

РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ

(19) BG

(11) **63183 B2**
7(51) A 61 K 39/395
C 07 K 16/42



ОПИСАНИЕ КЪМ ПАТЕНТ

ЗА

ИЗОБРЕТЕНИЕ

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(21) Регистров № 97664
(22) Заявено на 26.04.93
(24) Начало на действие
на патента от: 03.08.2000

Приоритетни данни

(31) (32) (33)

(41) Публикувана заявка в
бюлетин № на
(45) Отпечатано на 31.05.2001
(46) Публикувано в бюлетин № 5
на 31.05.2001
(56) Информационни източници:

(62) Разделена заявка от рег. №

(73) Патентоприитежател(и):
THE IMMUNE RESPONSE CORPORATION
CARLSBAD, CA (US)

(72) Изобретател(и):
Mark D. Howell, San Diego, CA
Steven W. Brostoff, Carlsbad, CA
Dennis J. Carlo, Rancho Santa Fe, CA (US)

(74) Представител по индустриална
собственост:
Искра Владимирова Христова,
1000 София, ул. "Любен Каравелов" 20

(86) № и дата на PCT заявка:

(87) № и дата на PCT публикация:

Издава се съгласно §4 от Преходните и заключителните разпоредби на Закона за патентите на основание издаден патент на: US № 6007815 от 28.12.99

(54) АНТИИДИОТИПНА ВАКСИНА СРЕЩУ ЗАБОЛЯВАНИЯ, ПРИЧИНЕНИ ОТ ПАТОГЕННИ ОТГОВОРИ НА СПЕЦИФИЧНИ Т-КЛЕТЪЧНИ ПОПУЛАЦИИ

(57) Изобретението се отнася до ваксини и средства за ваксиниране на гостоприемник с цел предотвратяване или контролиране на специфични Т-клетъчно медириани патологии. Ваксината е съставена от антиидиотипни антители, които са вътрешни отражения на сегмент от Т-клетъчния рецептор (TCR), разположен на повърхността на патогенните Т-клетки. Ваксината се прилага на гостоприемника по начин, който включва имунен отговор, насочен спрямо TCR на патогенните клетки. Този имунен отговор регулира или отстранява патогенните Т-клетки, като по този начин елиминира патогенезата. Изобретението се отнася и до средства за определяне на подходяща аминокиселинна последователност за такава ваксина.

17 претенции

BG 63183 B2

(54) АНТИИДИОТИПНА ВАКСИНА СРЕЩУ ЗАБОЛЯВАНИЯ, ПРИЧИНЕНИ ОТ ПАТОГЕННИ ОТГОВОРИ НА СПЕЦИФИЧНИ Т-КЛЕТЪЧНИ ПОПУЛАЦИИ

Заявката е продължение на заявка Ser. No. 08/024 787, заявена на 01.03.1993, (изоставена), която е продължение на US Ser. No. 07/914 642, заявена на 16.07.1992 (понастоящем изоставена), която е продължение на US Ser. No. 07/382 086, заявена на 18.07.1989, (изоставена) и частично продължение на US Ser. No. 07/326 314, заявена на 21.03.1989, (изоставена).

Област на техниката

Изобретението се отнася до имунната система, по-специално до методи за модифициране на патогенни имунни отговори.

Предшестващо състояние на техниката

Висшите организми се характеризират с имунна система, която ги защитава от инвазия на потенциално вредни вещества или микроорганизми. Когато веществото, наречено антиген, проникне в тялото и е разпознато като чуждо, имунната система реагира с антители обусловен отговор и с клетъчно обусловен отговор. Клетки на имунната система, наречени В-лимфоцити или В-клетки, продуцират антитела, които специфично разпознават и се свързват с чуждото вещество. Други лимфоцити, наречени Т-лимфоцити или Т-клетки, едновременно осъществяват и регулират клетъчно обусловен отговор, водещ, евентуално до отстраняването на антигена.

Различни Т-клетки са включени в клетъчно обусловения отговор. Някои възбуждат специфични В-клетъчни клонове пролиферация и продуциране на антитела, специфични за антигена. Други разпознават и разрушават клетки с чужди антигени на повърхността си. Някои Т-клетки регулират отговора или като стимулират, или чрез супресия на други клетки.

Въпреки че нормалната имунна система е добре регулирана, грешки в имунния отговор не са необичайни. В някои случаи имунната система функционира несвойствено и реагира към компонент на гостоприемника, както

ако той в действителност би бил чужд. Резултатът от такъв отговор е автоимунно заболяване, при което имунната система на гостоприемника атакува собствената тъкан на гостоприемника. Т-клетките като първични регулатори на имунната система директно или индиректно предизвикват такива автоимунни патологии.

За много болести се приема, че са резултат от автоимунни механизми. Известни между тях са ревматоидният артрит, системният лупус еритематозус, мултиплената склероза, диабет тип 1, миастения гравис и пемфигус вулгарис. Автоимунните болести засягат милиони хора по света и загубите от тези заболявания, изразени като действителни разходи за лечение и загуба на трудоспособност, се измерват в милиарди долари годишно.

Понастоящем не е известно ефективно лечение на такива автоимунни патологии. Обикновено, само симптомите могат да се лекуват, докато болестта продължава да прогресира, често причинявайки тежко изтощение или смърт.

В други случаи лимфоцитите се репликират по неподходящ начин и без контрол. Такава репликация води до раково образувание, известно като лимфома. Когато нерегулираните лимфоцити са от Т-клетъчен тип, туморите се определят като Т-клетъчни лимфоми. Както при други злокачествени образувания Т-клетъчните лимфоми са трудни за ефективно лечение.

Следователно, съществува дълготрайна необходимост от ефективни средства за лечение или подобряване на Т-клетъчно медираните патологии. Такова лечение би трябвало да контролира идеално несвойствения Т-клетъчен отговор, вместо да намалява симптомите. Изобретението удовлетворява тази необходимост, като осигурява свързаните с това предимства.

Техническа същност на изобретението

Изобретението се отнася до ваксини и средства за ваксиниране на бозайник, така че да се предотвратят или да се контролират специфичните Т-клетъчно медираните патологии. Ваксината е съставена от Т-клетъчни рецептори (TCR) или техни фрагменти, отговарящи на TCR, намиращи се на повърхността на Т-клетките, медиращи патологията. Алтернатив-

но, ваксината може да бъде пептид, съответстващ на последователности на характеристиките на Т-клетъчните рецептори (TCR) на Т-клетките, медиращи такава патология или антиидиотипични антители, които са вътрешни отражения на пептидите.

В допълнение, изобретението осигурява ваксини за лечение на нерегулирано размножаване на Т-клетки. Ваксината е съставена от TCR или фрагменти от същия, отговарящи на TCR, намиращ се на повърхността на нерегулираните Т-клетки. Алтернативно, ваксината може да бъде пептид, отговарящ на последователностите на TCR, характерни за нерегулирано размножаващите се Т-клетки.

Осигурени са също средства за определяне на подходящи аминокиселинни последователности за такива ваксини. Ваксината се прилага на бозайника по такъв начин, че да предизвика имунен отговор, насочен срещу TCR на Т-клетките, медиращи патологията. Този имунен отговор напълно регулира или унищожава патогенните Т-клетки, като по такъв начин отстранява патогенезата на болестта.

Изобретението се отнася до ваксини и тяхното използване за предотвратяване или подобряване на Т-клетъчно медираните патологии като автоимунни болести и Т-клетъчни лимфоми. Ваксинирането осигурява специфично и поддържано лечение, което избягва проблемите, свързани с други възможни подходи на терапия.

Както се използва тук, терминът "Т-клетъчнообусловена патология" се отнася до всяко състояние, при което несвойствен Т-клетъчен отговор е компонент на патологията. Терминът включва както болести с пряко посредничество на Т-клетки, така и тези, като миастения гравис, които се характеризират главно с увреждане, дължащо се на свързването на антителя, но също рефлектира в несвойствен Т-клетъчен отговор, който съдейства за произвеждането на тези антители.

Както е използвано тук, когато се отнася до връзката между пептиди от изобретението и последователности на TCR, "съответстващ на" означава, че пептида има аминокиселинна последователност, която е достатъчно хомоложна на TCR последователността, за да стимулира ефективен регулаторен отговор, без да е необходимо да бъде идентична на TCR

последователността, както е показано в примери 2 и 3.

Имунната система е първичната биологична защита на гостоприемника (самият той) срещу потенциално вредни агенти (не самият той). Тези вредни агенти могат да бъдат патогени, като бактерии или вируси, модифицирани собствени клетки, включително инфектирани с вирус клетки, туморни клетки или други аномални клетки на гостоприемника. Най-общо, тези мишени на имунната система се означават като антигени. Разпознаването на един антиген от имунната система бързо мобилизира имунните механизми за унищожаване на този антиген, като по такъв начин се запазва неприкосновеността на средата на гостоприемника.

Главните прояви на антигенспецифичния имунен отговор са хуморалния имунитет (обусловен от антителата) и клетъчния имунитет (обусловен от клетките). Всеки от тези имунологични механизми се иницира чрез активиране на хелперни (CD4+) Т-клетки. Тези CD4+ Т-клетки на свой ред стимулират В-клетки, отговорни за синтеза на антитела чрез свързване на антигена, за пролиферацията и секрецията на тези антитела. Тези секретирани антитела се свързват към антигена и улесняват разрушаването му по други имунни механизми. По подобен начин CD4+ Т-клетките осигуряват стимулаторни сигнали за цитотоксичните (CD8+) Т-клетки, които разпознават и разрушават клетъчните мишени, например инфектирани с вирус клетки на гостоприемника. Така активирането на CD4+ Т-клетките е най-ранното събитие при стимулирането на имунния отговор. Следователно активирането на CD4+ Т-клетките е решаващо във всеки опит да се селекционира модифицирана имунологична функция.

Т-клетките дължат своята антигенна специфичност на Т-клетъчния рецептор (TCR), който се намира на повърхността на клетката, TCR е хетеродимерен гликопротеин, съставен от две полипептидни вериги, всяка с молекулно тегло от приблизително 45 kD. Идентифицирани са две форми на TCR. Едната е съставена от α -верига и β -верига, докато втората се състои от γ -верига и δ -верига. Всяка от тези четири TCR полипептидни вериги е кодирана с определен генетичен локус, съдържащ мултиплени непрекъснати генни сегменти. Те включ-

ват променливи (V) области от генните сегменти, област на свързване (J) на генните сегменти и константна (C) област от генните сегменти. В- и δ -веригите съдържат допълнителен елемент, наречен сегмент на различие (D). Тъй като D сегменти и елементи се намират само в някои TCR генетични локуси и полипептиди, по-нататъшните позовавания тук на D сегменти и елементи ще бъдат в скоби, за да се посочи включването на тези области само в подходящите TCR вериги. Така V(D)J се отнася или до VDJ последователности от вериги, които имат D област или се отнасят до VJ последователности на вериги, на които липсват D области.

При узряването на лимфоцита единични V, (D) и J - генни сегменти се преподреждат така, че да образуват функционален ген, определящ аминокиселинната последователност на TCR, експресиран от тази клетка. Тъй като обединението от V, (D) и J гените, които могат да бъдат преподреждани е многочленно, и тъй като индивидуалните членове на тези обединения могат да бъдат преподреждани във фактически всяка комбинация, пълният TCR репертоар е много разнообразен и способен специфично да разпознава и да свързва голям брой от антигени, на които може да бъде изложен един организъм. Обаче отделната T-клетка има само една TCR молекула и тази TCR молекула в голяма степен, ако не единствено, определя антигенната специфичност на тази T-клетка.

T-клетъчни патологии с автоимунна етиология.

Животинските модели са допринесли значително за разбирането на имунологичните механизми на автоимунните болести. Такъв животински модел, експериментален алергичен енцефаломиелит (ЕАЕ), е автоимунно заболяване на централната нервна система, което може да се предизвика у мишки и плъхове чрез имунизирание с базовия протеин на миелина (БПМ). Болестта се характеризира клинично с парализа и умерено отслабване и хистологично с периваскуларна моноядрена клетъчна инфилтрация на паренхимата на централната нервна система. Патогенезата е медирана от Т-клетки със специфичност за БПМ. Мултиплени клонове от БПМ-специфични Т-клетки са изолирани от животни, страдащи от ЕАЕ и се раз-

виват в непрекъсната култура. След стимулиране *in vitro* с БПМ тези Т-клетъчни клонове силно индуцират ЕАЕ, когато са прехвърлени в здрави гостоприемници. Важно е, че тези индуциращи ЕАЕ Т-клетки са специфични не само за същия антиген (БПМ), но също обикновено и за единствен епитоп на този антиген. Тези наблюдения сочат, че редките популации от автоагресивни Т-клетки са отговорни за патогенезата на ЕАЕ.

Анализът на TCR от ЕАЕ-индуциращи Т-клетки показва намалена разнородност на структурата на тези свързани със заболявания рецептори. В един анализ на 33 БПМ-реактивни Т-клетки са използвани само две α -вериги от V областта на генния сегмент и единичен α -верижан J генен сегмент. Подобно ограничаване на използването на β -верижния TCR ген също се наблюдава в тази Т-клетъчна популация. Установени са само два сегмента от β -верижната V област и два сегмента от J областта. По важно е, че приблизително 80 % от Т-клетъчните клонове имат идентични аминокиселинни последователности в областта на β -верижното V-D-J свързване. Тези открития потвърждават схващането за обща TCR структура между Т-клетките с подобни антигенни специфичности и сочат, че TCR е ефективна мишена за имунотерапевтични стратегии, целящи елиминирането на патогенезата на ЕАЕ.

Правени са различни опити да се използва антигенната специфичност на автоагресивните Т-клетки за намиране стратегия за лечение на ЕАЕ. Например, използвано е пасивно въвеждане на моноклонални антитела, специфични за TCR, представени в ЕАЕ-индуциращите Т-клетки. В модел на ЕАЕ у мишки, инфузията на моноклонално антитяло, специфично за V β 8, главната β -верига от V областта на гена, използвана от БПМ-специфични Т-клетки, намалява податливостта на мишките към последващо индуциране на ЕАЕ. (Acha-Orbea et al., Cell 54: 263 - 273, (1988) и Urban et al., Cell 54: 577 - 592, (1988). Подобна защита е показана при плъхове с ЕАЕ с моноклонално антитяло, реагиращо с неидентифицирана идиотипна детерминанта на TCR върху БПМ специфични Т-клетки (Burns et al., J. Exp. Med. 169: 27 - 39, (1989). Докато пасивната терапия с антитела изглежда, че има известен подобряващ ефект върху чувствителността към

ЕАЕ, тя създава редица потенциални проблеми. Постигнатата защита е преходна, като това изисква повтарящо се прилагане на анти-тела. Многократното вливане на анти-тела увеличава шансовете гостоприемникът да установи имунен отговор към прилаганото анти-тело, по-специално, ако е предизвикан у хетерогенни организми. По-нататък анти-тело отговорът спрямо патогенен Т-клетъчен клон представлява само един елемент от пълния имунен отговор и пренебрегва потенциалните възможности на клетъчния имунитет при разрешаването на автореактивността.

Ролята на клетъчния имунитет за намаляване на активността на автоагресивните Т-клетки при ЕАЕ е изследвана и са дадени потенциални терапии. По подобен на пасивния имунитет подход регулаторните Т-клетки са получени *ex vivo* и са приложени отново за имуно-терапия. Например, Sun et al., *Nature*, 332: 843 - 845, (1988) са изолирани CD8+ Т-клетъчен клон от оздравяващи плъхове, у които е индуцирана ЕАЕ чрез адоптивен трансфер от БПМ-специфична CD4+ Т-клетъчна линия. CD8+ Т-клетъчният клон показва цитолитична активност *in vitro* за CD4+ Т-клетките, използване за индуциране на болестта. Нещо повече, адоптивният трансфер на този CTL клон намалява чувствителността на плъховете реципиенти към последващо въздействие с БПМ. Lider et al., (*Science*, 239: 181 - 183, (1988) са изолирали също CD8+ Т-клетъчен клон със супресивна активност за ЕАЕ индуциращи Т-клетки. Този CD8+ клон е изолиран от плъхове, ваксинирани с атенюирани болестотворни Т-клетъчни клонове и, тъй като те не показват цитолитична активност *in vitro*, биха могли да супресират БПМ-управляваната пролиферация на ЕАЕ-индуциращите Т-клетки. Въпреки че тези изследвания сочат, че CD8+ Т-клетките могат да регулират напълно ЕАЕ, трудно е да се потвърди главната роля на тези селектирани CD8+ Т-клетъчни линии в дългосрочната резистентност на оздравели плъхове, тъй като Sedgwick et al., (*Eur. J. Immunol.*, 18: 495 - 502 (1988) ясно показват, че изчерпването на CD8+ клетките с моноклонални анти-тела не въздейства върху болестния процес или възстановяването.

В експериментите на Sun et al. и Lider et al., описани по-горе, прилагането на същес-

твуващите регулаторни Т-клетки преодолява главната пречка на пасивната анти-тело терапия. То позволява регулиращ отговор *in vivo* с удължено времетраене. Това обаче изисква *in vitro* култивиране с атенюирани болестотворни Т-клетки за развитие на клонове от такива регулаторни Т-клетки, което е скъп и трудоемък процес. Освен това, в популации като човешките МНС, които не са идентични за различните индивиди, прави това високо индивидуализирана терапевтична стратегия. Регулаторните клонове трябва да се получат за всеки пациент поотделно и тогава да се прилагат повторно на този пациент, за да се избегне потенциалната реакция на трансплантата срещу гостоприемник.

Директно ваксиниране с атенюирани болестотворни Т-клетъчни клонове също е използвано за терапия на ЕАЕ. БПМ-специфични Т-клетки, способни да предават болестта, са атенюирани чрез γ -облъчване или химично фиксиране и се използват за ваксиниране на плъхове. В някои случаи ваксинираните животни показват резистентност при последващи опити за предизвикване на ЕАЕ (Lider et al., *supra*; виж Cohen and Weiner, *Immunol. Today* 9: 332 - 335, (1988) за обзори). Ефективността на такива ваксини, обаче е непостоянна и степента на защита много варира. Т-клетките съдържат множество различни антигени, които предизвикват имунен отговор, когато цялата клетка е въведена като ваксина. Този феномен е показан от Offner et al., (*J. Neuroimmunol.*, 21: 13 - 22, (1989), който показва, че имунизацията с цели Т-клетки увеличава отговора от забавен тип свръхчувствителност (DTH), както е измерено по подуването на ухото за тези Т-клетки по степен на нарастване, съответно на нарастване броят на ваксинираните. Все пак, положителни DTH отговори са открити и в предпазените и в непредпазените животни. Плъховете отговарят по подобен начин на ваксиниране с енцефалитогенни Т-клетки и контролни Т-клетки. Обратно, ваксинирането с РРД-специфични Т-клетки от РРД-специфични Т-клетъчни линии индуцира DTH към ваксинираните клетки, както и към енцефалитогенния клон, дори когато не се наблюдава предпазване. Подобен отговор на ваксиниране плъхове и към болестотворни, и към контролни клетки, както количествено се опреде-

ля по забавения тип свръхчувствителност (измерване на клетъчно медиран имунитет), сочи, че многобройни антигени върху тези Т-клетки са индуцирали имунните отговори. При ваксинирането с атенюирани Т-клетки липсва специфичност за предпазния антиген върху повърхността на Т-клетката, както и променлива индукция на имунитет към този антиген. Като възможност за лечение на болести у човека, ваксинирането с атенюирани Т-клетки е съпроводено със същата трудоемкост и нужда от индивидуализирана терапия, както е отбелязано за инфузията с CD8+ клетки.

Изобретението предлага ефективен метод за имунотерапия на Т-клетъчно медиран патология, включително автоимунни заболявания, с които се избягват много от проблемите, свързани с посочените методи на лечение. Чрез ваксиниране, за разлика от пасивното прилагане на хетероложни антитела, собствената имунна система на гостоприемника се мобилизира да потиска автоагресивните Т-клетки. Така супресията е постоянна и може да включи всеки и всички имунологични механизми за осъществяване на тази супресия. Този многостранен отговор е по-ефективен, отколкото едноплановата супресия, постигната чрез пасивно прилагане на моноклонални антитела или производни на налични регулаторни Т-клетъчни клонове. Доколкото се отнасят до автоимунните заболявания, ваксините съгласно изобретението съдържат TCR от Т-клетки, медиращи автоимунни болести. Ваксините могат да бъдат изцяло TCR, по същество пречистени от Т-клетъчни клонове, индивидуални Т-клетъчни рецепторни вериги, например α , β и пр., или части от такива вериги самостоятелно или в комбинация. Ваксините могат да бъдат хомогенни, например единичен пептид или могат да бъдат съставени от повече от един пептид, всеки от които съответства на част от TCR. "По същество чист" означава, че TCR по същество е свободен от други биохимични остатъци, с които той нормално е свързан в природата. Алтернативно, ваксините обхващат пептиди с различна дължина, съответстващи на TCR или на части от тях. Пептидите могат да се произведат синтетично или рекомбинантно, със средства, добре известни на специалистите от областта. За предпочитане пептидните ваксини отговарят на областите от

TCR, които отличават този TCR от други непатогенни TCR. Такива специфични области са за предпочитане локализирани в V областта(тите) на съответните TCR полипептидни вериги. За предпочитане е пептидът да съответства на къса последователност, имаща V(D)J връзка, ограничавайки по такъв начин имунния отговор единствено до тези Т-клетки, които носят тази единична детерминанта.

Алтернативно, ваксините може да съдържат антиидиотипни антитела, които са вътрешни отражения на описаните по-горе пептиди. На специалистите в областта са известни методи за създаване, подбор и прилагане на такива антиидиотипни ваксини. Виж например, Bichmann, et al., CRC Critical Reviews in Immunology 7: 193 - 227 (1987), включен в приложената литературна справка.

Ваксините се прилагат на гостоприемник, проявяващ или с риск от проявление на автоимунен отговор. Отчетлива клинично активна автоагресивна активност се наблюдава като лезия в случая на пемфигус вулгарис, CNS в случая на мултипла склероза или миастения гравис, или синуиална течност, или тъкан в случая на ревматоиден артрит. TCR гените от тези автоагресивни Т-клетки след това се секвенират. Полипептидите, съответстващи на TCR или на техни части, които са представени избирателно сред заболяванията, включващи Т-клетки (спрямо непатогенни Т-клетки), може след това да бъдат подбрани като ваксини, и изготвени и прилагани, както е описано по-горе.

Т-клетъчни патологии със злокачествена етиология.

За да се илюстрира полезността на TCR ваксинирането, са разгледани автоимунните заболявания. Обаче, Т-клетъчната лимфома е друга Т-клетъчна патология, която може да бъде податлива към този тип лечение. Приложение на тази технология в лечението на Т-лимфома се провежда по фактически идентичен начин. В един важен аспект, обаче тази технология е по-лесно приложима към Т-клетъчни пролиферативни заболявания, докато изолирането на патогенни Т-клетки е по-лесно осъществимо. След като веднъж са изолирани клоновете, технологията се прилага по описания по-горе начин. Специфично TCR гените на Т-лимфомите се секвенират, подходящите области от тези

TCR се идентифицират и използват като ваксини. Ваксините могат да съдържат единичен или множество пептиди и могат да се прилагат във форми със или без адюванти по известни начини.

Следващите примери илюстрират изобретението без да го ограничават.

Пример 1. Модел на ЕАЕ у плъхове

Женски плъхове порода Lewis (Charles River Laboratories, Raleigh-Durham, N. C.) се имунизират във всяка задна лапа с 50 µg базичен протеин на миелина от морско свинче, емулгиран в пълен адювант на Freund. Първите признаци на заболяването се наблюдават обикновено 9 - 11 дни след имунизацията. Тежестта на заболяването се отчита по триточкова скала, както следва: 1 - отпусната опашка; 2 - отслабване на задния крак; 3 - парализа на задния крак. След протичане на болестта от приблизително 4 до 6 дни повечето от плъховете се възстановяват спонтанно и не се поддават на последващо предизвикване на ЕАЕ.

Пример 2. Селекция и приготвяне на ваксините.

Ваксинирането се провежда с Т-клетъчен рецепторен пептид, чиято последователност е изведена от ДНК последователността на Т-клетъчно рецепторния β- верижен ген, преобладаващ у ЕАЕ-индуциращите Т-клетки на SJ/L мишки. ДНК последователността е тази, посочена от Urban et al., supra, която е включена тук за справка. Пептид с девет аминокиселини, имащ последователността на VDJ връзката от TCR β-верига от мишка, се синтезира по методи, известни на специалистите от областта. Последователността на този пептид е: SGDAGGGYE. (Аминокиселините са представени с конвенционалния еднобуквен код). Еквивалентната последователност при плъховете е известно, че е SSD-SSNTE (Burns et al., J. Exp. Med. 169: 27 - 39 (1989)).

Пептидът се изсолва чрез колонна хроматография на Sephadex G-25 (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, N. J.) в 0,1 М оцетна киселина и разтворителят след това се отстранява в два цикъла на лиофилизация. Част от пептида се конюгира с кейхолов прозрачен хемианин keyhole limpet hemocyanin - KLH, с глутаралдехид в съотношение от 7,5 mg пептид за mg KLH. Полученият конюгат се диализира с фосфатен буферен разтвор на натриев хлорид (PBS).

Пример 3. Ваксиниране срещу ЕАЕ

Ваксините, използвани в тези изследвания, съдържат свободен VDJ пептид, а също и VDJ пептид, конюгиран с KLH. Те се разтварят в PBS и се емулгират с равни обеми или от (1) непълен адювант на Freund (IFA), или (2) пълен адювант на Freund (CFA), приготвени чрез суспендиране на 10 mg/ml топлинно унищожени сухи Mycobacterium tuberculosis H37ra (Difco Laboratories, Detroit, Mich.) в IFA. Емулсиите се прилагат на женски плъхове порода Lewis, на възраст 8 - 12 седмици, в краен обем от 100 µl на животно (50 µl) във всяка от задните лапи). Прилагат се по 5 µg на плъх от неконюгирания VDJ пептид. KLH-VDJ конюгатът се прилага в дози, еквивалентни на 10 µg KLH на плъх. 29 дни по-късно на всеки плъх се въвежда в предните лапи 50 µg базичен протеин на миелина от морско свинче в пълен адювант на Freund. Животните се контролират ежедневно като се започне от 9-ия ден за клинични признаци на ЕАЕ и се отчитат, както е описано по-горе. Резултатите са представени в таблица 1. Както може да се види, у ваксинираните индивиди не само има намаляване на случаите на заболяване, но и при тези, които са заболели, тежестта на заболяването се намалява и/или настъпването се забавя. Степента на защита варира с формата на ваксината, като тези включващи CFA като адювант, показват по-голяма степен на защита.

Таблица 1.

		Дни след въвеждане									
Животно	Ваксиниране	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
№	(адювант)										
1	VDJ (IFA)	-	-	2	3	3	3	-	-	-	
2	"	-	-	1	3	3	3	2	-	-	
3	"	-	-	-	3	3	3	2	-	-	
4	VDJ (CFA)	-	-	-	-	1	1	1	-	-	
5	"	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
6	"	-	-	-	1	3	3	3	2	-	
7	KLH-VDJ (CFA)	-	-	-	1	3	2	-	-	-	
8	"	-	-	-	-	1	1	1	1	-	
9	"	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
10	KLH-VDJ (IFA)	-	1	3	3	2	2	1	-	-	
11	"	-	-	3	3	3	3	3	2	-	
12	"	-	-	1	3	3	3	3	-	-	
13	без	1	3	3	3	3	1	-	-	-	
14	"	-	1	3	3	3	1	-	-	-	
15	"	1	3	3	3	1	-	-	-	-	

Отчитане:

- никакви симптоми

1) отпускане на опашката

2) отслабване на задния крак

3) парализа на задния крак

Въпреки, че изобретението е описано с позоваване на предпочитано изпълнение, могат да се направят различни модификации, без да се излиза от същността му. Съобразно това изобретението е ограничено само от патентните претенции.

Патентни претенции

1. Състав за редуциране силата на Т-клетъчно медирана патология, характеризиращ се с използването на рестриктиран Т-клетъчен рецепторен ген, включващ антиидиотипно

35 антиляло, което е вътрешно отражение на аминокиселинна последователност на Т-клетъчен рецептор (TCR), намиращ се на повърхността на автоагресивни Т-клетки, медиращи дадената патология и фармацевтично приемлива среда, където посоченото антиидиотипно антиляло индуцира имунен отговор спрямо посочените автоагресивни Т-клетки, като редуцира силата на посочената патология.

2. Състав съгласно претенция 1, където посоченото антиидиотипно антиляло съответства на фрагмент от посочената аминокиселинна последователност от посочения Т-клетъчен рецептор.

3. Състав съгласно претенция 2, където посоченият фрагмент включва V(D)J присъединителна последователност.

4. Състав съгласно претенция 1, съдържа

жащ още и адювант.

5. Състав съгласно претенция 1 или 2, където посоченият състав включва антиидиотипни антитела, които са вътрешни отражения на аминокиселинните последователности на повече от един Т-клетъчен рецептор или негов фрагмент или които са вътрешни отражения на аминокиселинни последователности, съответстващи на един или повече различни фрагменти от същия Т-клетъчен рецептор.

6. Метод за редуциране на Т-клетъчно медирана патология, характеризиращ се с използването на рестриктиран Т-клетъчен рецепторен ген от индивид, проявяващ или с риск от проявление на Т-клетъчно медирана патология, включващ прилагане на имунологично ефективно количество от състава съгласно претенция 1 или 2.

7. Метод съгласно претенция 6, където посоченият състав е присъединен към носител.

8. Метод съгласно претенция 6, където посоченият състав се прилага повече от веднъж.

9. Метод съгласно претенция 6, където посоченият състав се прилага във форма, включваща адювант.

10. Състав за редуциране силата на Т-клетъчно пролиферативно заболяване, медирано от нерегулирана Т-клетъчна клонална репликация, характеризиращ се с използването на рестриктиран Т-клетъчен рецепторен ген, включващ антиидиотипно антитяло, което е вътрешно отражение на аминокиселинна последо-

вателност на Т-клетъчен рецептор (TCR), представен на повърхността на посочените реплициращи се Т-клетъчни клонове, което антиидиотипно антитяло индуцира имунен отговор спрямо посочените реплициращи се Т-клетъчни клонове, които редуцират силата на посоченото заболяване.

11. Състав съгласно претенция 10, където посоченото антиидиотипно антитяло съответства на фрагмент от посочената аминокиселинна последователност на посочения Т-клетъчен рецептор.

12. Състав съгласно претенция 11, където посоченият фрагмент включва V(D)J присъединителна последователност.

13. Състав съгласно претенция 10, която включва още и адювант.

14. Метод за редуциране силата на Т-клетъчно медирана патология, характеризиращ се с ограничено използване на Т-клетъчен рецепторен ген на индивид, проявяващ или с риск от проявление на Т-клетъчно медирана патология, включващ прилагане на състава съгласно претенция 10.

15. Метод съгласно претенция 14, където посоченият състав е прикрепен към носител.

16. Метод съгласно претенция 14, където посоченият състав се прилага повече от веднъж.

17. Метод съгласно претенция 14, където посоченият състав се прилага във форма, включваща адювант.

Издание на Патентното ведомство на Република България
1113 София, бул. "Д-р Г. М. Димитров" 52-Б

Експерт: Св.Йорданова

Пор. № 40656

Редактор: Т.Панчева

Тираж: 40 ЗС