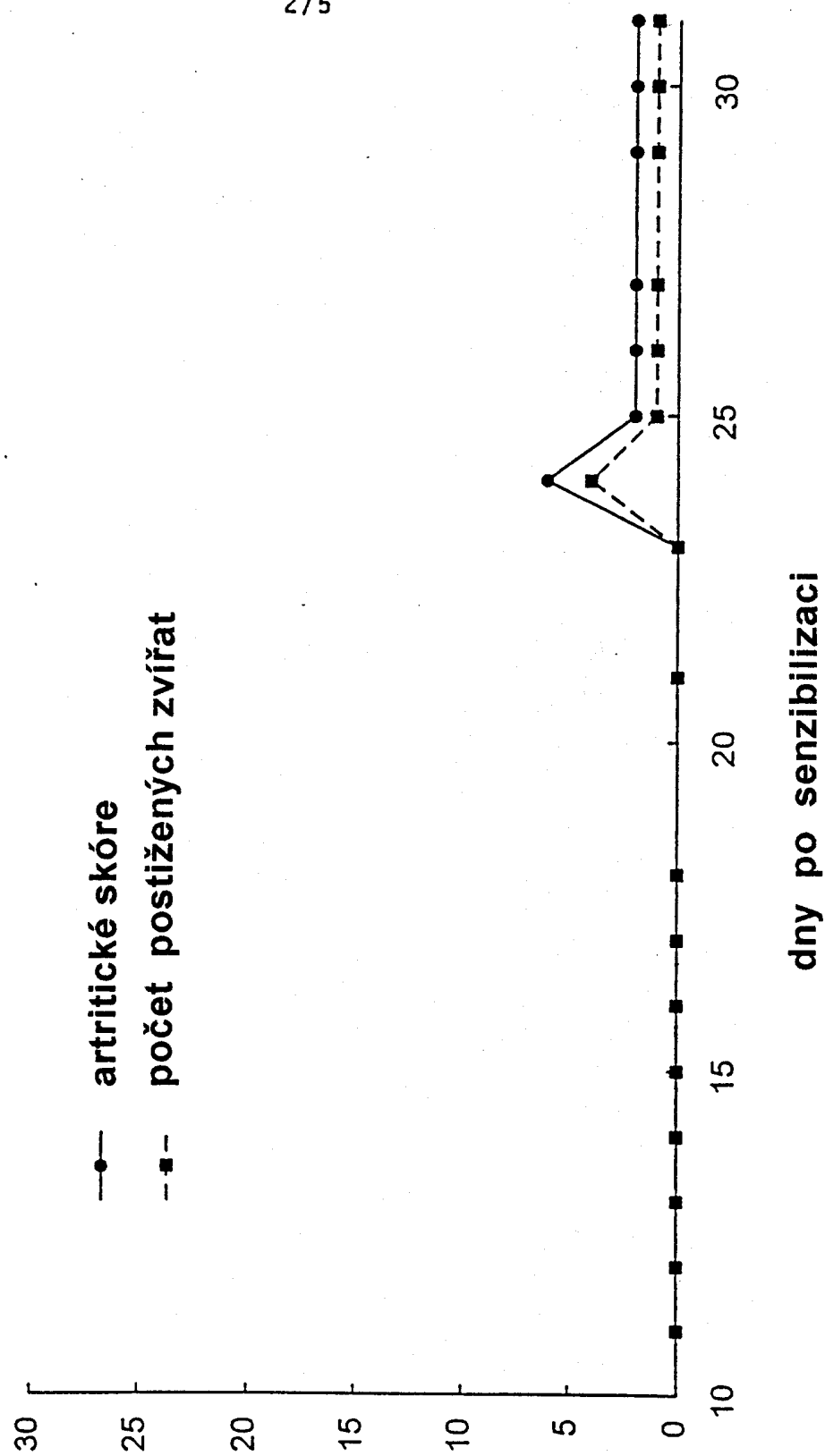
82857

1/5

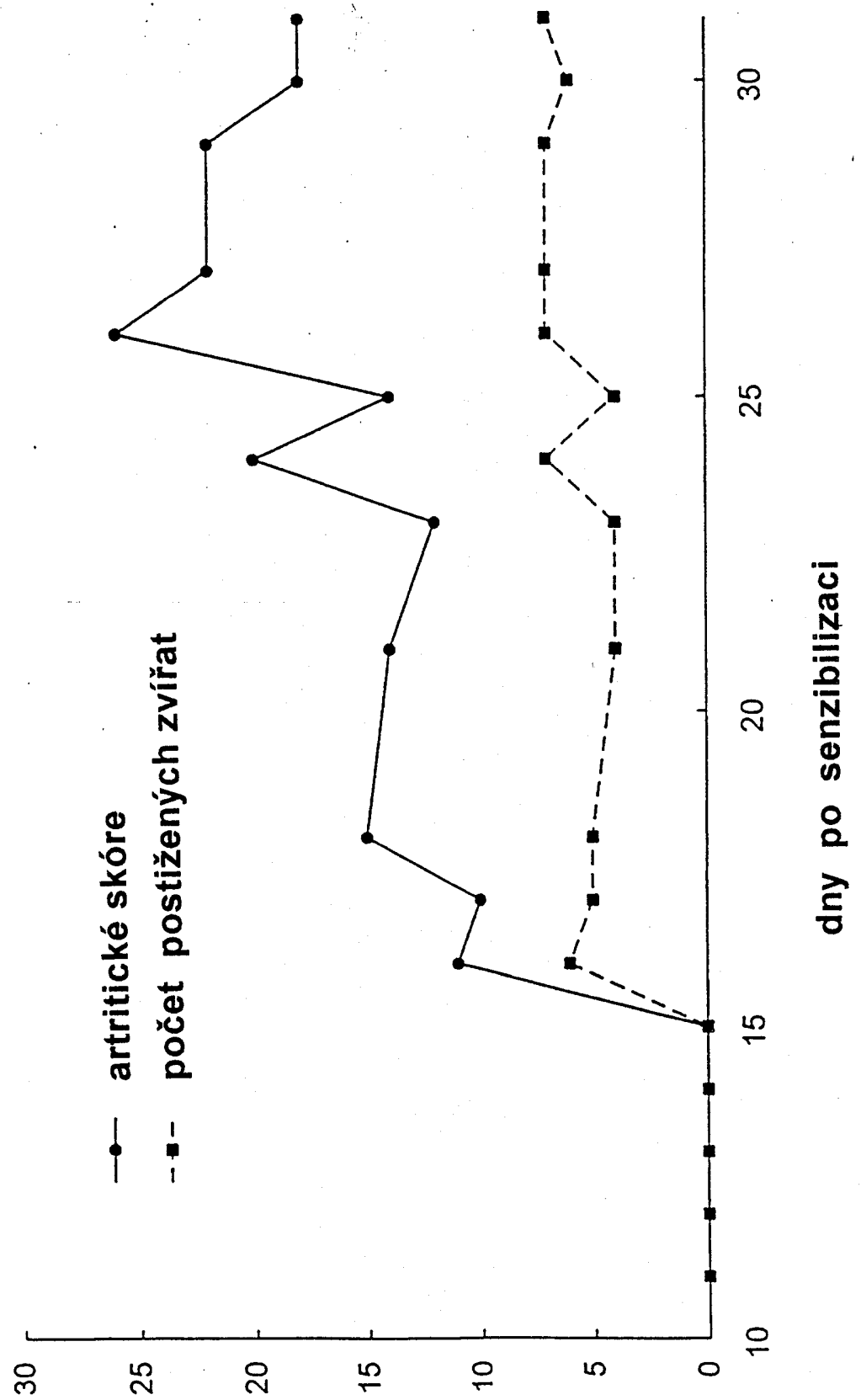
OBR. 1A: Skóre artritidy v přední tlapce
netolerizovaná zvířata



**OBR. 1B: Skóre artritidy v přední tlapce
tolerizovaná zvířata**

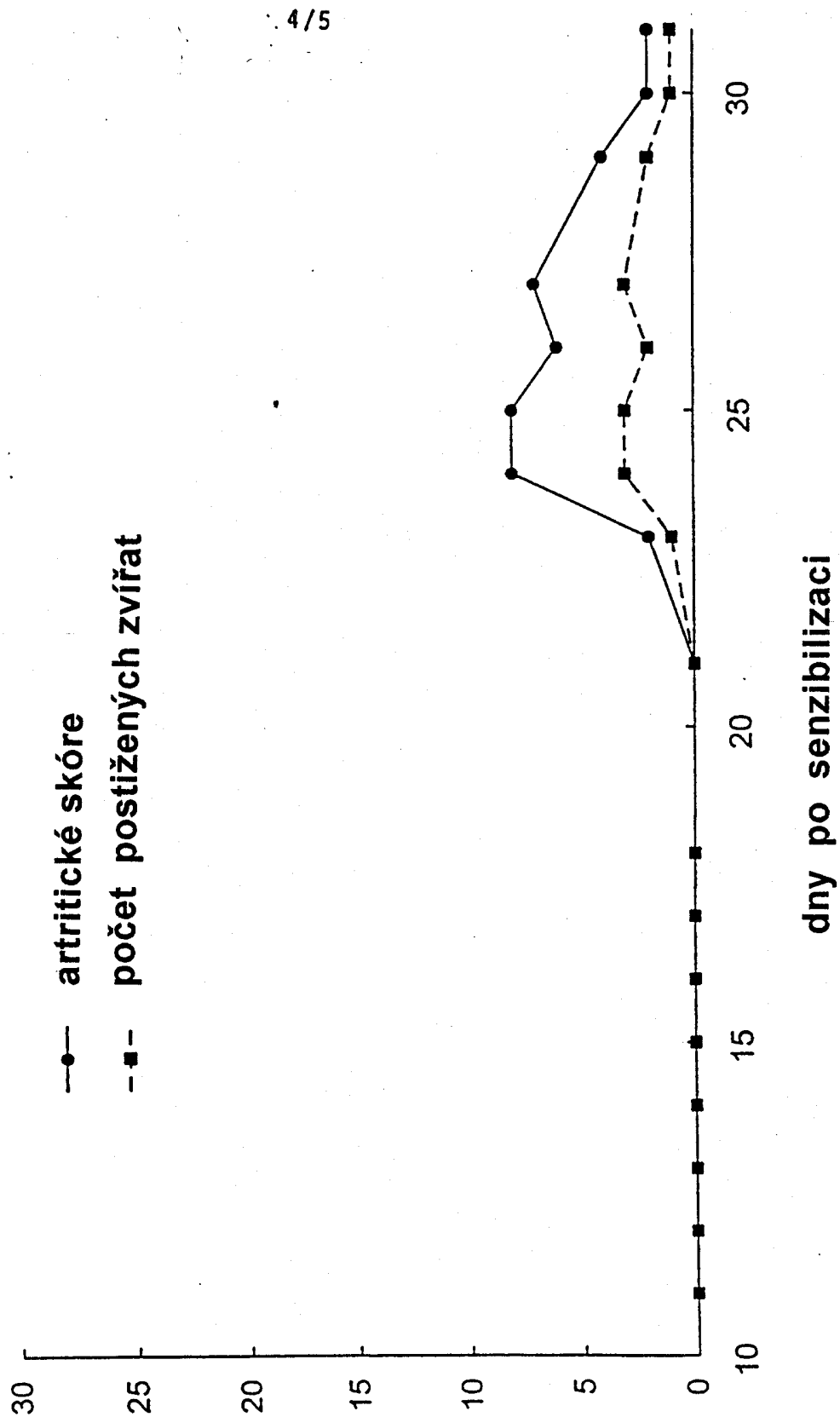


OBR. 1C: Skóre artritidy v zadní tlapce
netolerizovaná zvířata



28.12.98

OBR. 1D: Skóre artritidy v zadní tlapce
tolerizovaná zvířata



20.12.98

5/5

OBR. 2: Skóre artritidy v zadních tlapkách

