

P0202779

Immunológiai eljárás szöveti transzglutamináz (tTG) elleni antitestek kimutatására, tTG alkalmazása diagnosztikai célokra és terápiás ellenőrzésre, valamint tTG-t tartalmazó orális gyógyászati hatóanyag

A2

K I V O N A T

A találmány tárgyát eljárások képezik ellenanyagok testfolyadékokban történő kimutatására, szöveti transzglutaminázzal („tissue transglutaminase”; tTG), annak antigén sajátosságú struktúráival, immunreaktív szekvenciáival vagy analógjaival, valamint tTG-tartalmú vegyületekkel, azok antigén sajátosságú struktúráival, immunreaktív szekvenciáival vagy analógjaival adott immunreakció alapján.

A találmány tárgyát képezi tTG és a fenti vegyületek alkalmazása betegségek diagnózisára és a terápia hatásosságának ellenőrzésére; előnyösen, krónikus gyulladásos betegségek vagy autoimmun betegségek diagnózisára és terápiájuk hatásosságának ellenőrzésére; például „sprue” vagy „coeliakia” diagnózisára és terápiája hatásosságának ellenőrzésére.

A találmány tárgyát képezik továbbá, szájon át adagolható gyógyászati hatóanyagok, amelyek aktív hatóanyagként tTG-t, tTG-tartalmú vegyületeket vagy azok részeit tartalmaznak, és amelyek alkalmasak immuntolerancia kiváltására.

A találmány szerinti megoldás alkalmas tTG-vel kapcsolatos immunológiai rendellenességek diagnózisára és a terápiás hatékonyság ellenőrzésére.

1963

P0202779

Képviselő:

Danubia

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

B u d a p e s t

Immunológiai eljárás szöveti transzglutamináz (tTG) elleni antitestek kimutatására, tTG alkalmazása diagnosztikai célokra és terápiás ellenőrzésre, valamint tTG-t tartalmazó orális gyógyászati hatóanyag

A találmány tárgyát eljárások képezik ellenanyagok testfolyadékokban történő kimutatására, szöveti transzglutaminázzal („tissue transglutaminase”; tTG), annak antigén sajátosságú struktúráival, immunreaktív szekvenciáival vagy analógjaival, valamint tTG-tartalmú vegyületekkel, azok antigén sajátosságú struktúráival, immunreaktív szekvenciáival vagy analógjaival adott immunreakció alapján.

Ugyancsak a találmány tárgyát képezi tTG és a fent említett vegyületek alkalmazása betegségek diagnózisára és a terápia hatásosságának ellenőrzésére; előnyösen, krónikus gyulladásos betegségek vagy autoimmun betegségek diagnózisára és terápiájuk hatásosságának ellenőrzésére; előnyösebben, „sprue” vagy „coeliakia” diagnózisára és terápiája hatásosságának ellenőrzésére. A találmány tárgyát képezik továbbá, szájon át adagolható gyógyászati hatóanyagok, amelyek aktív hatóanyagként tTG-t, tTG-tartalmú vegyületeket, azok antigén sajátosságú struktúráit, immunreaktív szekvenciáit vagy analógjait tartalmaznak, és alkalmazhatók a fenti

Aktaszámunk: 89218-597/PÁ

vegyületekkel szemben irányuló immunreakcióval járó betegségek kezelésére, azáltal, hogy a fent említett vegyületek szájon át történő adagolásával immuntoleranciát váltunk ki.

Az eljárások alkalmazhatók tTG-vel, tTG-tartalmú vegyületekkel azok antigén sajátosságú struktúráival, immunreaktív szekvenciáival vagy analógjaival szemben irányuló immunreakcióval kapcsolatos betegségek diagnózisára és/vagy terápiájuk hatásosságának ellenőrzésére.

A találmány alapját az a felismerés képezi, hogy a szöveti transzglutamináz (tTG; EC 2.3.2.13) tölti be az autoantigén szerepét sprue vagy coeliakia betegségekben.

A fenti felismerés alapján fejlesztettük ki a találmány szerinti immunológiai eljárást, amely alkalmas tTG-vel és tTG-tartalmú vegyületekkel szembeni ellenanyagok kimutatására.

A coeliakia a vékonybél nyálkahártyájának betegsége, amelynek első tünetei főként a késői csecsemőkorban és a tipegő korban jelentkeznek. Amennyiben a megfelelő klinikai kép nem jelentkezik a felnőtt kort megelőzően, a betegséget „nem-trópusi spruenak” nevezzük. Mindkét kifejezés tehát ugyanarra a betegsége vonatkozik. A spruet a nyálkahártya gyulladásos elváltozása kíséri, aminek következménye általános malabszorpció (felszívódási zavar). Az esetek többségében, gluténmentes diéta alkalmazásán alapuló kezelésre a morfológiai és klinikai tünetek javulnak.

Jól ismert kóroki faktorok a búza, árpa, rozs - és bizonyos mértékben a zab -gluténjei; míg alacsonyabb fokú filogenetikai rokonságban levő növényfajták, például a kuko-

rica, rizs és szója gluténjei nem váltanak ki betegséget. Az említett glutének közül, a kóroki szerepet az alkoholban oldódó prolamिनoknak, közelebbről, az α -gliadinnak tulajdonítják.

A fenti okokból, a sprue elsősorban olyan országokban fordul elő, ahol a búza fő élelmiszer-alapanyagként szerepel (például Európa, U.S.A., Ausztrália), a betegség előfordulási aránya az újszülöttek között például Dániában 0,14/1 000, Spanyolországban 0,7/1 000, Olaszországban 1/1 000, Németországban 0,45/1 000, és Svédországban 2,42/1 000.

Újabb vizsgálatok azonban azt mutatták, hogy a betegség nyilvánvaló klinikai tünetekkel nem járó formája - azaz, a nyálkahártya morfológiai elváltozása, súlyosabb tünetek jelentkezése nélkül - sokkal gyakoribb, mint korábban azt hittük. Egy 1994-ben Olaszországban végzett vizsgálat szerint, iskolás gyermekek közt a betegség előfordulási aránya 3,28/1 000. A latens sprue kockázata a sprueban szenvedő betegek legközelebbi rokonaiban eléri az 50 %-ot.

Az elsősorban latens formában jelentkező spruet gyakran polimorf dermatózis azaz, *Dermatitis herpetiformis* kíséri, amelynek jellemző tünete a bőr papillacsúcsaiban található, granuláris IgA-lerakódást tartalmazó kis méretű bőr alatti hólyagok jelenléte. A vékonybél biopsziája szabálytalan, többé-kevésbé súlyosan károsodott nyálkahártyát mutat.

Jól megalapozott kapcsolat mutatható ki továbbá a sprue és az inzulinfüggő *Diabetes mellitus*, a pajzsmirigy betegségei és a szelektív IgA-hiány közt.

A spruet kísérő számos klinikai tüneten, például anémián (vérszegénységen) felül, amely - többek között - a B12-vitamin felszívódási zavarára, valamint a fokozott vérzékenységi hajlamot eredményező K-vitamin hiányra vezethető vissza, fontos megemlíteni a betegséggel kapcsolatosan ki-mutatható jelentősen megnövekedett kockázatot gasztrointesztinális (gyomor-bélrendszeri) malignus tumorok kialakulására.

A sprueban szenvedő betegek akár 15 %-ánál, többnyire 50 éves kor felett, tumoros betegség alakul ki; ezek 50 %-a bél T-sejtes limfóma, további 25 % pedig a nyelőcsövet, száj-garat üreget és vékonybelet érintő tumor.

A sprue kezelése életre szóló gluténmentes diéta szigorú betartásán alapul, amelyben nem csak a búzából készült gluténtartalmú termékektől kell tartózkodni, hanem a rozs-ból, árpából és zabból készült termékeket is el kell kerülni. A beteg számára ez szigorú megkorlátásokat jelent mind az étkezési szokások, mind a társadalmi érintkezés tekintében.

Amennyiben a spruet időben diagnosztizálják és annak kezelését időben megkezdik, a betegség jó prognózisú. Az egyszer már jelentkezett komplikációk azonban gyakran nem fordíthatók vissza teljes mértékben. A fentiekkel szemben, ha a betegséget nem ismerik fel, és az kezeletlen marad, a felszívódási zavar következtében súlyos tünetek léphetnek

fel. Végül, számolnunk kell bél eredetű limfómák és más gyomor-bél rendszeri daganatos elváltozások kialakulásának fokozott kockázatával.

Jelenleg, a vékonybél biopsziás vizsgálata képezi a sprue diagnózisának és - a gluténmentes diéta betartása mellett - a betegség utánkövetésének legmagasabb szintű elismert módszerét, bár egyre nagyobb jelentőséget kapnak immunológiai markerek kimutatásán alapuló nem-invazív diagnosztikai eljárások is. Mivel sprueban szenvedő betegek szérumában olyan, IgA- és IgG-osztályba tartozó ellenanyagok mutathatók ki, amelyek egyrészt, gliadinnal szemben irányulnak, másrészt, az endomizium („endomysium”; kollagén és elasztikus elemeket is tartalmazó kötőszöveti sövényrendszer) valamely autoantigénjével reagálnak, amely utóbbi speciális kötőszövet, amely többek között, I., III. és V. kollagéneket, elasztikus rostokat, nem-kollagén természetű proteineket, például fibronektint és proteoglikánokat tartalmaz -, a beteg szérumát ELISA-eljárással gliadinnal szemben irányuló IgG- és IgA-ellenanyagok jelenlétére, indirekt immunfluoreszcenciás eljárással pedig endomiziummal szemben irányuló IgG- és IgA-ellenanyagok jelenlétére tesztelhetjük. Míg a gliadinnal szemben irányuló ellenanyagok nem elég specifikusak sprue betegségre, az endomiziummal szemben irányuló IgA-ellenanyagok kimutatását nagy fokú érzékenység és specifitás (97-100 %) jellemzi. Az immunfluoreszcens vizsgálathoz azonban főemlőstől nyert nyelőcsőmetszetre van szükség. Jelenleg, kísérletek folynak

endomiziummal szembeni ellenanyagok köldökzsínór-szöveten történő kimutatására is.

Az korai diagnózissal és a diéta szigorú betartásával a betegség tünetmentes állapotban tartható, és a betegeknek fennálló fokozott kockázat malignus tumorok kialakulására ugyancsak a normális szintre csökkenthető. Nagy az érdeklődés tehát sprue kimutatására alkalmas eljárások kifejlesztésére. Mivel a sprue latens formájában szenvedő betegek is a magas kockázati csoportba tartozónak tekintendők, valamennyi érintett egyént (különösen a betegek legközelebbi hozzátartozóit), és végső soron - amint azt Olaszországban mérlegelik - valamennyi iskolás korú gyermeket vizsgálnunk kellene egy érzékeny, specifikus, könnyen kivitelezhető és alacsony költséggel járó vizsgálati eljárással.

Eddig azonban, a nagy populációk vizsgálatára kiterjedő szűrési programok kudarcot vallottak, a következő problémák következtében:

Az invazív duodenális biopszia tünetmentes egyéneknél ésszerűtlen beavatkozás, és különösen költséges.

A gliadinnal szemben irányuló ellenanyagok kimutatására szolgáló ELISA-eljárások alkalmazhatósága megkérdőjelezhető, azok nem kielégítő specifitása miatt.

Az IgA-osztályú ellenanyagok kimutatására alkalmas immunfluoreszcens eljárások, amelyek főemlős nyelőcsőszövet alkalmazását teszik szükségessé, általános szűrővizsgálat céljára túlságosan költségesek. Ezen felül, értékelésük szubjektív, és nem teszik lehetővé az IgA-hiányos sprue-betegek (azaz, a betegek 2 %-ának) azonosítását.

Eddig tehát sprue/coeliakia betegség kimutatására és a megfelelő terápia hatásosságának ellenőrzésére alkalmas nem-invazív, specifikus, kvantitatív, gyors, könnyen és olcsón kivitelezhető kimutatási eljárás nem állt rendelkezésre.

Ezt a problémát kívántuk megoldani. Azon meglepő eredmény alapján, hogy a szöveti transzglutamináz (tTG; EC 2.3.2.13) tölti be az autoantigén szerepét sprue betegségben, a csatolt 1-6. igénypontok szerinti immunológiai eljárásokat fejlesztettünk ki, melyek alkalmasak tTG és tTG-tartalmú vegyületekkel szemben irányuló ellenanyagok kimutatására testfolyadékokban, különösen szérumban, amely eljárás nem csupán sprue vagy coeliakia diagnózisát teszi lehetővé, hanem valamennyi, tTG-vel vagy tTG-tartalmú vegyülettel, azok antigén sajátosságú struktúráival, immunreaktív szekvenciáival vagy analógjaival szemben irányuló immunreakcióval járó betegségeit is.

A szöveti transzglutamináz a transzglutaminázok (TG) családjába tartozik. A TG-k (EC 2.3.2.13) Ca^{2+} -függő, acil-transzfert katalizáló enzimek; az általuk katalizált reakciókban peptidkötésben lévő glutaminok γ -karboxamid-csoportjai szolgálnak acil-donorokként. Acil-akceptorokként, elsősorban proteinkötésben lévő lizinek szerepelnek, így a transzfer ϵ -(γ -glutamil)lizin-kötést eredményez. A TG-k szubsztrátspecifitása acildonorok vonatkozásában igen szigorú (függ az aminosav-szekvenciától), míg a lehetséges akceptorok köre kivételesen tág. A képződő kovalens peptidkötések nagy mértékben stabilak és proteáz-rezisztensek, és

a keresztkötést tartalmazó proteinek vegyszerekkel, enzimatis vagy fizikai behatásokkal szembeni megnövekedett ellenállóképességéhez vezetnek.

Továbbá, a különböző TG-k széles körű előfordulása különböző szervekben, szövetekben, plazmában és szövet közti folyadékokban, összefüggést mutat a transzglutamináz által módosított proteinek előfordulásával véralvadékokban, sejtmembránokon, a hám szarurétegében, hajban, körmökben és az extracelluláris mátrixban.

Az ismert transzglutaminázok megkülönböztethetők fizikai sajátságaik, a test különböző helyein történő kimutathatóságuk és elsődleges struktúrájuk alapján.

A szöveti TG-t (tTG-t) celluláris, eritrocita, endotheliális, citoplazmáris, máj vagy II. típusú TG-nek is nevezik, és az 75-85 kDa molekulatömegű monomer.

A protein 687 aminosavból álló teljes aminosav-szekvenciáját cDNS alapján határozták meg. A proteinszekvencia vonatkozásában, 84 %-os homológia mutatható ki a humán enzim és az egér makrofágokból nyert megfelelő enzim közt; és 81 %-os homológia mutatható ki a humán enzim és a megfelelő tengerimalac enzim közt. A fenti fajokban előforduló nukleotidszubsztitúciók gyakran nem befolyásolják az aminosav-szekvenciát. Az aktív centrum nagy mértékben konzervált, és jelentős proteinszekvencia-homológiát mutat a három említett faj esetében (azaz, az 51 aminosavból 49 azonos), továbbá, nagy fokú homológiát mutat (75 %) a XIII. faktor alegységével.

A proteinben szignálpeptid vagy glikozileződés nem mutatható ki, és annak ellenére, hogy abban több cisztein aminosav található, diszulfid-hidakak nincsenek jelen. Fluoreszcens hibridizációs eljárás szerint, a humán szöveti transzglutamináz gén a 20q12-kromoszómarégióban található. Bár az enzimfelszabadulás mechanizmusa nem világos, egyértelmű bizonyítékok támasztják alá, hogy a tTG, általános intracelluláris elterjedtsége ellenére, fontos szerepet tölt be az extracelluláris mátrixban (ECM-ben). Ezen felül, az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció fiziológiás körülmények mellett valószínűtlen, hogy elérje a tTG aktivitásához szükséges szintet, míg az extracelluláris térben elegendően magas Ca^{2+} -koncentráció mutatható ki.

Több vizsgálat kapcsolatot mutatott ki a tTG és a fibronectin ECM-protein közt. A fibronectinen felül, a nidogén, az N-terminális prokollagén III. peptid, az V. és XI. kollagének, az oszteonektin - amely egy mikrofibrillum-asszociált glikoprotein -, magas molekulatömegű dermatánszulfát proteoglikán és a galektin-3 lektin ECM-molekulák is a tTG specifikus szubsztrátjaiként azonosíthatók.

Továbbá, a tTG sebgyógyulásban betöltött lényeges szerepére utalnak azok az immunfluoreszcens vizsgálatok, amelyeket tenyésztett WI38-sejteken (tüdő embrionális fibroblasztokon) végeztek, amely sejtek esetében, normális körülmények mellett nem mutatható ki extracelluláris tTG-aktivitás, de mesterségesen előidézett sérülés esetében az enzim extracellulárisan is kimutathatóvá válik. Az enzim feltehetően passzív felszabadulását a sérült sejtekből,

kezdetben nem-kovalens kötés kialakulása követi az enzim és az ECM, közelebbről, az azt alkotó fibronectin és fibrilláris kollagének közt, miáltal az enzim néhány órára katalitikusan aktívvá válik. Patkánymodellben - hasonlóképp, sérülés mesterséges úton történő létrehozását követően -, 5 napon át fokozott tTG-aktivitás volt kimutatható. Továbbá, amennyiben humán eritrocita lizátumokat plazmával inkubáltunk, azt találtuk, hogy a felszabaduló tTG erős affinitást mutat fibronectinhez. Valamennyi adat arra utal, hogy tTG ECM-hez történő kötődése központi szerepet játszik a sebgyógyulás korai fázisában, közelebbről, az a XIII. faktorral együtt hozzájárul a fibrin stabilizálásához, úgy, hogy keresztkötéseket képez az extracelluláris proteinek közt, miáltal védőréteg és stabil adhezív szubsztrát képződik a sérült sejtek körül. Eddig, nem sikerült gerincesekben kimutatni olyan enzimet, amely képes lenne a proteinek tTG által katalizált, különlegesen stabil keresztkötéseit hasítani.

Azon felismerés alapján, hogy a tTG szerepel autoantigénként sprue betegségben, a találmány tárgyát képezi tTG, tTG-tartalmú vegyületek, azok antigén sajátosságú struktúráinak, immunreaktív szekvenciáinak vagy analógjainak alkalmazása a fenti vegyületekkel szemben irányuló immunreakcióval járó betegségek diagnózisára és terápiájuk hatásosságának ellenőrzésére. Közelebbről, a találmány szerinti eljárásokkal diagnosztizálhatók például a felsorolt betegségek: akut gyulladásos betegségek, például tüdőgyulladás, glomerulonephritis, vírushepatitis; krónikus gyulladásos betegségek,

például Crohn-betegség, *Colitis ulcerosa*; autoimmun betegségek, például autoimmun hepatitis, Sjogren-szindróma, Wegener-granulomatózis, reumatoid artritisz, idiopátiás szervfibrózisok, például tüdőfibrózis. A találmány szerinti kimutatási eljárás különösen előnyösen alkalmazható sprue diagnózisára és terápiája hatásosságának ellenőrzésére. Mivel az eljárás gyorsan és költségkímélő módon kivitelezhető, lehetővé teszi a populáció hatékony szűrését tTG-ellenanyagok jelenlétére.

A találmány szerinti eljárásban tTG-ként alkalmazhatunk állati, szintetikus vagy rekombináns eredetű tTG-t; ugyanez érvényes tTG-tartalmú vegyületekre, amelyek ezen felül, lehetnek vegyes eredetűek (például tartalmazhatnak állati tTG-t szintetikus peptiddel összekapcsolva). A leírásban tTG-tartalmú vegyületeken tTG proteinekkal alkotott kémiai vegyületeit vagy azok analógjait értjük. A leírásban tTG-analógoknak vagy a tTG-tartalmú vegyületek analógjainak nevezünk valamennyi olyan antigén sajátosságú struktúrát, amely tTG-vel vagy tTG-tartalmú vegyülettel szembeni ellenanyagokkal immunreakcióba lép, ilyenek lehetnek például szintetikus peptidek. Immunreaktív szekvenciákon tTG vagy tTG-tartalmú vegyületek proteolízis, szintézis vagy géntechnológiai beavatkozás révén létrejött fragmentumait, valamint azok aminosav-szubsztitúcióval létrehozott variánsait értjük.

A találmány szerinti immunológiai kimutatási eljárást jól ismert módszerek szerint végezzük. A betegben jelen lévő ellenanyagok kimutatására tehát bármely direkt (például

szenzor „chip” alkalmazásán alapuló) vagy indirekt módszer alkalmazható.

A direkt eljárások szerint, az ellenanyagok antigénhez történő kötődését megváltozott kémiai vagy fizikai sajátságok alapján mutatjuk ki, úgy, hogy jelölt kötődő vegyület kimutatását magában foglaló további lépésekre nincs szükség.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a tTG-ellenanyagokat immunvizsgálati eljárással, előnyösen, szilárd fázisú immunvizsgálati eljárással mutatjuk ki, úgy, hogy a reagálóanyagot, közvetlen vagy közvetett módon, könnyen kimutatható jelölő vegyülettel kapcsoljuk össze. Előnyösebben, a kimutatást ELISA, RIA vagy immunfluoreszcens módszerrel mutatjuk ki. Ilyen kimutatási eljárásokban alkalmazott módszerek szakember számára jól ismertek.

ELISA-eljárásban például, az antigént - esetünkben tTG-t - közvetlenül vagy közvetett módon hordozóhoz, például polisztrénhez kötjük. A kimutatandó ellenanyaggal történő inkubálást követően, az antigénhez kötődött ellenanyagokat - például beteg szérumában található ellenanyagokat - közvetlen vagy közvetett módszerrel mutatjuk ki, enzimhez kötött anyagok alkalmazásával. Ilyen anyagokként alkalmazhatunk ellenanyagokat, ellenanyag-fragmentumokat vagy nagy affinitású ligandumokat, például biotin jelölőanyaghoz kötődő avidint. Enzimekként alkalmazhatunk például peroxidázt, alkalikus foszfatázt, β -galaktozidázt, ureázt vagy glükóz oxidázt. A kötődött enzimek, ezáltal a kötődött tTG-

ellenanyagok mennyiségét például kromogén szubsztrát hozzáadásával határozhatjuk meg.

Radioimmunvizsgálati eljárásokban, az antigént - például tTG-t - az előbbiekhöz hasonló módon, közvetlenül vagy közvetett módon hordozóhoz, például polisztrénhez kötjük. A kimutatandó ellenanyaggal történő inkubálást követően, az antigénhez kötődött ellenanyagokat - például beteg szérumban található ellenanyagokat radioaktív jelölést, például ^{125}I -izotópot hordozó anyagok alkalmazásával mutatjuk ki. Ilyen anyagokként alkalmazhatunk ellenanyagokat, ellenanyag-fragmentumokat, nagy affinitású ligandumokat, például biotin jelölőanyaghoz kötődő avidint. A kötődött radioaktivitás mértékét megfelelő mérőkészülékkel határozhatjuk meg.

Immunfluoreszcens vizsgálati eljárások alkalmazásakor, az antigénhez kötődött ellenanyagok mennyiségét a fentiekkel azonos elv alapján határozzuk meg, fluoreszcens jelölőanyagot, például fluoreszcein-izotiocianátot (FITC) hordozó anyagok alkalmazásával. Ilyen anyagokként alkalmazhatunk ellenanyagokat, ellenanyag-fragmentumokat, nagy affinitású ligandumokat, például biotin jelölőanyaghoz kötődő avidint. A kötődött fluoreszcens festék mennyiségét ezután megfelelő mérőkészülékkel határozzuk meg.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a betegben található ellenanyagokat agglutinációs eljárással vagy géldiffúziós eljárással mutatjuk ki. Ezek az módszerek szakember számára jól ismertek. Géldiffúziós eljárás szerint, az antigént vagy ellenanyagot tartalmazó oldatot például agar vagy agarózlemez egymáshoz közel eső mélyületeibe

mérjük. Esetünkben, antigén oldatként alkalmazhatunk például tTG-oldatot; ellenanyag oldatként pedig például vérszérumot. Amint az anyagok kidiffundálnak a mélyületekből, koncentrációgradiens jön létre, amelynek centrumát a megfelelő mélyület képezi. Amennyiben a gélben az átfedő antigén és ellenanyag koncentrációk aránya meghatározott értéket ér el, és az ellenanyag oldat az antigénnel szemben irányuló ellenanyagokat tartalmaz, precipitátum képződik a gélben.

Az agglutinációs eljárások szerint, valamely antigén- (például tTG-) hordozó részecskék, például latex vagy poliszitirén részecskék közt keresztkötéseket hozunk létre ellenanyagok, például szérumból származó ellenanyagok alkalmazásával. A képződő aggregátumokat például turbidimetriával mutathatjuk ki.

A találmány egy különösen előnyös megvalósítási módja szerint, a sprueban szenvedő betegek szérumában található ellenanyagokat IgA-specifikus vagy IgG-specifikus ELISA alkalmazásával mutatjuk ki. Azt találtuk, hogy a sprueban szenvedő betegek szérumában található IgA-ellenanyagok kimutatására alkalmas, tTG alapú, újonnan kifejlesztett ELISA-eljárás nagy érzékenységeinek és magas specifitásának köszönhetően, kitűnően alkalmazható sprue diagnózisára és a betegség kezelése hatásosságának ellenőrzésére. Ez a kezelt betegek utánpótlása alapján is nyilvánvaló (a kezelés során a titer csökkenése figyelhető meg). A találmány szerinti eljárással kapott ELISA-eredmények és egy harmadik személy által végzett immunfluoreszcens értékelés (anti-endomizium IgA-ellenanyagok kimutatása) adatainak összeha-

sonlítása szerint, a két vizsgálat jó egyezést mutat. Eltérések elsősorban alacsony ellenanyagtitereknel fordultak elő, amelyek azonban az indirekt immunfluoreszcenciás módszer alkalmazásából következnek, amelyet jelenleg az első számú választandó eljárásnak tartanak. Az eltérések többek között - a szubjektív értékelésből, és a korábbi módszerrel kapcsolatosan előforduló nem-specifikus reakciókból adódnak.

Egyéb ellenanyag osztályba tartozó ellenanyagok, például IgG-ellenanyagok kimutatásán alapuló megfelelő eljárások alkalmasak IgA-deficiens sprue betegek azonosítására, valamint tTG-vel szemben irányuló immunreakcióval járó egyéb betegségek vizsgálatára.

A találmány szerinti kimutatási eljárás további előnye származik abból, ha a tesztrendszerben tisztított tengerimalac tTG-t, humán tTG-t, proteolízissel vagy géntechnológiai eljárásokkal nyert szekvenciákat vagy analógokat, vagy szintetikus úton előállított immunogén tTG-peptideket alkalmazunk. tTG-vel szemben irányuló immunreakcióval járó egyéb betegségek diagnózisára és utánkövetésére alkalmas ELISA-eljárást ismertetünk a 3.3 példában.

A találmány tárgyát képezi továbbá, a 9. igénypont szerinti, szájon át adagolható gyógyászati hatóanyag tTG-vel, tTG-tartalmú vegyületekkel, azok antigén sajátosságú struktúráival, immunreaktív szekvenciáival vagy analógjaival szemben irányuló immunreakcióval járó betegségek kezelésére. A szájon át történő adagolásra alkalmas hatóanyagokat előnyösen, tabletta vagy kapszula formájában állítjuk

elő, és azok alkalmazásával orális toleranciát váltunk ki, tTG, tTG-tartalmú vegyületek, azok antigén sajátosságú struktúrái, immunreaktív szekvenciái vagy analógjai adagolásán keresztül. Egyrészt, az autoantigén szájon át történő adagolásával orális toleranciát érünk el; másrészt, úgy nevezett „bystander” hatást váltunk ki, azaz, amennyiben a betegséget okozó autoantigén nem ismert, egyes esetekben terápiás hatású lehet a célszervben az immunrendszerrel érintkező egyéb antigén szájon át történő adagolása. Ez az antigén képes helyben az antigén-specifikus szupresszor T-sejtek stimulálására, ezáltal, a szisztémás immunválasz elnyomására. Kizárólag magasabb antigén dózisok alkalmazása esetén, az autoreaktív T-sejtek anergiája váltható ki.

Orális tolerancia kiváltása a megfelelő módszer különböző autoimmun betegségek kezelésére.

A találmány szerinti gyógyászati hatóanyagokat előnyösen, sprue kezelésére alkalmazzuk, de azok alkalmazhatók más krónikus gyulladásos bélbetegségek és autoimmun hepatitis kezelésére is.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a tTG-t, tTG-tartalmú vegyületeket, azok antigén sajátosságú struktúráit, immunreaktív szekvenciáit vagy analógjait 0,01-100 mg/testtömeg-kg dózisban adagoljuk.

A találmány szerinti gyógyászati hatóanyagok - adott esetben -, tartalmazhatnak gyógyászatilag elfogadható adjuvánsokat, például a gyógyszergyártásban szokásosan alkalmazott töltőanyagokat, síkosító anyagokat, a készítmény szétesését elősegítő anyagokat, kötőanyagokat vagy a hatóanyag

felszabadulását elősegítő anyagokat. A gyógyászati lag elfogadható adjuváns aránya a választott aktív hatóanyagtól függően széles határok közt változhat, és az általában 0,1-20 tömeg-% közt van.

Közelebbről, a találmány előnyösen, sprue diagnózisára és terápiája hatásosságának ellenőrzésére szolgáló kimutatósi eljárásra vonatkozik, amely eljárás nem-invazív, nagy fokban specifikus, és közvetlenül a betegséggel kapcsolatos vegyület kimutatására irányul. Az általunk kifejlesztett eljárás előnye, hogy az gyorsan, könnyen és költségkímélő módon kivitelezhető, valamint különböző laboratóriumokban standardizálható. A vizsgálati eljárás tehát lehetővé teszi a populáció hatékony szűrését, tTG-vel szemben irányuló ellenanyagok jelenlétére.

A vizsgálati eredmények objektív voltának köszönhetően, az eredmények mennyiségi meghatározásának lehetősége az eljárást fölébe helyezi az immunfluoreszcens értékelésnek, amely szubjektív elemeket hordoz magában. Ezen felül, az immunfluoreszcens értékelést, különösen alacsony titerek esetén, gátolja a vizsgálattal kapcsolatban megfigyelhető nem-specifikus reakciók jelentkezése. Amennyiben a tesztrendszerben a specifikus autoantigént alkalmazzuk, a főemlősök nyelőcsőmetszetein vagy köldökszínór-metszeten immunfluoreszcens eljárással megfigyelhető nem-specifikus reakciók a lehető legnagyobb mértékben kiküszöbölhetők.

Mivel a vizsgálati eljárás IgA-osztályú ellenanyagok vagy egyéb osztályba tartozó ellenanyagok esetében egyaránt alkalmazható, azzal az IgA-deficiens sprue betegek is azo-

nosíthatók. A tTG-vel szemben irányuló ellenanyagokon alapuló kimutatási eljárás ugyancsak alkalmas tTG-vel szemben irányuló immunreakcióval járó egyéb betegségek azonosítására, vizsgálatára, és terápiájuk hatásosságának ellenőrzésére.

Miután a tTG-t a sprueban szereplő autoantigénként azonosítottuk, azt alkalmazhatjuk teljes egész formájában; vagy alkalmazhatjuk annak immunreaktív epitópjait (annak proteolízissel vagy géntechnológiai eljárásokkal nyert szekvenciáit, analógjait vagy szintetikus peptidjeit) sprue szájon át történő (orális) terápiájára; vagy tTG-vel szemben irányuló immunreakcióval járó egyéb betegségek terápiájára.

A találmány szerinti megoldást az alábbiakban konkrét megvalósítási példákon keresztül kívánjuk szemléltetni, anélkül azonban, hogy igényünket az ismertetettetekre korlátoznánk.

1. példa

Az autoantigén izolálása és jellemzése

1.1. Immunfluoreszcens eljárás, APAAP-festés (APAAP: alkalikus foszfatáz anti- alkalikus foszfatáz)

A festést különböző sejtvonalakon végeztük el, amelyeket előzőleg 2 percig, -20 C-on, 100 % metanolban fixáltunk.

Az immunfluoreszcens kimutatási eljárás szerint, a készítményeket sprueban szenvedő betegből származó szérummal vagy kontroll szérummal inkubáltuk, mostuk, majd TRITC-

jelölt, nyúlban termelt anti-humán-IgA ellenanyag alkalmazásával kimutatást végeztünk [Schuppan és mtsai.: J. Biol. Chem. 265 8823 (1990)].

Az APAAP-jelölést azután végeztük, hogy a sejteket a sprue-szérumokkal inkubáltuk, ezután, azokat mostuk, végül az APAAP-komplexeiket kimutattuk [Cordell J.L. és mtsai.: J. Histochem. Cytochem. 32, 219 (1984)].

A fenti vizsgálatban, HT1080-sejtek (humán fibroszarkóma sejtek), WT38-sejtek (humán tüdő embrionális fibroblasztok), Hep-1- és HepG2-sejtek (hepatokarcinóma sejtek) esetében, betegszérum alkalmazása mellett egyértelműen pozitív citoplazmafestődés volt megfigyelhető, míg normál szérumok alkalmazása vagy humán IgA-val történő előkezelés esetén nem volt jelölődés kimutatható. Humán fityma fibroblasztok, humán rhabdomyosarkóma (RD), Ito és Morris patkány hepatóma, és kutya MDCK-sejtek alkalmazásakor csupán igen gyenge vagy negatív reakciót tapasztaltunk.

1.2. Metabolikus sejtjelölés, és az antigén immunprecipitációja

Az autoantigén jellemzését és izolálását HT1080-sejtek alkalmazásával végeztük.

A sejteket L-alanil-L-glutamint, 10 % főtális borjúsérumot („fetal calf serum”, FCS, Gibco), 100 egység/ml penicillint és 100 µg/ml streptomycint (Seromed) tartalmazó Dulbecco-féle módosított Eagle-tápfolyadékban (DMEM, Gibco) tenyésztettük, 37 °C-on, 8 % CO₂-atmoszférában. A metabolikus jelöléshez a sejteket 5 cm átmérőjű tenyésztő edényekbe vittük át, majd azután, hogy

mintegy 90 %-ban összefüggő tenyészet alakult ki, a sejteket metionin- és FCS-mentes tápfolyadékban tartottuk, majd ezt a tápfolyadékot 3 ml, ^{35}S -metionint (0,2 mCi; Expre $^{35}\text{S}^{35}\text{S}$, NEN-Dupont) tartalmazó FCS-mentes tápfolyadékkal helyettesítettük. Miután a sejteket 16-20 órán át a fenti tápfolyadékban inkubáltuk, a felülúszókat eltávolítottuk. A sejteket foszfát-pufferes fiziológiás sóoldattal (PBS; Seromed) mostuk, majd 3 ml lízispufferben lizáltattuk [50 mmól/l Tris-HCl; 150 mmól/l NaCl; 0,5 % Triton-X-100; 0,5 % IGEPAL CA-630 nem-ionos detergens (Sigma); Complete® proteázinhibitor (Boehringer) (pH=7,5)]. Ezután, CNBr-aktivált „Sephарose-4B” (Pharmacia) alkalmazásával immunoprecipitációt végeztünk, mind a tápfolyadék, mind a sejtlizátum esetében.

Az aktiválást és a „Sephарose”-hoz történő kötést a gyártó utasításai szerint végeztük. Miután a „Sephарose”-t duzzadni hagytuk, és 1 mmól/l HCl-ben, pH=2,5 mellett mostuk, a CNBr-aktivált „Sephарose”-t egy éjszakán át, 4 °C-on, nyúlban termelt, humán IgA-val szemben irányuló ellenanyaggal inkubáltuk (Dianova; 2,4 mg ellenanyag / 1 ml Sepharose), a következő összetételű pufferben: 0,1 mól/l NaHCO_3 , 0,5 mól/l NaCl, (pH=8,3). A nem-kötődött ellenanyagokat az összekapcsoló pufferrel történő mosással távolítottuk el, a szabad kötőhelyeket 1 mól/l etanolamin (pH=9,0) hozzáadásával, majd 2 órán át, szobahőmérsékleten történő inkubálással telítettük”. Ezt követően, a Sepharose”-t 3-szor mostuk (az egyes mosásokat 10-10-szeres térfogatú pufferrel végezve), az alábbi összetételű puffer-

rek váltakozva történő alkalmazásával: 0,1 mól/l nátrium-acetát; 0,5 mól/l NaCl (pH=4,0); és 0,1 mól/l Tris-HCl; 0,5 mól/l NaCl (pH=8,0), majd a „Sepharose”-t sprueban szenvedő betegek és egészséges egyének szérumaival inkubáltuk (0,5 ml szérum / 1 ml Sepharose), egy éjszakán át, 4 °C-on, összekapcsoló pufferben [50 mmól/l Tris-HCl; 150 mmól/l NaCl; 1 mmól/l CaCl₂; 1 mmól/l MgCl₂ (pH=8,0)]. A feleslegben lévő szérumellenanyagokat összekapcsoló pufferrel történő háromszori mosással távolítottuk el.

Minden alkalommal, 1 ml HT1080-tápfolyadékot vagy a metabolikusan jelölt sejtek sejtlizátumát (mintegy 5×10^4 sejt lizátumát) 50 µl „Cl4B-Sepharose”-val (Pharmacia) 30 percig, szobahőmérsékleten előinkubáltunk, hogy a nem-specifikusan kötődő proteineket eltávolítsuk. Centrifugálást (10 000xg, 5 perc, 4 °C) követően, a felülúszókat keverés mellett, 4 °C-on, 50 µl olyan „Sepharose”-val inkubáltuk, amelyhez előzőleg a betegekből vagy kontroll egyénekből származó IgA-t kötöttünk. Ezután, a „Sepharose”-pelleteket 3x1 ml mosópufferrel [10 mmól/l Tris-HCl; 1 % IGEPAL CA-630 (Sigma); 0,5 % nátrium-dezoxikolát; 0,1 % nátrium laurilszulfát; Complete® (Boehringer) (pH=8,0), majd 1 ml, 10 mmól/l Tris-HCl-pufferrel (pH=8,0) mostuk. Ezt követően, a pelleteket SDS vizsgálati pufferben szuszpendáltuk, 5 percig, redukáló vagy nem-redukáló körülmények mellett, 95 °C-on inkubáltuk; 10-12,5 % SDS-poliakrilamidgélén szétválasztottuk [Lämmli, U.K.: Nature 227, 680 (1970)]; majd a precipitálódott proteineket autoradiográfiával kimutattuk (1. ábra).

További vizsgálatok során, a tápfolyadék esetében kötődött nagy molekulatömegű proteinről kimutattuk, hogy az fibronectin, amely - más proteinek mellett - nem-specifikus módon kötődött „Sepharose”-hoz.

Egy sejt-asszociált 85 kDa protein precipitálódott azonban mind a 30 tesztelt sprue betegből származó szérumból; míg a 15 kontrollszérum - ezen belül, normál szérumok, Colitis ulcerosában vagy Sjogren-szindrómában szenvedő betegek széruma - esetében ilyen protein nem volt megfigyelhető. A fentiek alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy ez a protein a sprue kialakulása szempontjából alapvetően fontos autoantigén.

A gélek ezüst-nitráttal történő proteinfestésével [Henkeshoven J. és mtsai.: Electrophoresis 6, 103 (1985)] egy éles proteincsík volt hozzárendelhető az autoradiográfiával kimutatott 85 kDa csíkhöz.

1.3. A 85 kDa autoantigén izolálása és tisztítása

Hogy az autoantigénből nagyobb mennyiséget izolálhassunk, összesen 65 (175 cm² alapterületű) tenyésztőedényben HT1080-sejteket (mintegy 10⁹ sejtet) tenyésztettünk. Röviddel azelőtt, hogy összefüggő tenyészet alakult volna ki, a tápfolyadékot FCS-mentes tápfolyadéokra cseréltük, majd a sejteket további 16-20 órán át, CO₂-termosztátban inkubáltuk. A sejtek lizálását és az immunprecipitációt a fent leírtak szerint végeztük. A „Sepharose”-pelletet összesen 4,5 ml, 2% DL-ditiotreitol (Sigma) tartalmazó SDS-reakciópufferben inkubáltuk, 5 percig, 95 °C-on, hogy a kötődött

proteineket felszabadítsuk, majd azokat analitikus SDS-poliakrilamidgélben analizáltuk.

Az autoantigén további tisztítására, az immunprecipitátumot elúciós elektroforézissel, „Prep Cell” (Modell 491, Bio-Rad) alkalmazásával szétválasztottuk, a következők szerint eljárva: 4,5 ml proteinelegyet 6,5 cm szeparáló gélből (8 % poliakrilamid; pH=8,8) és 1,5 cm gyűjtőgélből (4 % poliakrilamid; pH=6,8) álló kerek gélre vittünk fel (külső átmérő: 3 cm), majd elektroforézissel szétválasztottunk. Az egyes proteineket az elúciós pufferben gyűjtöttük [25 mmól/l Tris-HCl; 0,1 mól/l glicin; 0,01 % SDS (pH=8,3)], 1,2 ml frakciókban (0,8 ml/perc elúciós sebesség mellett). Az eluált frakciókat SDS-PAGE-gélben analizáltuk, a kívánt proteint tartalmazó frakciókat (mintegy 15 ml) elegyítettük, és ultrafiltrációs eljárással („Amicon Centriprep-50” alkalmazásával; 1000xg mellett) mintegy 1 ml térfogatúra koncentráltuk.

1.4 Az autoantigén proteáz emésztése

Több vizsgált proteáz közül az endoproteináz-Asp-N bizonyult megfelelőnek a protein fragmentálására, mivel az nagy mértékben reprodukálható hasítási mintát eredményezett, viszonylag jól elkülöníthető fragmentumokkal. 1:100 arányú enzim:szubsztrát koncentrációt alkalmaztunk, és az emésztést 30 percig, 37 °C-on végeztük.

1.5 A proteinek transzfere PDVF-membránra

Miután a tisztított autoantigént emésztettük, a peptid fragmentumokat preparatív, 10 %-os Tricingélben szétválasztottuk [Schägger H. és mtsai.: Anal Biochem. 166, 368

(1987)] (2. ábra), és 4 °C-on, PVDF-membránra (polivinilidén-difluorid; „Immobilon™, Millipore”) vittük át, félszáraz gyorsblot eljárással, grafit-tartalmú elektródlamezek alkalmazásával („Fastblot B32/33”; Biometra). Ebből a célból, a következő rétegeket helyeztük az anódlamézra: 1.) 1. anódpufferrel [300 mmól/l Tris-HCl; 20 % metanol (pH=10,4)] átitatott szűrőpapírt; 2.) 2. anódpufferrel [30 mmól/l Tris-HCl; 20 % metanol (pH=10,4)] átitatott szűrőpapírt; 3.) a metanolban aktivált és anódpufferrel ekvilibrált PVDF-membránt; 4.) a Tricingélt; 5.) két réteg, katódpufferrel átitatott szűrőpapírt [25 mmól/l Tris-HCl; 40 mmól/l ϵ -amino-n-kapronsav; 20 % metanol (pH=9,4)]; 6.) katódlaméz. A transzfert 35 percen át, 180 mA mellett végeztük.

Ezután, a PVDF-membránt 0,1 % „Coomassie Blue Serva R-250” festéket és 50 % metanolt tartalmazó elegyben 5 percig festettük, 50 metanolt, 10 % ecetsavat tartalmazó oldatban szintelenítettük, desztillált vízzel alaposan mostuk, majd levegőn szárítottuk. Az emésztett autoantigén 10 kDa, 14 kDa, 16 kDa és 25 kDa molekulatömegű jellemző csíkjaikat óvatosan kivágtuk, és annak N-terminusát egy előzetes szekvenálással meghatároztuk.

1.6 Edman-degradáció

[Az eljárást Edman és Henschen leírása szerint végeztük: lásd Neddleman S.B.: „Protein Sequence Determination”, Springer Verlag, Berlin, 232-279. oldal (1975)].

„Applied Biosystems 4778-Sequenator” készülékkel végzett szekvenálással három aminosav-szekvenciát kaptunk, amelyeket a „Swiss Prot 31” adatbázisban szereplő szekven-

ciákkal vetettünk össze („PC/GENES” programcsomag alkalmazásával; IntelliGenetics). A fenti összehasonlítás szerint, minimális eltérésektől eltekintve, a három fragmentum szekvenciája egyértelműen megfelelt a humán szöveti transzglutamináz (tTG; EC 2.3.2.13; protein glutamin γ -glutamil transzferáz) szekvenciájának. A szekvenciákat az „egybetűs kóddal” adtuk meg; X nem azonosított aminosavat jelent:

t-Transzglutamináz: 28' REKLVVRRGQPFW;

10 kDa fragmentum: REKLVVRRGQPF(S);

t-Transzglutamináz: 581' DLYLENPEIKIRILG;

14 kDa fragmentum: DLYLENPEIXIXILG;

t-Transzglutamináz: 438' DITHTYKYPE;

16 kDa fragmentum: DITLTYQYP(V).

A 25 kDa fragmentumhoz nem volt egyértelműen tTG-szekvencia hozzárendelhető, mivel ez különböző peptidek elegyéből állt.

2. példa

A szöveti transzglutamináz (tTG) sprue-autoantigénként történő azonosítása

2.1. Tengerimalac tTG immunprecipitációja

Mivel az kereskedelembe hozzáférhető, és nagy fokú (>80 %) szekvenciahomológiát mutat humán tTG-vel, tengerimalac májból izolált tTG-t (Sigma) először gélelektorforézissel szétválasztottunk, hogy annak tisztaságát ellenőriz-

zük. Több más protein jelenléte mellett, a tTG - amely az összes protein mintegy 50 %-át tette ki -, képviselte a legerősebb csíkok egyikét.

Bár a 687 aminosavból álló humán tTG csak kis mértékben különbözik a 690 aminosavból álló tengerimalac tTG-proteintól, a két protein SDS-poliakrilamidgélen megfigyelhető migrációs sajáttsága nagy mértékben eltér. Míg az állati eredetű protein a várakozásnak megfelelően, 75-80 kDa molekulatömegnek megfelelően vándorol, a humán proteint, annak ellenére, hogy az N-glikozilezést látszólag nem tartalmaz, jelentősen kisebb migrációs sebesség jellemzi, és az - amint azt a szakirodalomban leírják [Gentile V. és mtsai.: J. Biol. Chem. 266, 478 (1991)] -, 85 kDa látszólagos molekulatömegnek megfelelően vándorol.

A sprue betegek szérumából származó humán ellenanyagok és tengerimalac tTG közti reaktivitást immunoprecipitációs eljárással teszteltük. Ebből a célból, 4 µg tTG-t (Sigma), 500 µl, 0,5 % szarvasmarha szérumalbumint tartalmazó lízis-pufferben, keverés mellett, „Sepharose-B”-hez kötött sprue-IgA-val inkubáltunk, 4 °C-on, egy éjszakán át, majd a „Sepharose”-t mostuk, redukáló körülmények mellett SDS-reakciópufferben forraltuk, és a proteineket 10 %-os poliakrilamidgélen szétválasztottuk (lásd 4.1.2). Itt, a várt csík (80 kDa molekulatömegű csík) specifikus precipitációját észleltük, a szennyeződések nélkül.

2.2 A tTG autoantigénként történő azonosítása Western-blot eljárással

Miután 2 µg tengerimalac tTG-t SDS-gélen szétválasztottunk és nitrocellulózra vittünk át, a blottot 2 % alacsony zsírtartalmú fölözött tej port és 3 % Tween-20-detergenst tartalmazó PBS-ben (pH=7,3), 4 °C-on, egy éjszaka át blokkoltuk. Ezt követően, a membránt egy órán át, a fentivel megegyező összetételű pufferben (1/200 arányban) hígított sprue szérumban inkubáltuk, háromszor mostuk, majd egy órán át, alkalikus foszfátazzal jelölt, humán IgA-val szemben irányuló (1/500 arányban hígított) nyúl ellenanyaggal inkubáltuk. A blottokat PBS-ben mostuk, majd „Nitro Blue tetrazolium” és 5-bróm-4-klór-3-indolil-foszfát szubsztrátként történő alkalmazásával előhívtuk [Blake M.S. és mtsai.: Anal. Biochem. 136, 175 (1984)].

A 75-80 kDa méretű csík egyértelmű pozitív jelet adott a sprue szérummal, ami további bizonyítéka annak, hogy a sprue betegek széruma tTG-vel szemben irányuló, IgA-osztályba tartozó ellenanyagokat tartalmaz; míg a kontroll szérumok esetében nem volt jel megfigyelhető.

2.3. A tTG endomizium-autoantigénként történő azonosítása, indirekt immunfluoreszcenciás eljárással

Főemlősből származó nyelőcső szöveti metszeteket (Euroimmun, Németország) alkalmaztunk sprue szérumokban jelen lévő, endomiziummal szemben irányuló IgA-ellenanyagok indirekt eljárással történő kimutatására, valamint azok tTG-vel történő gátolhatóságának igazolására. Miután 10 µl, PBS-ben 1/320 arányban hígított betegszérumot 0,5 µg vagy

10 µg tengerimalac tTG-vel (Sigma), valamint 10 µg BSA-val (Sigma) 1 órán át, szobahőmérsékleten előinkubáltunk, azokat a fenti nyelőcsőmetszetekkel inkubáltuk, 1 órán át, szobahőmérsékleten, magas páratartalmú légtérben. Pozitív kontrollként sprue szérumot alkalmaztunk (1/320 arányban hígítva), negatív kontrollként egészséges egyénektől származó szérumot alkalmaztunk (1/50 arányban hígítva). Miután a metszeteket 0,2 % BSA-t tartalmazó PBS-ben háromszor mostuk és levegőn szárítottuk, az autoantigéneket úgy mutattuk ki, hogy a metszeteket 1 órán át, szobahőmérsékleten, TRITC-jelölt, humán IgA-val szemben irányuló (PBS-ben 1/50 arányban hígított) nyúl ellenanyagokkal (Dianova) inkubáltuk. A feleslegben lévő ellenanyagokat úgy távolítottuk el, hogy a metszeteket 0,2 % BSA-t tartalmazó PBS-ben, PBS-ben, majd desztillált vízben mostuk.

A betegszérum alkalmazásával az ECM egyértelműen festődött az IgA-osztályú ellenanyagokkal, amely festődés növekvő koncentrációjú tTG hozzáadásával gátolható volt, de BSA-val történő előinkubálással nem. Az egészséges egyénekből származó szérum alkalmazásán alapuló kontroll esetében a nyelőcsőmetszeten festődés nem volt megfigyelhető.

3. példa

3.1 IgA-ellenanyagok kimutatásán alapuló sprue-specifikus ELISA kifejlesztése, sprue diagnózisára és utánkövetésére

Egy (1) µg tengerimalac transzglutaminázt (Sigma T-5398) 100 µl PBS-ben polisztrén mikrotitráló lemezek

(Greiner Labortechnik, 96 mélyületű lemezek) mélyületeibe pipettáztunk, és a lemezeket lassú körkörös mozgatás mellett, 2 órán át, 37 °C-on inkubáltuk. A nem-kötődött tTG-t PBS-sel történő mosással távolítottuk el (3x200 µl), a mélyületek szabad kötőhelyeit 250 µl, 1 % szarvasmarha szérumalbumint (Sigma) tartalmazó PBS-sel blokkoltuk, egy éjszakán át, 4 °C-on. Miután a mélyületeket 0,1 % Tween-20-detergenst tartalmazó PBS-sel mostuk (3x200 µl), azokhoz 0,1 % Tween-20-detergenst tartalmazó PBS-ben, csökkenő koncentrációjú szérumhígítás sort adtunk, és a lemezeket 1 órán át, szobahőmérsékleten, lassú körkörös mozgatás mellett inkubáltuk, majd Tween-20-detergenst tartalmazó PBS-sel mostuk (3x200 µl), végül 1 órán át, szobahőmérsékleten, humán IgA-val szemben irányuló, peroxidázzal konjugált nyúl ellenanyagokkal (Dianova) inkubáltuk (amelyet 100 µl, 0,1 % Tween-20-detergenst tartalmazó PBS-ben, 1/400 arányban hígítva alkalmaztunk). Miután a mélyületeket PBS-sel mostuk (3-szor), a lemezeket 30 percig, szobahőmérsékleten, sötétben, 200 µl, következő összetételű oldattal inkubáltuk: 0,1 mól/l citrát-puffer, 17,6 mmól/l H₂O₂; 5,5 mmól/l o-feniléndiamin-hidroklorid (Sigma) (pH=4,2); majd a képződött színes terméket ELISA-olvasóval (MRX, Dynatech Laboratories), 450 nm hullámhosszon kimutattuk.

Húsz (20), sprueban szenvedő betegtől származó szérumot teszteltünk gluténmentes terápia megkezdését megelőzően, és azt követően, azaz, a betegség aktív és kevésbé aktív fázisaiban. A tesztrendszer nagy mértékben szenzitívnek bizonyult, az értékek a sprue aktív fázisának megfelelően

alakultak. A diéta betartásának eredményeképp, terápia sikerét a tTG-vel szemben irányuló IgA-ellenanyagok mennyiségének csökkenése jelezte. A teszt magas fokú specifitása nyilvánvaló volt az egészséges egyénektől származó kontrollszérumok, Colitis ulcerosában, májzsugorban, különböző tumorokban, Sjogren szindrómában, stb. szenvedő betegektől származó szérumok alacsony fényelnyelési értékei (alacsony háttér szintje) alapján (3. ábra).

3.2 Egyéb osztályba tartozó ellenanyagok, például IgG-ellenanyagok kimutatásán alapuló ELISA-eljárás kifejlesztése, sprue diagnózisára és utánkövetésére

Mivel a sprue betegek mintegy 2 %-a IgA-deficiens, a szérumokat a bennük található tTG-vel szemben irányuló IgG-ellenanyagok szenzitivitására és specifitására teszteltük. Az ELISA-eljárást a 3.1. példában ismertetettek szerint végeztük, csupán azzal az eltéréssel, hogy abban a peroxidázzal konjugált, humán IgA-val szemben irányuló nyúl ellenanyagok (Dianova) helyett anti-humán-IgG-ellenanyagokat alkalmaztunk (Dianova). Szenzitivitásuk tekintetében, a sprue betegek esetében meghatározott értékek, mind a gluténmentes diéta megkezdését megelőzően, mind azt követően, megfeleltek az IgA-ellenanyagok kimutatásával kapott eredményeknek.

Néhány kontroll szérum esetében, kis mértékben megnövekedett értékeket találtunk, ami összhangban volt azokkal a korábbi megfigyelésekkel, hogy az endomiziummal szemben irányuló, IgG-osztályba tartozó ellenanyagok indirekt

immunfluoreszcens eljárással történő kimutatása alacsonyabb specifitású vizsgálat (4. ábra).

3.3. ELISA-eljárás - például IgA-ellenanyagok kimutatásán alapuló ilyen eljárás - kifejlesztése tTG-vel szemben irányuló immunreakcióval járó egyéb betegségek diagnózisára és utánkövetésére

Az ELISA-eljárást a 3.2 példában ismertettek szerint végeztük.

Krónikus gyulladással járó betegségben vagy autoimmun betegségben [például Colitis ulcerosában (C.U:), Crohn-betegségben, akut autoimmun hepatitisben] szenvedő betegek szérumai esetében kis mértékben vagy mérsékelten emelkedett értékeket tapasztaltunk.

A tTG-vel szemben irányuló autoantigének kimutatására alkalmas IgG-specifikus ELISA-eljárás alkalmazható tehát tTG-vel szemben irányuló immunreakcióval járó betegségekben szenvedő betegek esetében diagnózisra, és a terápia hatésságának ellenőrzésére.

4. példa

A szöveti transzglutamináz (tTG) eddig nem ismert funkciójának kimutatása, gliadin-keresztkötések létrehozásában

Míg a tTG által katalizált reakciókban acil-akceptorok széles spektruma vehet részt, az acil-donor szerepének betöltésére csak néhány molekula képes. Egy *in vitro* kísérletben radioaktívan jelölt putreszcin gliadinba történő, tTG által katalizált beépülését, és ezen keresztül azt

vizsgáltuk, hogy a gliadin képes-e a tTG donor-szubsztrátjaként funkcionálni. Százhatvan (160) μ l pufferben [0,1 mól/l Tris-HCl; 150 mmól/l NaCl; 5 mmól/l CaCl_2 (pH=7,5)] 1 μ g szubsztrátot (gliadint vagy kontroll proteinek, például albumint), 2 μ Ci [^3H]-putreszcint és 1 μ g tTG-t (tengerimalac eredetű proteint; Sigma) inkubáltunk 2 órán át, 37 °C-on. A reakciót 100 μ l, 50 %-os triklórecetsav („trichloracetic acid”, TCA) hozzáadásával állítottuk le, és a proteinek 4 °C-on, egy éjszakán át precipitáltuk. Centrifugálást követően, a pelleteket 10 % TCA-val mostuk, SDS tartalmú reakciópufferben szuszpendáltuk, majd - egyrészt - SDS-PAGE-gélen szétválasztottuk; másrészt, szcintillációs számlálóban a beütésszámot meghatároztuk. Míg a kontrollok esetében nem volt észlelhető putreszcin-beépülés, gliadin alkalmazása esetén egyértelműen kimutatható volt a [^3H]-putreszcin beépülése, mind a szcintillációs számlálóval meghatározott eredmények alapján, mint az SDS-PAGE alapján, bizonyítékát szolgáltatva annak, hogy a gliadin kitűnő szubsztrátja a tTG-nek.

A leírásban a következő rövidítéseket alkalmaztuk:

Ab: („Antibody”) ellenanyag;

APAAP: alkalikus foszfatáz - anti- alkalikus foszfatáz;

BSA: („bovine serum albumin”) szarvasmarha szérumalbumin;

cm: centiméter;

DMEM: Dulbecco-féle módosított Eagle-tápfolyadék;

EC: enzim osztályozási hivatkozási szám;

ELISA: („Enzyme-linked immunosorbent assay”) enzimmel jelölt reagens kötődésén alapuló immunoszorbens vizsgálati eljárás;

ECM: extracelluláris mátrix;

FCS: („fetal calf serum”) főtális borjúsérum;

h: [hour(s)] óra, órák;

H₂O₂: hidrogén-peroxid;

HLA: humán limfocita antigén;

IEL: intraepitheliális limfociták;

Ig: immunglobulin;

kDa: Kilodalton;

mól/l.: mól/liter;

mA: milliAmper;

MHC: („major histocompatibility complex”) fő hisztokompatibilitási komplex;

min.: [„minute(s)"] perc;

mmól/l: millimól/liter;

M_r: relatív molekulatömeg;

μ g: mikrogramm;
 μ l: mikroliter;
 PAGE: poliakrilamid gélelektroforézis;
 PBS: („phosphate buffer”) foszfát-puffer;
 PLA₂: foszfolipáz-A₂;
 PVDF: polivinilidén-difluorid;
 SDS: („sodium dodecyl sulfate”) nátrium- dodecilszulfát;
 TCA: („trichloroacetic acid”) triklórecetsav;
 TGF: („transforming growth factor”) transzformáló növekedési faktor ;
 Tris: Tris-(hidroximetil)-aminometán;
 tTG: („tissue transglutaminase”) szöveti transzglutamináz.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás coeliakiás betegség immunológiai azonosítására, azzal jellemezve, hogy anti-tTG-ellenanyagokat mutatunk ki valamely testfolyadékban, szöveti transzglutaminázal (tTG-vel), tTG-tartalmú vegyületekkel, azok antigén sajátosságú struktúráival, immunreaktív szekvenciáival vagy analógjaival adott immunreakció alapján.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy humán IgA- és/vagy IgG-ellenanyagokat mutatunk ki.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy humán, állati, szintetikus vagy rekombináns tTG-vel vagy tTG-tartalmú vegyülettel szemben irányuló ellenanyagokat mutatunk ki.

4. Az 1-3. igénypontok valamelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy önmagában ismert immunvizsgálati módszert alkalmazunk, előnyösen, a reagálóanyagok egyikét direkt vagy indirekt módszerrel, jól kimutatható jelölőanyaggal kapcsoljuk össze.

5. A 4. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a kimutatást szilárd fázison végezzük.

6. A 4. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a kimutatást ELISA-, RIA- vagy immunfluoreszcens eljárással végezzük.

7. tTG, tTG-tartalmú vegyület, ezek antigén sajátosságú struktúrái, immunreaktív szekvenciái vagy analógjai alkalmazása autoimmun betegségek diagnózisára vagy terápiájuk hatásosságának ellenőrzésére.

8. A 7. igénypont szerinti alkalmazások bármelyike, coeliakiás betegség diagnózisára vagy terápiája hatásosságának ellenőrzésére.

9. Szájon át adagolható gyógyászati hatóanyag, amely tTG-t, tTG-tartalmú vegyületet, ezek antigén sajátosságú struktúráit, immunreaktív szekvenciáit vagy analógjait, valamint - adott esetben - gyógyászatilag tolerálható adjuvánst tartalmaz, coeliakiás betegség kezelésére.

10. tTG, tTG-tartalmú vegyület, ezek antigén sajátosságú struktúrái, immunreaktív szekvenciái vagy analógjai alkalmazása coeliakiás betegség kezelésére alkalmas, szájon át adagolható gyógyászati hatóanyag előállítására.

A bejelentő helyett

a meghatalmazott:

DANUBIA

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.



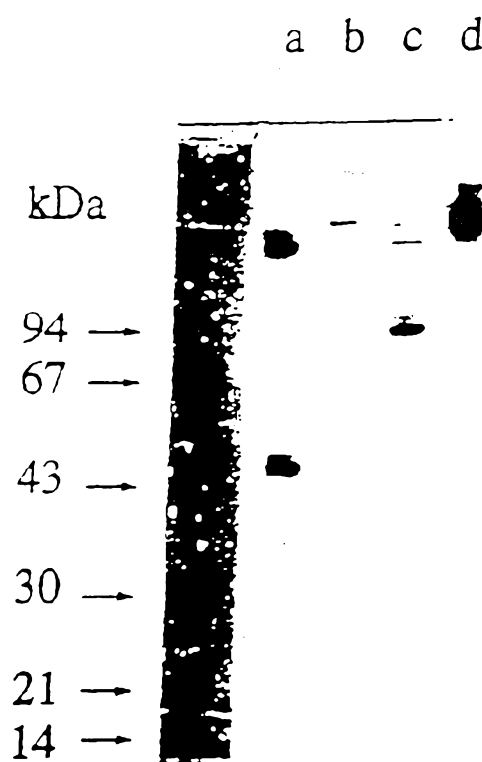
dr. Pethő Árpád

36 + 5 = 41 oldal



2002. 10. 03.

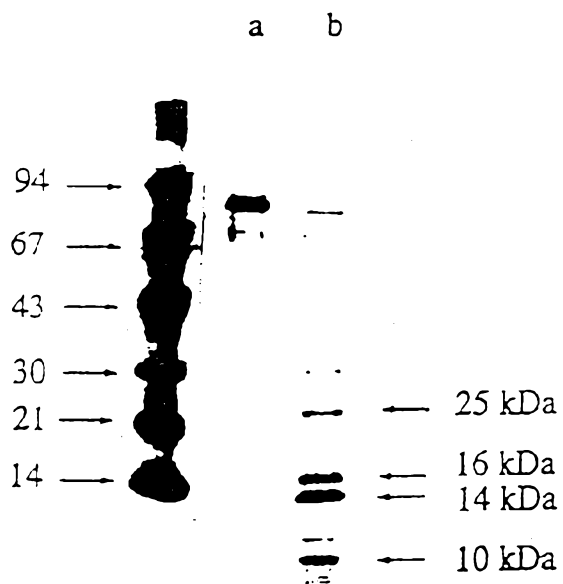
Az autoantigén kimutatása SDS-PAGE eljárással,
immunprecipitációt (IP) követően



- a: Sejtlizátum immunprecipitációja kontroll szérummal
- b: Tápfolyadék immunprecipitációja kontroll szérummal
- c: Sejtlizátum immunprecipitációja sprue-szérummal a találmány szerinti autoantigén kimutatása
- d: Tápfolyadék immunprecipitációja sprue-szérummal

1. ábra

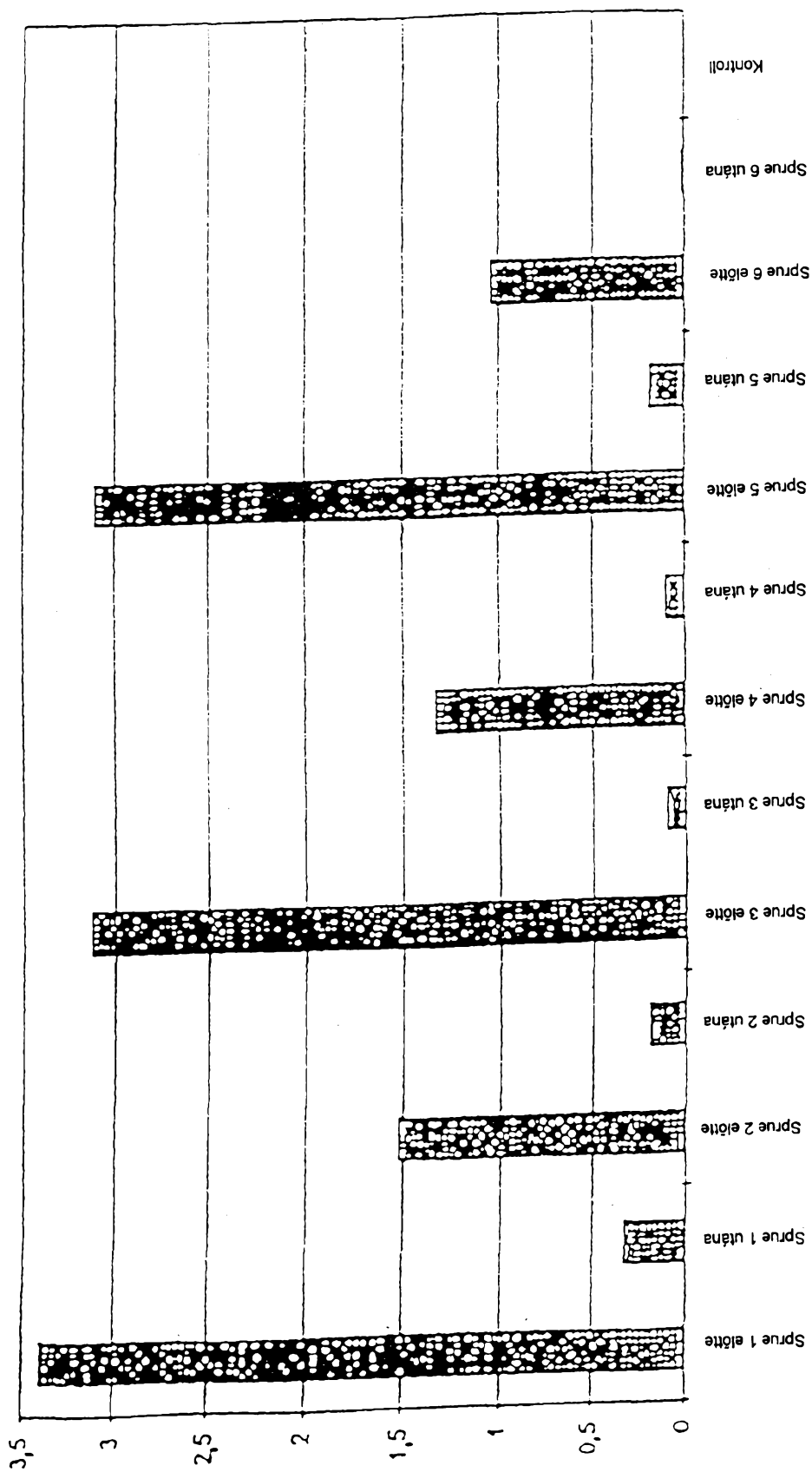
Az autoantigén proteáz-emésztése
Endoproteáz-Asp-N-enzimmel



a: A találmány szerinti autoantigén
b: Az autoantigén proteáz emésztéssel kapott fragmentumai

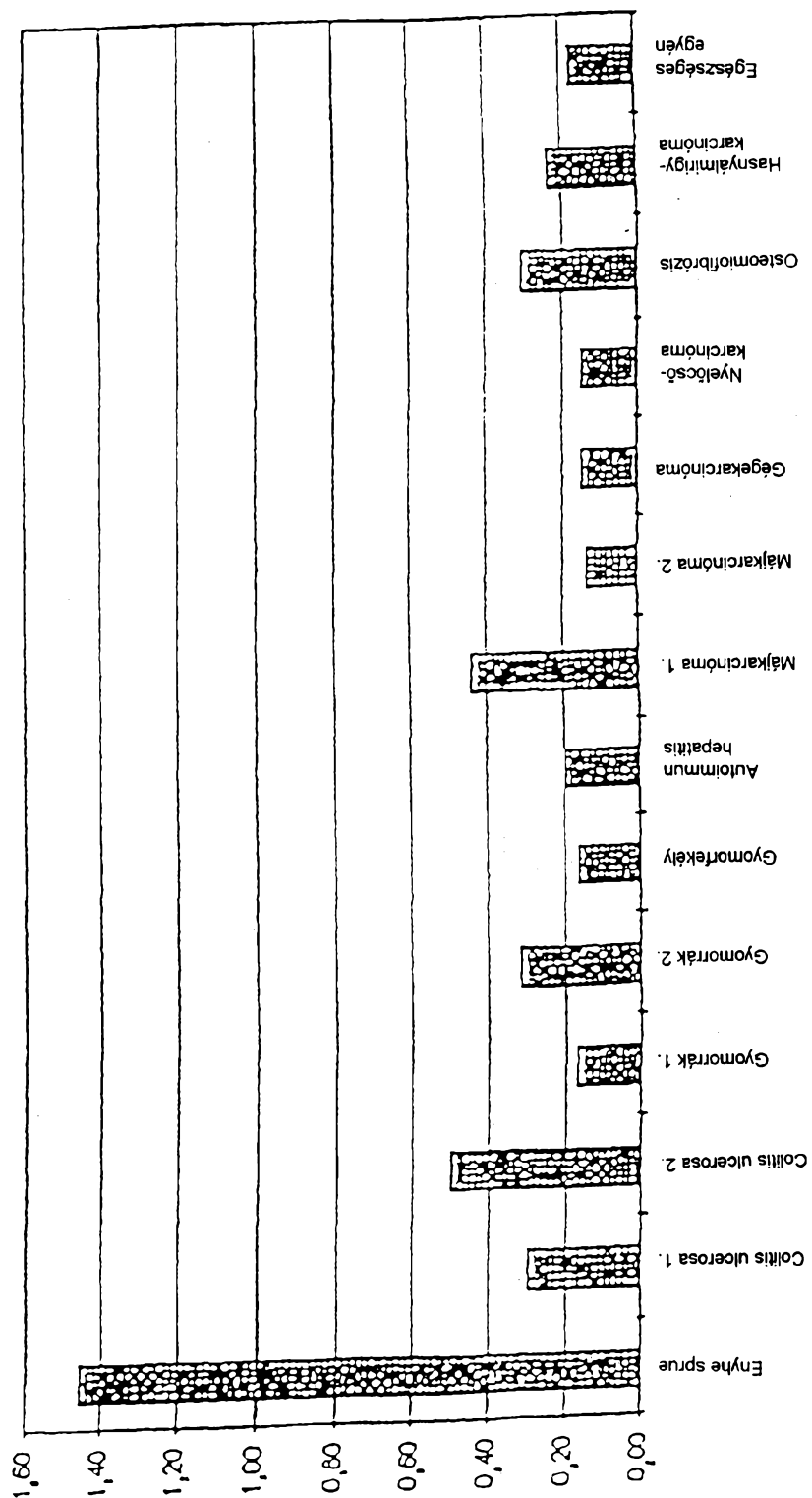
2. ábra

a) IgA-ELISA Sprue-szérum alkalmazásával, gluténmentes diéta megkezdését megelőzően, és azt követően (szérumhígítás: 1/400)



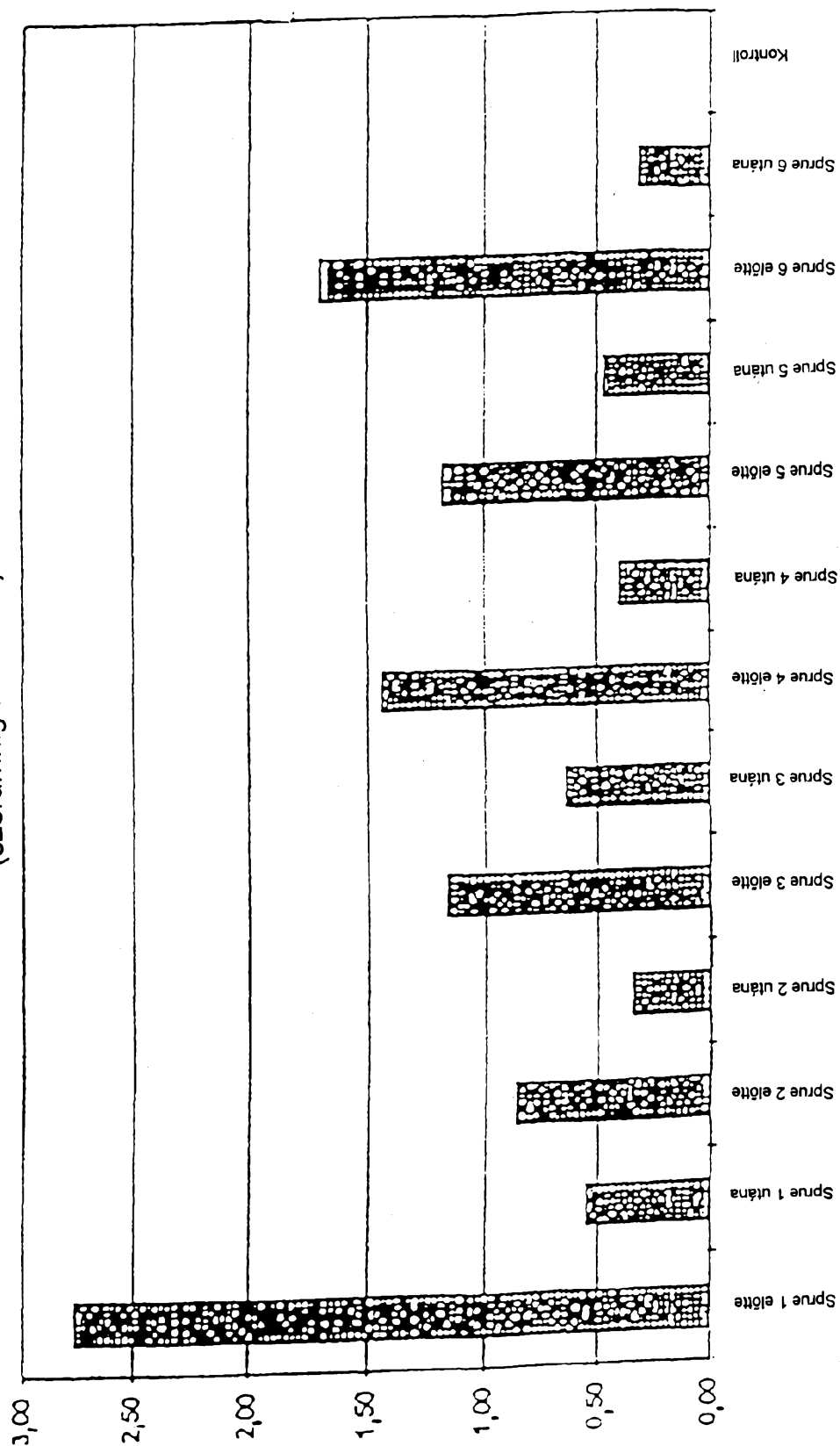
3. ábra

b) IgA-ELISA Sprue-szérum alkalmazásával
(szérumhígítás: 1/200)



3. ábra folytatása

IgG-ELISA Sprue-szérumok alkalmazásával, gluténmentes
diéta megkezdését megelőzően, és azt követően
(szérumhígítás: 1/400)



4. ábra