



HU000227947B1

(19) **HU****MAGYARORSZÁG****Szellemi Tulajdon Nemzeti Hivatala**(11) Lajstromszám: **227 947**(13) **B1**

SZABADALMI LEÍRÁS

(21) A bejelentés ügyszáma: **P 10 00128**(22) A bejelentés napja: **2000. 08. 16.**(40) A közzététel napja: **2002. 12. 28.**(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlöny és Védjegyértesítőben: **2012. 06. 28.**(51) Int. Cl.: **C12N 15/12** (2006.01)**A61K 393/95** (2006.01)**C07K 147/15** (2006.01)

(30) Elsőbbségi adatok:

P0203084	2000. 08. 16.	HU
60/149,378	1999. 08. 17.	US
60/181,684	2000. 02. 11.	US
60/183,536	2000. 02. 18.	US

(72) Feltaláló(k):

Browning, Jeffrey, Brookline, Massachusetts (US)
Ambrose, Christine, Reading, Massachusetts (US)
Tschopp, Jurg, Epalinges (CH)
Schneider, Pascal, Epalinges (CH)
Thompson, Jeffrey, Stoneham, Massachusetts (US)
Mackay, Fabienne, Vaucluse, New South Wales (AU)

(73) Jogosult(ak):

Topotarget Switzerland SA, Lausanne (CH)
Biogen Idec MA Inc., Cambridge, MA (US)

(74) Képviselő:

dr. Pethő Árpád, DANUBIA Szabadalmi és
Jogi Iroda Kft., Budapest

(54) **BAFF-receptor (BCMA) alkalmazása immunszabályzó szerként**

(57) Kivonat

A találmány tárgyát a BAFF-receptor (BAFF-R) és a receptort gátló molekulák alkalmazása képezi B-sejtek és immunglobulinok expressziójának stimulálására vagy gátlására. A találmány tárgyát közelebbről a BAFF-R-polipeptid, BAFF-R-polipeptidet tartalmazó kiméra molekulák és anti-BAFF-R ellenanyag homológok és azok fragmentumainak alkalmazása képezi B-sejtproliferáció, immunglobulin-termelés, dendritikus sejt által közvetített B-sejtproliferáció és/vagy B-sejtérés gátlására alkalmas gyógyászati készítmények előállítására.

A találmány tárgyát képezi továbbá B-sejtproliferációt gátló szer alkalmazása magas vérnyomás, veserendellenességek, és/vagy B-sejtes limfoproliferatív betegségek kezelésére alkalmas gyógyászati készítmény előállítására, valamint a BAFF-R és BAFF közti kölcsönhatás gátlására alkalmas hatóanyagok alkalmazása BAFF-R BAFF közti jelátadás részvételével zajló immunválasz kezelésére, szupresszállására vagy módosítására alkalmas gyógyászati készítmény előállítására; BAFF-R-polipeptidre specifikus ellenanyag alkalmazása gyulladás gátlására.

A találmány tárgyát képezik a fentieket tartalmazó gyógyászati készítmények is.

BAFF-receptor (BCMA) alkalmazása immunszabályozó szerként

A találmány tárgyát BAFF-receptor (BAFF-R) - a tumor nekrozis faktor („TNF”) családba tartozó, B-sejteket aktiváló faktor - és azt gátló molekulák alkalmazása képezi B-sejtek és immunglobulinok expressziójának stimulálására vagy gátlására. Közelebbről, a találmány tárgyát BAFF-R-polipeptid, BAFF-R-polipeptidet tartalmazó kiméra molekula és anti-BAFF-R ellenanyag homológ vagy azok fragmentumainak alkalmazása képezi B-sejtproliferáció, immunglobulin-termelés, dendritikus sejt által közvetített B-sejtproliferáció és/vagy B-sejtérés gátlására alkalmas gyógyászati készítmények előállítására.

A találmány tárgyát képezi továbbá B-sejtproliferációt gátló szer alkalmazása magas vérnyomás, vese-rendellenességek, és/vagy B-sejtes limfoproliferatív betegségek kezelésére alkalmas gyógyászati készítmény előállítására. Az említettek felül, a találmány tárgyát képezi BAFF-R és BAFF közti kölcsönhatás gátlására képes hatóanyag alkalmazása BAFF-R BAFF közti jelátadás részvételével zajló immunválasz kezelésére, szuppresszáására vagy módosítására alkalmas gyógyászati készítmény előállítására; BAFF-R-polipeptidre specifikus ellenanyag alkalmazása gyulladás gátlására, továbbá, a találmány tárgyát képezik a fentieket tartalmazó gyógyászati készítmények.

A receptor alkalmazható tumorelles és immunszabályozó ágensként, valamint immunszuppresszív rendellenességek, például HIV kezelésére. Ezen felül, a receptornak és azt blokkoló vegyületeknek szerepet tulajdonítanak magas vérnyomás és azzal kapcsolatos rendellenességek kialakulásában. Az említettek felül, felmerül a receptort kódoló génnel transzfektált sejtek alkalmazásának lehetősége génterápiára, B-sejteket érintő tumorok, limfómák, autoimmun betegségek vagy öröklött genetikai rendellenességek kezelésére. Ugyancsak kihasználható a receptor blokkoló ágenseinek, például a receptor rekombináns variánsainak vagy az arra specifikus ellenanyagoknak immunszabályozó hatása. Szintén a találmány tárgyát képezi BAFF-receptor alkalmazása B-sejtstimulátorként, immunszuppresszióval járó betegségekben, például szervtranszplantáción (például csontvelő-transzplantáción) átesett betegekben, valamint tumorelles kezelés után felépülő betegekben B-sejtek termelésének stimulálására. A találmány tárgyát képezi továbbá BAFF-receptor alkalmazása adjuvánsként vagy kostimulánsként, B-sejtszint növelésére és/vagy körülbelül normális szintre történő visszaállítására. Alkalmazhatók továbbá a BAFF-receptor szolubilis, B-sejtfunkciót gátló formái B-sejtek által közvetített betegségek kialakulásának gátlására.

A találmány tárgyát a TNF-családba tartozó új receptor képezi. Az általunk azonosított új receptort, BAFF-R (vagy „BCMA”) receptornak neveztük.

A TNF-családba ligandumok és azok specifikus receptorai által alkotott ligandum-receptor párok tartoznak, amelyeket TNF-családba tartozó ligandumoknak és TNF-családba tartozó receptoroknak nevezünk [Bazzoni és Beutler: (1996)]. A család az immunrendszer és feltehetően más, nem-immunológiai rendszerek szabályozásában vesz részt. A szabályozás gyakran „főkapcsoló” („master-switch”) szinten valósul meg úgy, hogy a TNF-család által közvetített jel nagyszámú, legjobban a TNF hatásaival jellemezhető eseményt indít el. A TNF általános protektív gyulladásos választ indíthat el egy organizmusban idegen behatolás ellen, amelyet sejtmigrációban szerepet játszó adhéziós molekulák megváltozott expressziója, specifikus sejtek meghatározott sejtterekbe történő vándorlását irányító kemokintermelés, és különböző effektorsejtek aktiválása kísér. Mint ilyen, a fenti reakcióutak szabályozása klinikai jelentőséggel bír.

Az ilyen különböző, TNF-családba tartozó citokinek által közvetített sejtválaszok indukálódását azok kötődése indítja el specifikus sejtreceptorokhoz. Legalább két különböző, körülbelül 55 kDa (TNRF1) és 75 kDa (TNRF2) molekulatömegű TNF-receptort azonosítottak [Hohman és mtsai.: J. Biol. Chem. 264, 14 927 (1989); valamint Brockhaus és mtsai.: PNAS 87, 3127 (1990)]. Mindkét TNRF-receptorgént nagyfokú polimorfizmus jellemzi. Mindkét TNRF a sejtfelszíni receptorok tipikus struktúráját mutatja, azaz extracelluláris, transzmembrán és intracelluláris domént tartalmaz. Az 1 és 2 típusú TNRF-receptor extracelluláris része négy ciszteindás doménből („cystein rich domain”, CDR) álló ismétlődő aminosav-szekvenciát tartalmaz. Hasonló ismétlődő CDR-mintázat figyelhető meg több más sejtfelszíni proteinben, többek között a p75 idegnövekedési faktor receptorban és a CD40 B-sejtantigénben.

A receptorok tanulmányozása óriási lehetőséget nyújt biológiai reakcióutak megismerésére, mivel azok könnyen átalakíthatók immunglobulin fúziós proteinné. Ezek a dimer formájú szolubilis receptorok szekretált vagy felszínhez kötött ligandumok által közvetített reakciók kitűnő gátlószerei. Azok a ligandumokhoz történő kötődéssel megakadályozzák, hogy az utóbbiak a jelátadásban szerepet játszó sejtasszociált receptorokkal kölcsönhatásba lépjenek. Ezek a receptor-Ig fúziós proteinek nem csak kísérleti célra alkalmazhatók; azokat, például a TNF-R-Ig-t, sikeresen alkalmazták klinikai célokra is, például gyulladásos bélbetegség, reumatoid artritisz és az OKT3 adását követően kialakuló akut klinikai tünetegyüttes kezelésére [Easton és mtsai.: (1996); Feldmann és mtsai.: (1996); van Dulleman és mtsai.: (1995)]. Belátható, hogy a TNF-receptorcsaládon keresztül végbemenő jelátadás által közvetített biológiai eseményekbe történő beavatkozás tág lehetőséget kínál immunológiai alapú betegségek kezelésére, valamint az immunrendszer részvétele miatt kialakuló patológiai következményekkel járó humán betegségek széles skálájának kezelésére. Egy nemrégiben leírt receptor, az oszteoprotegerin szolubilis formája képes megakadályozni a csontállomány csökkenését; a TNF-családba tartozó receptorokon keresztül végbemenő jelátadás által szabályozott események tehát nem feltétlenül korlátozódnak az immunrendszer szabályozására. A receptor ellen irányuló ellenanyagok képesek gátolni a ligandum kötődését, ezáltal alkalmasak lehetnek klinikai felhasználásra. Az ilyen ellenanyagok gyakran igen hosszú életűek, és alkalmazásuk előnyösebb lehet a szolubilis receptor-Ig fúziós proteinekénél, amelyek féléletideje rövidebb a vérben.

Míg a terápiában leginkább a receptor által közvetített események gátlását aknázzák ki, eredetileg a TNF-receptorok aktiválása kecsegtetett klinikai előnyökkel [Aggarwal és Natarjan: (1996)]. Mivel a TNF-receptorok aktiválása gátolhatja a sejthalált a célsejtekben, alkalmazásuk tumorok ellen régen is felmerült, és még ma is ígéretesnek tűnik [Eggermont és mtsai.: (1996)]. A receptor aktiválható a ligandum adásával, azaz a természetes úton; vagy hatásos agonistákként alkalmazhatók egyes, a receptorok közt keresztkötéseket létrehozó ellenanyagok is. Ellenanyagok alkalmazása előnyösebb az onkológiában, mivel azok hosszú ideig jelen vannak a vérben, míg a ligandumok féléletideje általában rövid a vérben. Mivel számos ilyen receptor szelektív módon expresszálódhat tumorok felszínén, vagy csak tumorokban idéz elő sejthalált vagy differenciálódást, az agonista ellenanyagok hatékony fegyvereink lehetnek a tumorok gyógyítására folytatott küzdelemben. Hasonlóképp, számos előnyös következménnyel járó immunológiai esemény megy végbe a TNF-családba tartozó receptorokon keresztül, például a gazdaszervezet gyulladásos válaszreakciói, az ellenanyag-termelés, stb.; agonista ellenanyagok alkalmazása tehát nem onkológiai célokra is előnyös lehet.

Paradox módon, bizonyos reakcióutak gátlása klinikailag előnyös lehet tumorok kezelésére. Például, a Fas-ligandumot több tumor expresszálja, ez az expresszió a Fas-pozitív limfociták pusztulásához vezethet, ezáltal elősegítheti, hogy a tumor kikertülje az immunrendszert. Ebben az esetben, a Fas-rendszer gátlása lehetővé

teheti az immunrendszer számára, hogy – miután a hozzáférés most már biztosított – más módon reagáljon a tumorra [Green és Ware: (1997)].

Az alábbiakban összefoglaljuk a találmány szerinti megoldás lényegét.

„BAFF-R”- vagy „BCMA”-polipeptidnek nevezett, a BAFF – egy, a tumor nekrozis faktor („TNF”) családba tartozó, B-sejteket aktiváló - tumor nekrozis faktorhoz kötődő polipeptidet kódoló cDNS-klónt azonosítottunk. A BAFF azonos a WO/99 12 964 számú nemzetközi közzétételi iratban ismertetett molekulával, amely leírás teljes terjedelmében a kitanítás részét képezi.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány tárgyát eljárás képezi B-sejtproliferáció, dendritikus sejtek által indukált B-sejtproliferáció és sejtérés, vagy immunglobulintermelés gátlására állapotban (emlősben), BAFF-R-polipeptid alkalmazásával. A találmány tárgyát képezi továbbá eljárás B-sejtproliferáció, dendritikus sejtek által indukált B-sejtproliferáció és sejtérés, vagy immunglobulintermelés stimulálására állapotban (emlősben), BAFF-R-polipeptid és anti-T-ellenanyag, CD40-ligandum vagy anti-CD40-ligandum alkalmazásával.

A találmány egy további előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány tárgyát eljárás képezi auto-immun betegségek, magas vérnyomás, szív-érrendszeri rendellenességek, vesebetegségek, B-sejtes limfoproliferatív rendellenességek, immunszuppresszív betegségek, szervtranszplantáció és HIV-fertőzés okozta betegség kezelésére. Szintén a találmány tárgyát képezi eljárás hatóanyagok alkalmazására, amelyek alkalmasak BAFF-R és liganduma közti kölcsönhatás által közvetített jelátadással járó immunválasz módosítására - szuppresszállására vagy megváltoztatására, valamint eljárások gyulladásos folyamatok gátlására BAFF-R-receptorra vagy annak epitópjára specifikus ellenanyag beadásával.

A találmány szerinti eljárásokban előnyösen BAFF-R-polipeptidet, BAFF-R-polipeptidet heterológ aminosav-szekvenciával fuzionáltatva tartalmazó kiméra molekulát vagy anti-BAFF-R ellenanyag homológot adunk be terápiásan hatásos mennyiségben.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány tárgyát képezi BAFF-R-polipeptidet és gyógyászatilag elfogadható kötőanyagot tartalmazó gyógyászati készítmény.

A találmány egy még további előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány tárgyát képezik BAFF-R-polipeptidet heterológ polipeptiddel vagy aminosav-szekvenciával fuzionáltatva tartalmazó kiméra molekulák. Ilyen kiméra molekulák lehetnek például BAFF-R-polipeptidet immunglobulin Fc-régiójával vagy epitópcimke szekvenciával fuzionáltatva tartalmazó molekulák.

A találmány egy további előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány tárgyát képezi BAFF-R-polipeptidhez specifikus módon kötődő ellenanyag. Adott esetben, az ellenanyag monoklonális ellenanyag.

Az alábbiakban röviden ismertetjük a leíráshoz csatolt ábrákat.

Az 1. ábrán a humán BAFF-R (BCMA) cDNS nukleinsav-szekvenciáját (2. azonosítószámú szekvencia) és az abból következtetett aminosav-szekvenciát (1. azonosítószámú szekvencia) mutatjuk be. Potenciális transzlációs startkódon található a 219. vagy 228. nukleinsavnál; ciszteindús doménok (CDR-ek) találhatók a 2. azonosítószámú szekvencia 240-341. pozíciójában; és potenciális transzmembránrégió van jelen a 2. azonosítószámú szekvencia 375-459. nukleinsav-pozíciójában.

A 2. ábrán a pJST538 – egy, BAFF-R-Fc-t kódoló plazmid – nukleinsav-szekvenciáját (4. azonosítószámú szekvencia) és következtetett aminosav-szekvenciáját (3. azonosítószámú szekvencia) mutatjuk be. Az 1-69.

nukleinsavak egér IgG-kappa szignálszekvenciáknak; a 70-222. nukleinsavak a BAFF-R-szekvenciának (1-153. nukleotidok) felelnek meg; a 223-906. nukleinsavak humán IgG-szekvenciákat képviselnek.

A 3. ábrán a pJST535-plazmid – egy, teljes hosszúságú humán BAFF-R-szekvenciát kódoló plazmid – nukleinsav-szekvenciáját és következtetett aminosav-szekvenciáját mutatjuk be.

A 4. ábrán a TNF-R55 és BAFF-R struktúráját hasonlítottuk össze.

Az 5. ábrán (a) CH269-val (1,0 µg) vagy (b) pJST535-plazmiddal (0,1 µg) - teljes hosszúságú BAFF-R-t expresszáló plazmiddal - transzfektált, 0,5 µg/ml flag-hBAFF-val festett 293-EBNA-sejtek láthatók lemezen végzett tesztformátumban.

A 6.A ábrára pJST535-plazmiddal transzfektált és a következőkben ismertetett módon festett 293EBNA-sejtek FACS-analízisének eredményeit vetítettük rá: ligandum nélkül (fekete grafikon); 1 µg/ml flag-hCD40L (rózsaszín); vagy flag-hBAFF (zöld). Ezután, valamennyi mintát anti-flag-M2-vel, majd számrban termelt anti-egér-IgG-vel festettük a 2. példában ismertetettek szerint.

A 6.B ábrán FACS-analízis görbéket mutatunk be a kísérlet statisztikai analízisének eredményeivel együtt. A festést az egyes analíziseknél a következőképp végeztük: (1) nem festett; (2) csak 7AAD; (3) csak a 2. lépés és 7AAD; (4) 9 µg/ml flag-hBAFF; (5) 3 µg/ml flag-hBAFF; (6) 1 µg/ml flag-hBAFF; (7) 0,33 µg/ml flag-hBAFF; (8) 0,11 µg/ml flag-hBAFF (9) flag-hCD40L 1 µg/ml.

A 7. ábrán BAFF-R-Fc-vel, a 4. példában ismertetettek szerint végzett immunprecipitáció eredményét szemléltetjük. A molekulatömeg-standardokat (kDa-ban) az ábra bal oldalán jelöltük. 1. sáv: 12,5 ng flag-hTWEAK; (2) 12,5 ng flag-hBAFF; (3) flag-hBAFF immunprecipitációja 0,5 ml, BAFF-R-Fc-vel kondicionált tápközeggel; (4) flag-hTWEAK immunprecipitációja 0,5 ml, BAFF-R-Fc-vel kondicionált tápközeggel; (5) immunprecipitáció ligandum nélkül, 0,5 ml, BAFF-R-Fc-vel kondicionált tápközeggel; (6) flag-hBAFF immunprecipitációja 0,5 ml, nem-transzfektált 293EBNA-sejt kondicionált tápközegével; (7) flag-hTWEAK immunprecipitációja 0,5 ml, nem-transzfektált 293EBNA-sejt kondicionált tápközegével.

A 8. ábrán lépsejt-proliferációs vizsgálat eredményeit szemléltetjük grafikusán; az ábrán az egér lépsejtekbe beépült percnkénti beütésszámot ("count per minute", CPM) ábrázoltuk a hozzáadott humán BAFF-polipeptid mennyiségével (µg/ml) szemben.

A 9. ábrán BAFF inhibíciós vizsgálat eredményeit mutatjuk be grafikusán, ahol a BAFF kötődését vizsgálatuk Raji-sejtekhez; a grafikonon az MFI-t (átlagos fluoreszcenciaintenzitást) ábrázoltuk az R:hlgG1 (ng/ml) mennyiségéhez képest.

A 10.A ábrán látható grafikonon az IgM expressziót ábrázoltuk a CD1-expresszióval szemben a 11. példában ismertetettek szerint hlg-vel (középső ábra) vagy hBCMA-Ig-vel (alsó ábra) kezelt Baff-Tg-egerek, és kontrollként, vad-típusú, PBS-injekcióban részesített alomtársaik (felső ábra) sejtjeinek FACS analízis szerint.

A 10.B ábrán bemutatott grafikonon a CD21-expressziót ábrázoltuk az IgM-expresszióval szemben az IgD-pozitív populáció kapuzásával, a 11. példában ismertetettek szerint hlg-vel (középső ábra) vagy hBCMA-Ig-vel kezelt (alsó ábra) Baff-Tg-egerek és kontrollként, vad-típusú, PBS-injekcióban részesített alomtársaik (felső ábra) sejtjeinek FACS-analízise szerint.

A 10.C ábrán bemutatott grafikonon a CD21-expressziót ábrázoltuk az IgM-expresszióval szemben az IgD-negatív populáció kapuzásával, a 11. példában ismertetettek szerint hlg-vel (középső ábra) vagy hBCMA-Ig-vel kezelt (alsó ábra) Baff-Tg-egerek és kontrollként, vad-típusú, PBS-injekcióban részesített alomtársaik (felső ábra) sejtjeinek FACS-analízise szerint.

A 11. ábrán az egyes csoportokba tartozó Baff-Tg-egerek lépsejtjeinek tömegét ábrázoltuk [tömeg (mg) +/- standard eltérés].

A 12. ábrán a proteimuria mértékét ábrázoltuk (mg/dl) az injektlások számával szemben PBS-sel, hlg-vel, hBCMA-val kezelt Baff-Tg-egerekben és kontrollként, azok alomtársaiban.

A 13. ábrán látható grafikonon az átlagos artériás nyomások átlagát ábrázoltuk (Hgmm) Baff-Tg-egerekben és vad-típusú kontrollokban.

A 14. ábrán látható grafikonon az átlagos artériás nyomást ábrázoltuk (Hgmm) az egyes Baff-Tg-egerekben és vad-típusú kontrollokban.

A 15. ábrán látható oszlopgrafikonon súlyos vesegyulladás tüneteit mutató SNF1-egerek százalékos arányát ábrázoltuk BAFF-R-IG- (BCMA-Ig) Hulg- vagy PBS-kezelést követően.

A 16. ábrán a CD11c+DC összsejtszámot ábrázoltuk (millióban) *in vivo* 20 µg BCMA-Ig-vel, 50 µg BCMA-Ig-vel, Hulg-vel vagy PBS-sel kezelt egerekben. A következő CD11c+DC-sejtpopulációkat vizsgáltuk: (1) CD8a-CD4; (2) CD8a+CD4-; és (3) CD8a-Cd4+.

Az alábbiakban részletesen ismertetjük a találmány szerinti megoldást.

A könnyebb értelmezhetőség kedvéért a következő meghatározásokat adjuk meg.

A leírás szerinti értelemben „BAFF-R” és „BCMA” rövidítéseken értjük a BAFF-R natív szekvenciáját és a BAFF-R variánsait (amelyeket az alábbiakban definiálunk).

„BAFF-R natív szekvenciáján a természetes eredetű BAFF-R szekvenciájával azonos szekvenciájú polipeptidet értünk. Ilyen natív BAFF-R izolálható természetes forrásból, vagy előállítható rekombináns vagy szintetikus úton. A találmány tárgyát képezik a BAFF-R természetben előforduló csonkított vagy szekretált formái (például extracelluláris domén szekvenciát tartalmazó szolubilis formái), természetben előforduló variánsai (például alternatív módon hasított formái) és természetben előforduló allélikus variánsai. A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a BAFF-R natív szekvenciája az 1. azonosítószámú szekvencia szerinti 1-184. aminosavakat magában foglaló érett vagy teljes hosszúságú, natív BAFF-R-polipeptidszekvencia vagy annak fragmentuma.

„BAFF-R extracelluláris doménján” vagy BAFF-R ECD” rövidítésen a BAFF-R olyan formáját értjük, amely a BAFF-R transzmembrán- és citoplazmadoménjaitól lényegében mentes. Általánosságban, a BAFF-R extracelluláris doménja kevesebb, mint 1% ilyen transzmembrán- vagy citoplazma-domént tartalmaz, és előnyösen, kevesebb, mint 0,5% ilyen domént tartalmaz. Adott esetben, a BAFF-R ECD az 1. azonosítószámú szekvencia 8-41. aminosavait, vagy 4-51. aminosavait vagy 1-53. aminosavait tartalmazza. A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a BAFF-R ECD az 1. azonosítószámú szekvencia szerinti 1-51. aminosavakat tartalmazza. A találmány egy további előnyös megvalósítási módja szerint, a BAFF-R ECD az 1. azonosítószámú szekvencia szerinti 1-50. aminosavakat tartalmazza. Szakember számára világos, hogy a találmány szerinti BAFF-R-polipeptid transzmembrándoménját az ilyen típusú hidrofób doménok meghatározására a technika állása szerint szokásosan alkalmazott ismérvek alapján azonosítottuk. A transzmembrándomén pontos határai változhatnak, de valószínűleg nem több, mint a domén egyes végein körülbelül 5 aminosavval. Ennek megfelelően, a BAFF-R ECD adott esetben tartalmazhatja a 8-41. aminosavakat (1. azonosítószámú szekvencia).

A leírás szerinti értelemben „BAFF-R-variáns” a fenti meghatározás szerinti aktív BAFF-R-polipeptidet értünk, amely a teljes hosszúságú, natív BAFF-R-polipeptidnek megfelelő 1. azonosítószámú következtetett aminosav-szekvenciával vagy egy BAFF-R ECD-szekvenciával legalább körülbelül 80%-ban azonos. Ilyen

BAFF-R-variáns például olyan BAFF-R-poliipeptid, amelyben az 1. azonosítószámú szekvencia végéhez vagy C-terminusához egy vagy több aminosavat hozzáadtunk, vagy annak végéről vagy C-terminusról egy vagy több aminosavat deletáltunk. Általánosságban, egy BAFF-R-variáns legalább körülbelül 80%-os vagy 85%-os, előnyösebben legalább körülbelül 90%-os, még előnyösebben legalább körülbelül 95%-os szekvencia-azonosságot mutat az 1. azonosítószámú szekvenciával.

A BAFF-Rs-szekvenciákkal mutatott százalékos (%) aminosavazonosságon" azon aminosavak százalékos arányát értjük egy kandidáns szekvenciában, amelyek a szekvenciák maximális százalékos szekvencia-azonosság eléréséig történő illesztését és -- szükség szerint - közbeiktatott részek meghatározását követően meg-egyeznek a BAFF-R-szekvencia megfelelő aminosavaival, nem tekintve azonosságnak az esetleges konzervatív szubsztitúciókat. Az aminosav-szekvenciák százalékos egyezésének megállapítására az illesztés különböző, szakember számára ismert módokon végezhető, például bárki számára hozzáférhető számítógépes programok, például a BLAST vagy ALIGN vagy Megalign (DNASTAR) programok alkalmazásával. Az illesztés meghatározásának megfelelő paramétereit szakember ismert módon állapíthatja meg, például bármely algoritmus alkalmazásával, amellyel maximális egyezés érhető el az összehasonlítandó szekvenciák teljes hossza mentén.

A leírás szerinti értelemben az "epitópcimkével ellátott" kifejezést kimerá polipeptidre vonatkoztatva használjuk, amely BAFF-R-szekvenciát tartalmaz vagy annak doménszekvenciáját tartalmazza "címke polipeptiddel" fuzionálva. A címke polipeptid elegendő aminosavat tartalmaz ahhoz, hogy epitópot képezzen, amellyel szemben ellenanyagok állíthatók elő, vagy az más molekulával azonosítható legyen, de elég rövid ahhoz, hogy ne gátolja a BAFF-R aktivitását. Ezen felül, a címke polipeptid előnyösen elég egyedi ahhoz, hogy az ellenanyag lényegében ne adjon keresztreakciót más epitópokkal. Címke polipeptidek tipikusan és előnyösen legalább 6 aminosavat tartalmaznak, és rendszerint körülbelül 8-50 aminosavat (előnyösen, körülbelül 10-20 aminosavat) tartalmaznak.

A leírásban szereplő különböző polipeptidek vonatkozásában akkor mondjuk, hogy egy polipeptid „izolált”, ha az azonosítva van, és valamely, természetes környezetében azzal együtt előforduló komponenstől el lett választva és/vagy abból ki lett nyerve. A természetes környezetből származó kontamináns összetevők olyan molekulák, amelyek tipikusan gátolják a polipeptid diagnosztikus vagy terápiás alkalmazását, és azok lehetnek enzimek, hormonok és más proteintermészetű vagy nem-proteintermészetű oldott molekulák. A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a polipeptid elegendő mértékben tisztítva van ahhoz, hogy (1) „*spinning cup*” szekvenátorral legalább 15 N-terminális vagy belső aminosav szekvenciája meghatározható legyen; vagy (2) nem-redukáló vagy redukáló körülmények mellett végzett SDS-PAGE-vel, Coomassie-blue vagy előnyösen ezüsfestéssel homogén legyen. Izolált polipeptiden értünk *in situ*, rekombináns sejtekben található polipeptideket is, mivel abban legalább egy, a BAFF-R természetes környezetében megtalálható komponens nincs jelen. Általánosságban azonban, izolált polipeptidet legalább egy tisztítási lépéssel nyerünk.

Az „ellenanyag” kifejezést annak legáltalánosabb értelmében használjuk, és azon közelebbről értünk BAFF-R elleni monoklonális ellenanyagokat (például agonista, antagonistá és neutralizáló ellenanyagokat), valamint BAFF-R elleni, több epitóp ellen specifikus mutató ellenanyag-készítményeket. „Monoklonális ellenanyagnak” lényegében homogén ellenanyagok populációjából nyert ellenanyagot nevezünk, azaz a populációt alkotó ellenanyagok azonosak, eltekintve esetleges, kis számban előforduló természetes mutációktól. „Tisztított készítményen” vagy „lényegében tiszta készítményen” olyan polipeptidet értünk, amely a természetben vele együtt elő-

forduló más proteinektől, lipidektől és nukleinsavaktól el lett választva. A polipeptid előnyösen más molekuláktól is el van választva, például a tisztítására alkalmazott ellenanyagoktól, gyantáktól, stb.

A leírás szerinti értelemben a „kezelni”, „kezelés” és „terápia” kifejezéseket gyógyító terápiára, profilaktikus kezelésre és preventív kezelésre vonatkoztatva használjuk.

A „peptid”, „protein” és „polipeptid” kifejezéseket a leírásban egymással felcserélhető módon használjuk.

„Biológiailag aktív kifejezésen” *in vivo* vagy *in vitro* aktivitás értünk, amely érvényesülhet közvetlenül vagy közvetett módon. A BAFF-R biológiailag aktív fragmentumain értünk a receptor aktív helyével például 70% aminosavszekvencia-homológiát, előnyösen legalább 80% homológiát, és legelőnyösebben legalább 90% homológiát mutató fragmentumokat. Azonosságon vagy homológián a receptor vonatkozásában a kandidáns szekvencia aminosav-szekvenciája és a BAFF-R 1. azonosítószámú szekvencián bemutatott szekvenciája közti azonosságot értjük százalékban kifejezve, vagy az 1. azonosítószámú aminosav-szekvencia meghatározott részével mutatott azonosságot értjük.

„Emlősön” értünk bármely az emlősök osztályába tartozó állatot, például humán organizmusokat, szarvasmarhákat, lovakat, kutyákat, egereket és macskákat. A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, az emlős humán organizmus.

A találmány gyakorlatba vétele során például, de anélkül, hogy igényünket a felsoroltakra korlátoznánk, a sejtbioológiában, sejtenyésztésben, molekuláris biológiában, transzgenikus biológiában, mikrobiológiában, rekombináns DNS-eljárásokban és immunológiában szokásosan alkalmazott technológiákat alkalmazzuk. Ilyen technológiák leírása megtalálható a szakirodalomban.

A továbbiakban részletesen ismertetjük a találmány néhány előnyös megvalósítási módját. A találmány tárgyát képezi BAFF-R és BAFF-R-vel rokon molekulák alkalmazása B-sejtek szaporodásának és érésének, valamint immunglobulinok szekréciójának befolyásolására. A találmány tárgyát képezi továbbá BAFF-R és BAFF-R-vel rokon molekulák alkalmazása az immunrendszer válaszára befolyásolására, immunológiai rendellenességek igényeinek megfelelően. Ezen felül, a találmány tárgyát képezi tumorok és immunológiai betegségek kezelése BAFF-R vagy BAFF-R-vel rokon gének alkalmazásával, génterápiás eljárásokkal.

A találmány szerinti szekvenciákkal transzformált gazdában termelődött BAFF-R és annak homológjai, valamint a technika állása szerint ismert eljárásokkal tisztított natív BAFF-R, vagy ismert aminosav-szekvenciákból előállított BAFF-R különböző eljárásokban alkalmazhatók karcinómák ellen, tumorok ellen és immun-szabályozó céllal. Azok alkalmazhatók továbbá terápiára és más rendellenességek kezelésére.

A találmány egy további szempontja szerint, a találmány tárgyat képezi eljárás BAFF-R-receptort kódoló izolált nukleinsav-szekvencia által kódolt polipeptid alkalmazására „antiszensz” terápiában. A leírás szerinti értelemben, „antiszensz” terápián a sejten uralkodó körülmények mellett a kérdéses ligandumot kódoló celluláris mRNS-sel és/vagy DNS-sel specifikus módon hibridizálódó oligonukleotid vagy azok származékai beadását vagy *in situ* termeltetését értjük, miáltal a kódolt protein expressziója gátlódik, azaz annak transzkripciója és/vagy transzlációja gátlódik. A kötődés létrejöhet szokásos bázispár-komplementaritás alapján, vagy - például DNS-duplexekhez történő kötődés esetén -- a kettős spirál mély vágatában létrejövő specifikus kölcsönhatásokon keresztül. Általánosságban, „antiszensz” terápián a technika állása szerint szokásosan alkalmazott technológiák széles skáláját értjük, például bármely, oligonukleotid-szekvenciák specifikus kötődésén alapuló eljárást.

A találmány szerinti antiszensz konstrukciók bejuttathatók például expressziós plazmidokként, amelyek a sejtben átíródva a BAFF-R-ligandumot kódoló celluláris mRNS legalább egy részével komplementer RNS keletkezését eredményezik. Más eljárás szerint, az antiszensz konstrukciók lehet *ex vivo* előállított oligonukleotid-próba. Ilyen oligonukleotid-próbák előnyösen módosított oligonukleotidok, amelyek rezisztensek endogén nukleázok hatásával szemben, ezáltal stabilak *in vivo*. Antiszensz oligonukleotidokként alkalmazható nukleinsav-molekulák például a DNS foszforamidát, foszfotioát és metilfoszfónát analógjai (lásd például az 5 176 996, 5 264 564 és 5 256 775 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásokat). Továbbá, antiszensz terápiában alkalmazható oligomerek előállításának menetét ismertetik például a következő szakirodalmi helyeken: Van Der Krol és mtsai.: *Biotechniques* 6, 957 (1988); valamint Stein és mtsai.: *Cancer Res.* 48, 2659 (1988); amelyek teljes terjedelmükben a kitanítás részét képezik.

A fent ismertetettek szerint, a BAFF-R a TNF-receptorcsaládba tartozik. A protein, annak fragmentumai vagy homológjai széleskörű terápiás és diagnosztikus célú alkalmazási területekhez adaptálhatók.

A találmány szerinti polipeptidok specifikus módon kölcsönhatásba lépnek BAFF-proteinnel, a WO/99 12 964 számú nemzetközi közzétételi iratban ismertetett molekulával, amely közzétételi irat teljes terjedelmében a kitanítás részét képezi. Az ott ismertetett peptidok és eljárások lehetővé teszik azonban a BAFF-R-receptorral vagy annak fragmentumaival specifikus módon kölcsönhatásba lépő molekulák azonosítását.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány tárgyát képezik eljárások a BAFF-R-receptorból származó, BAFF-proteinhez kötődni képes ligandumok alkalmazására. A BAFF-R fragmentumait különböző eljárásokkal állíthatjuk elő, például rekombináns úton, PCR-technológiával, proteolitikus emésztéssel vagy kémiai szintézissel. Polipeptidok belső vagy terminális fragmentumait előállíthatjuk úgy, hogy egy vagy több nukleotidot eltávolítunk a polipeptidet kódoló nukleinsav-szekvencia egyik vagy mindkét végéről. A mutagenézissel módosított DNS expresszáltatásával polipeptid-fragmentumokat kapunk.

A technika állása szerint ismert eljárásokkal ugyancsak előállíthatók a találmány szerinti megoldással összhangban alkalmazható kiméra molekulák. Szintén a találmány tárgyát képezi BAFF-R-polipeptidet (vagy annak variánsát) heterológ aminosav-szekvenciával, például immunglobulin IgG-Fc-doménjával fuzionáltatva tartalmazó kiméra molekulák alkalmazása. Az ilyen kiméra molekulák előnyösen szolubilizek, és szolubilis BAFF-R-polipeptidet tartalmaznak. A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a kiméra molekula az 1. azonosítószámú szekvencia szerinti 1-50. aminosavakat tartalmazza Fc-doménnal fuzionáltatva.

Polipeptid-fragmentumokat előállíthatunk továbbá a technika állása szerint ismert kémiai szintézis-technológiákkal, például Merrifield-féle szilárd fázisú f-moc vagy t-boc technológiával. A találmány szerinti peptidok és DNS-szekvenciák önkényesen kívánt hosszúságú, átfedésmentes fragmentumokra oszthatók, vagy kívánt hosszúságú, átfedő fragmentumokra oszthatók. Ezeket az eljárásokat az alábbiakban részletesebben is ismertetjük.

BAFF-R szolubilis formáinak előállítása

A BAFF-R szolubilis formái gyakran hatékony jelátadók, ezáltal a természetes membránforma hatásait utánzó hatóanyagként adagolhatók.

Lehetséges, hogy a találmány szerinti BAFF-R már eredetileg is szolubilis citokinként szekretálódik, ha azonban nem, a gént úgy módosíthatjuk, hogy a szekréciót kikényszerítsük. Ahhoz, hogy a BAFF-R-polipeptidet szolubilis, szekretált formában kapjuk meg, DNS-szinten eltávolítjuk a transzmembránrégió N-terminális részét és a nyél régió egy részét, majd azokat 1. típusú vezetőszekvenciával vagy 2. típusú vezetőszekvenciával

helyettesítjük, amely hatékony proteolitikus hasítást tesz lehetővé a választott expressziós rendszerben. Szakember változtathatja a megmaradó nyél régió mennyiségét a szekréciós expressziós konstrukcióban, ezáltal egyaránt optimalizálhatja a ligandumkötő tulajdonságokat és a szekréciós hatékonyságot. Előállíthatjuk például az összes lehetséges nyélhosszúságú, azaz N-terminálisan csonkított konstrukciókat úgy, hogy az 1-51. aminosavakkal kezdődő proteinekét kapjunk. A fenti analízis alapján meghatározhatjuk az optimális hosszúságú nyél-szekvenciát.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a szolúbilis BAFF-R-poliipeptid az 1. azonosítószámú szekvencia szerinti 1-51. aminosavakat tartalmazó, izolált, natív szekvenciájú poliipeptid vagy annak fragmentuma; a natív szekvenciájú BAFF-R-poliipeptiddel legalább 80%-ban (előnyösebben 90%-ban) homológ, az 1. azonosítószámú szekvencia szerinti 1-51. aminosavakat tartalmazó izolált BAFF-R-poliipeptid vagy annak fragmentuma; az 1. azonosítószámú szekvencia szerinti 1-50. aminosavakat tartalmazó, izolált, natív szekvenciájú BAFF-R-poliipeptid vagy annak fragmentuma; vagy az 1. azonosítószámú szekvencia szerinti 8-41. aminosavakat tartalmazó izolált BAFF-R-poliipeptid vagy annak fragmentuma.

BAFF-R-poliipeptiddel reagáló ellenanyagok előállítása

A találmány tárgyát képezik továbbá a találmány szerinti BAFF-R-poliipeptiddel vagy annak koreceptorraival reagáló ellenanyagok. Anti-protein/-peptid antiszérumokat vagy monoklonális ellenanyagokat ismert eljárásokkal állíthatunk elő [lásd például az alábbi kézikönyvben ismertetetteket: „Antibodies: A Laboratory Manual” szerk.: Harlow és Lane, Cold Spring Harbor Press (1988)]. Emlőst, például hörsőgöt vagy nyulat immunizálunk a peptid immunogén formájával. Proteinekét vagy peptideket immunogénné tehetünk például hordozóhoz való konjugálással vagy más, a technika állása szerint jól ismert eljárásokkal.

A BAFF-R-poliipeptid vagy annak koreceptora immunogén részét beadhatjuk adjuvánssal együtt is. Az immunizálódást a plazma vagy szérum ellenanyag-titerének meghatározásával követhetjük. Az ellenanyagok szintjét meghatározhatjuk szokásos ELISA-vizsgálattal vagy más immunológiai vizsgáló eljárással, az antigén immunogénként történő alkalmazásával.

A találmány egy további előnyös megvalósítási módja szerint, az ellenanyagok BAFF-R vagy annak koreceptora antigéndeterminánsaira specifikusak, például az 1. azonosítószámú szekvenciájú poliipeptid antigéndeterminánsaira, vagy azzal nagyfokú rokonságot mutató (például azzal 70-90%-ban homológ, előnyösebben 95%-ban homológ) humán vagy nem-humán emlős homológ poliipeptidjére specifikusak. A találmány egy még további előnyös megvalósítási módja szerint, a BAFF-R vagy BAFF-R-koreceptor elleni ellenanyagok nem mutatnak jelentős keresztreaktivitást az 1. azonosítószámú szekvenciájú poliipeptiddel kevesebb mint például 80%-ban homológ, előnyösen kevesebb mint 90%-ban homológ proteinekkel; és legelőnyösebben, az 1. azonosítószámú szekvenciájú poliipeptiddel kevesebb mint 95%-ban homológ proteinekkel (azaz specifikusan reagálnak). A „nem mutatnak jelentős keresztreaktivitást” kifejezésen azt értjük, hogy az ellenanyagok nem-homológ protein iránt mutatott kötőaffinitása az 1. azonosítószámú szekvenciájú poliipeptiddel szemben mutatott kötőaffinitás kevesebb mint 10%-a, előnyösebben kevesebb mint 5%-a, és legelőnyösebben kevesebb mint 1%-a.

A leírás szerinti értelemben ellenanyagokon értjük az ellenanyagok BAFF-R-poliipeptiddel vagy annak koreceptorraival is specifikus módon reagáló fragmentumait is. Ellenanyagokat szokásos eljárásokkal fragmentálhatunk, és a fragmentumokat a teljes ellenanyagokkal kapcsolatban a fentiekben már ismertetett eljárásokkal szűrhetjük. F(ab')₂-fragmentumokat előállíthatunk például az ellenanyagok pepszinnel történő emésztésével. Az így kapott F(ab')₂-fragmentumokat úgy kezelhetjük, hogy azokban a diszulfidhidákat redukáljuk, ezáltal Fab'-

fragmentumokat kapjunk. A leírás szerinti értelemben ellenanyagokon értünk továbbá BAFF-R és BAFF-R-koreceptor aktivitású bispecifikus és kiméra molekulákat. A BAFF-R és koreceptorai közti kölcsönhatás gátlására egyaránt alkalmazhatunk BAFF-R és BAFF-R-koreceptora elleni monoklonális és poliklonális ellenanyagokat (Ab), valamint ellenanyag-fragmentumokat, például Fab'- vagy F(ab')₂-fragmentumokat.

Ismert rekombináns DNS-technológiákkal ellenanyagok különböző formái állíthatók elő [Winter és Milstein: Nature 349, (1991); amely teljes terjedelmében a kitanítás részét képezi]. Előállíthatunk például kiméra ellenanyagokat, amelyekben az állati eredetű ellenanyag antigénkötő doménja humán konstans doménhoz van kapcsolva (lásd például Cabilly és mtsai.: 4 816 567 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás; amely teljes terjedelmében a kitanítás részét képezi). Kiméra ellenanyagok alkalmazása mérsékelheti az állati eredetű ellenanyagok humán klinikai alkalmazásával által kiváltott immunogén válasz.

Előállíthatunk továbbá BAFF-R-polipeptidet vagy annak koreceptorait felismerő „humanizált ellenanyagokat”. Humanizált ellenanyagoknak főként humán IgG-szekvenciákat tartalmazó kimérákat nevezünk, amelyekbe a specifikus antigénkötődésért felelős régiók vannak inszertálva. Állatokat immunizálunk a kívánt antigénnel, a megfelelő ellenanyagokat izoláljuk, és a variábilis régió specifikus antigénkötődésért felelős részét eltávolítjuk. Az állati eredetű antigénkötő régiókat - megfelelő pozícióban - olyan humán ellenanyagokéba klónozzuk, amelyekből az antigénkötő régiókat előzőleg deletáltuk. Humanizált ellenanyagok alkalmazásával minimalizálható a heterológ (azaz „interspecies”) szekvenciák alkalmazása humán ellenanyagokban, ezáltal, az így kapott ellenanyagok kisebb valószínűséggel váltanak ki immunválaszt a kezelt egyénben.

Különböző osztályú immunglobulinokból izolált variábilis doménokat és humán konstans doménokat (CH1, CH2, CH3) tartalmazó, kiméra vagy humanizált ellenanyagok létrehozásával előállíthatunk továbbá különböző osztályú rekombináns ellenanyagokat. Rekombináns úton előállíthatunk például növelt antigénkötő valenciájú antigénkötő helyet tartalmazó ellenanyagokat úgy, hogy az antigénkötő helyet a humán konstans régiókat hordozó vektorokba klónozzuk [lásd, Arulanadam és mtsai.: J. Exp. Med. 177, 1439 (1993); amely teljes terjedelmében a kitanítás részét képezi].

Ezen felül, ismert rekombináns DNS-technológiák alkalmazásával, az antigénkötő helyek közelében található aminosavak módosításával megváltoztathatjuk az ellenanyagok antigénjeikkel szemben mutatott kötőafinitását. Humanizált ellenanyagok antigénkötő affinitása megnövelhető molekuláris modellezésen alapuló mutagenézis technológiával [Queen és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 86, 10 029 (1989); amely teljes terjedelmében a kitanítás részét képezi].

Analógok előállítása: Módosított DNS- és peptidszekvenciák létrehozása

BAFF-R-analógok különbözhetnek a természetben előforduló BAFF-R-polipeptitől aminosav-szekvenciájukban, vagy a szekvenciát nem érintő sajátságban, vagy mindkettőben. Szekvenciát nem érintő módosítás lehetnek például a BAFF-R *in vivo* vagy *in vitro* kémiai úton történő módosítása. Szekvenciát nem érintő módosítás lehet például, de anélkül, hogy igényünk a felsoroltakra korlátoznánk, acetilezés, metilezés, foszforilezés, karboxilezés vagy glikozilezés.

Ilyen analógok előnyösen a BAFF-R 1. azonosítószámú szekvenciától egy vagy több konzervatív aminosav-szubsztitúcióban különböző biológiailag aktív fragmentumai; vagy a BAFF-ligandum aktivitását meg nem szüntető egy vagy több nem-konzervatív aminosav-szubsztitúcióban, delécióban vagy inszercióban különböző biológiailag aktív fragmentumai. Konzervatív szubsztitúció például egy aminosav helyettesítése más, hasonló tulajdonságú aminosavval, ilyenek például a következő csoportokon belüli szubsztitúciók: valin, glicin; glicin,

alanin; valin, izoleucin, leucin; aszparaginsav, glutaminsav; aszparagin, glutamin; szerin, treonin; lizin, arginin; és fenilalanin, tirozin.

Alkalmazási lehetőségek

A teljes hosszúságú BAFF-R-gén (2. azonosítószámú szekvencia) vagy annak része alkalmazható hibridizációs próbaként cDNS-génkönyvtár szűrésére, például a 2. azonosítószámú BAFF-R-szekvenciával kívánt szekvenciaazonosságot mutató egyéb gének azonosítására. BAFF-R-poli-peptidet kódoló nukleotidszekvenciák alkalmazhatók továbbá hibridizációs próbaként a BAFF-R-poli-peptidet kódoló gén térképezésére, valamint genetikai rendellenességet hordozó egyének genetikai vizsgálatára. Szűrővizsgálatok dolgozhatók ki BAFF-R biológiai aktivitását utánzó fő hatóanyagok azonosítására. Ilyen szűrővizsgálatok többek között lehetővé teszik kémiai könyvtárak nagy teljesítményű szűrését, különösen alkalmassá téve azokat kis molekulájú gyógyszerjelöltek azonosítására. Ilyen kis molekulák lehetnek szintetikus, szerves vagy szervetlen vegyületek. Ezen felül, BAFF-R-poli-peptidet vagy annak módosított formáit kódoló nukleinsavak alkalmazhatók transzgenikus állatokban vagy „knock out” (génkiütött) állatokban, amelyek viszont felhasználhatók terápiásan alkalmazható hatóanyagok kifejlesztésére és szűrésére.

A már ismertetettek szerint, a találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint a találmány tárgyát képezik eljárások B-sejtproliferáció stimulálására, dendritikus sejtek által indukált B-sejtproliferáció és B-sejtérés stimulálására, valamint immunglobulintermelés stimulálására valamely állatban, BAFF-R-poli-peptid alkalmazásával; vagy B-sejtproliferáció kostimulálására, dendritikus sejtek által indukált B-sejtproliferáció és B-sejtérés kostimulálására, valamint immunglobulintermelés kostimulálására valamely állatban, BAFF-R-poli-peptid és anti-T-ellenanyag, CD40-ligandum vagy anti-CD40-ligandum alkalmazásával. Szintén a találmány tárgyát képezik eljárások B-sejtproliferáció gátlására, dendritikus sejtek által indukált B-sejtproliferáció és B-sejtérés gátlására, valamint az immunglobulintermelés gátlására valamely állatban, BAFF-R-poli-peptid alkalmazásával.

A találmány egy további előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány tárgyát képezik eljárások BAFF-R alkalmazására autoimmun betegségek, magas vérnyomás, szív-érrendszeri rendellenességek, vesebetegségek, B-sejtes limfoproliferatív rendellenességek, immunszuppresszív betegségek, szervtranszplantáció, gyulladások és HIV-fertőzés okozta betegség kezelésében. Ugyancsak a találmány tárgyát képezik eljárások hatóanyagok alkalmazására, BAFF-R és liganduma közti kölcsönhatás által közvetített jelátadással járó immunválasz módosítására, szuppresszáására vagy megváltoztatására.

A találmány egy további előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány tárgyát képezik BAFF-R-poli-peptidet és gyógyászatilag elfogadható kötőanyagot tartalmazó gyógyászati készítmények. BAFF-R-poli-peptiddel együtt alkalmazható hordozóanyagoknak és azok formulázásának ismertetését megtaláljuk például az alábbi szakirodalmi helyen. "Remington's Pharmaceutical Sciences", 16. kiadás, Mack Publishing Co., szerk.: Oslo és mtsai. (1980). Tipikusan, megfelelő mennyiségű gyógyászatilag elfogadható só-t alkalmazunk a készítményben, hogy annak izotóniás voltát biztosítsuk. Hordozóanyagokként alkalmazhatunk például puffereket, például fizio-lógiás sóoldatot, Ringer-oldatot, dextróoldatot. Az oldat pH-értéke előnyösen körülbelül 5-8, előnyösebben körülbelül 7,4-7,8. Az említetteken felül, hordozóanyagokként alkalmazhatunk a hatóanyag elhúzódo felszabadulását biztosító készítményeket, például szilárd hidrofób polimerekből felépülő szemipermeabilis beágyazóanyagokat, amelyek lehetnek formázott gyártmányok, például liposzómák, filmek vagy mikrorészecskék. Szakember számára nyilvánvaló, hogy egyes hordozóanyagok – például a beadás módjától és a beadandó BAFF-R-poli-peptid koncentrációjától függően - előnyösebbek lehetnek másoknál.

A beadás történhet injekcióval (például intravénás, intraperitoneális, szubkután, intramuszkuláris injekcióval), vagy más úton, például infundációval, amely biztosítja a hatóanyag hatásos formában történő bejuttatását a véráramba.

A találmány gyakorlatba vétele során - hacsak kifejezetten másképp nem kötjük ki - a technika állása szerint ismert sejtbioológiai, sejtenyésztési, molekuláris biológiai, mikrobiológiai technológiákat, rekombináns DNS-technológiákat, proteinkémiai és immunológiai technológiákat alkalmazunk. Ilyen technológiák leírása megtalálható a szakirodalomban. Lásd például: „Molecular Cloning, A Laboratory Manual”, 2. kiadás, szerk.: Sambrook, Fritsch és Maniatis., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1989); „DNA Cloning”, I. és II. kötet, szerk.: Glover D.N. (1985); „Oligonucleotide Synthesis”, szerk.: Gait M.J. (1984); Mullis és mtsai.: 4 683 195 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás; „Nucleic Acid Hybridization”, szerk.: Hames B.D. és Higgins S.J. (1984); Hames B.D. és Higgins S.J.: Transcription and Translation (1984); „Culture of Animal Cells”, szerk.: Freshney R.I., Alan R. Liss, Inc. (1987); „Immobilized Cells and Enzymes” IRL Press (1986); „A Practical Guide to Molecular Cloning”, szerk.: Perbal B. (1984); „Methods in Enzymology” 154. és 155. kötet, szerk.: Wu és mtsai., Academic Press, New York; „Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells”, szerk.: Miller J.H. és Calos M.P., Cold Spring Harbor Laboratory (1987); „Immunocytochemical Methods in Cell and Molecular Biology”, szerk. Mayer és Walker, Academic Press, London (1987); „Handbook of Experimental Immunology”, I-IV. kötet, szerk.: Weir D.M. és Blackwell C.C. (1986); „Manipulating the Mouse Embryo”, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1986).

A találmány szerinti megoldást a továbbiakban a pontosabb értelmezhetőség céljából konkrét megvalósítási példákon keresztül kívánjuk szemléltetni, anélkül azonban, hogy igényünket az ismertetettre korlátoznánk.

1. példa

BAFF kötődésének kimutatása BAFF-R-polipeptidhez, lemez vizsgáló eljárással

Az alábbiakban BAFF BAFF-R-transzfektált sejtekhez történő kötődésének vizsgálatát ismertetjük lemez vizsgáló eljárással.

Teljes hosszúságú humán BAFF-R-szekvenciát BJAB poliA+RNS alapján, a SuperscriptII preamplifikációs készlet (Life Technologies) alkalmazásával állítottunk elő, a kapott cDNS-templátot a BAFF-R 5'- és 3'-végi kódoló szekvenciájával komplementer, PfuI-belyet tartalmazó láncindítók alkalmazásával amplifikáltuk. A PCR-terméket CH269-vektorba, a pCEP4 (InVitrogen) egy származékába klónoztuk. A kapott klónt pJST535-klónnak neveztük. EBNA-1-gént humán embrionális vesesejteket (293EBNA) oltottunk fibronektinnel, bevont 6 lyukú lemezekre, és a sejteket a pJST525 különböző hígításainak alkalmazásával lipofektaminnal (Life Technologies), vagy háttérkontrollként, CH269-vektorral transzfektáltuk. A transzfektációt követően 48 órával a transzfektált sejteket szolubilizáló flag-hBAFF (L83-L285. aminosavak) kötése teszteltük az alábbiak szerint, valamennyi inkubálás szobahőmérsékleten történt. Kondicionált tápközeget szívtunk le a mélyedésekből, a sejteket BHA-pufferrel (20 mmol/l HEPES pH=7,0; 0,5 mg/ml BSA; 0,1% NaN₃) mostuk, majd 0,5 µg/ml, alábbiakat tartalmazó PBS-pufferben hígított FLAG-hBAFF-proteinnel inkubáltuk: 1 mmol/l MgCl₂, 1 mmol/l CaCl₂ és 0,1% NaN₃. Egy órás inkubáció elteltével, a BAFF—proteint tartalmazó oldatot eltávolítottuk, és a sejteket BHA-val ismételtelen mostuk. Ezután, a sejteket 30 percig, 1 µg/ml M2 jelzésű anti-FLAG monoklonális ellenanyagot (Sigma) tartalmazó PBS-pufferben inkubáltuk. Ezt az oldatot is eltávolítottuk, és a sejteket BHA-

pufferrel mostuk. Ezt követően, a sejteket 30 percig, alkalikus foszfátazzal konjugált, kecskében termelt anti-egér IgG-F(ab')₂ (Jackson Immuno Research) 1:3000 hígítású oldatával inkubáltuk. Ezt az oldatot leszívtuk, és a sejteket BHA-val mostuk. Az endogén alkalikus foszfátáz jelenlétének betudható háttérfestődés csökkentésére a sejteket 15 percig 2,5 mmol/l koncentrációjú, az alábbi összetételű pufferben oldott levamisolban (Vector Laboratories) inkubáltuk: 100 mmol/l NaCl, 100 mmol/l Tris-Cl (pH=9,5), 5 mmol/l MgCl₂. Az alkalikus foszfátáz kromogén kimutatására az inhibitor oldatot eltávolítottuk, és a sejteket "fast red" és naftol-foszfát (Pierce) oldatával inkubáltuk. A festődét alacsony nagyítás mellett, mikroszkóppal megfigyeltük és lefényképeztük.

A "fast red" festék lerakódása valamennyi BAFF-R-expresszáló plazmiddal, azaz pJST535-plazmiddal transzfektált mélyedésben megfigyelhető volt. Nem volt festődés észlelhető a kontroll vektorral, azaz CH269-vektorral transzfektált sejtekben. Akkor sem volt festődés kimutatható a transzfektált sejtekben, ha a FLAG-hBAFF-proteint kihagytuk a festési eljárásból, vagy ha a flag-hBAFF-proteint más, ugyancsak TNF-családba tartozó ligandummal, például FLAG-címkevel ellátott LIGHT-proteinnel helyettesítettük.

2. példa

BAFF kötődés vizsgálata BAFF-R-transzfektált sejtekhez FACS-analízissel

Ebben a példában BAFF kötődésének vizsgálatát ismertetjük BAFF-R-transzfektált sejtekhez, FACS-analízissel.

A teljes hosszúságú BAFF-R-proteint kódoló plazmidot, a pJST535-plazmidot, 293EBNA-sejtekbe transzfektáltuk FuGene6 (Boehringer Mannheim) alkalmazásával. A transzfekciót követően 24-48 órával a sejteket PBS-ben oldott 5 mmol/l EDTA alkalmazásával eltávolítottuk a lemezről, és megszámoltuk. A sejteket FACS-pufferrel [10% főtális borjuszérumot, 0,1% NaN₃-t és 10 µg/ml hIgG-t (Jackson Research) tartalmazó PBS-sel] kétszer mostuk, majd 1 órán át, 2,5x10⁵ sejtet inkubáltunk jégén, FACS-pufferben, 9-0,037 µg/ml koncentrációban oldott FLAG-hBAFF-proteinnel. A sejteket FACS-pufferrel mostuk, és 30 percig, 5 µg/ml M2 jelzésű anti-FLAG monoklonális ellenanyaggal inkubáltuk jégén. A sejteket FACS-pufferrel mostuk, és 30 percig, jégén, a következő összetételű oldatban inkubáltuk: R-phycoerythrinrel konjugált, számarban termelt anti-egér IgG-F(ab')₂ 1:100 arányban hígítva; 10 µg/ml 7-AAD. Miután a sejteket FACS-pufferrel mostuk, 1% paraformaldehidet tartalmazó FACS-pufferben szuszpendáltuk. FACS-analízist végeztünk, amelynél a 7-AAD-pozitív (halott) sejteket kapuzással kiszűrtük.

A FACS-analízis eredménye szerint, a BAFF-R-transzfektált sejtek egy része képes BAFF-proteinhez kötődni. Kilenc (9) µg/ml BAFF-koncentráció mellett a sejtek mintegy 28%-a köt BAFF-proteint, 366 átlagos fluoreszcenciaintenzitással („mean fluorescence intensity”, MFI). Nem volt jelentős eltolódás megfigyelhető a sejtek fluoreszcenciájában akkor, amikor a számarban termelt, PE-jelölt anti-egér reagenst egymagában alkalmaztuk. Ekkor, csak a sejtek 1,3%-ánál mértünk 23,5-ös értékű MFI-értéket, és az összes sejt átlaga 5,5 volt. A BAFF-R-transzfektált sejtek által kibocsátott jel csökkenő koncentrációjú BAFF alkalmazásával kitérítődött. Száz (100) ng/ml BAFF alkalmazásakor, a sejtek 8,7%-ánál kaptunk 78,9-es MFI-értéket.

3. példa

BAFF/BAFF-R kölcsönhatás FACS-analízise GFP-marker alkalmazása mellett

Az alábbi példában BAFF kötődésének vizsgálatát ismertetjük BAFF-R-proteint kódoló plazmiddal és GFP-riporterplazmiddal kotranszfektált sejtekhez.

A 293EBNA-sejteket pJST535-plazmíddal és GFP-riporterplazmíddal transzfektáltuk a 2. példában ismertetettek szerint. A riporterplazmid membránhoz lehorgonyozott GFP-molekulát kódol. A két plazmid ko-transzfekciójával megvizsgáltuk, hogy a transzfektált sejtek milyen százalékban képesek BAFF-proteint kötni. A sejteket eltávolítottuk a lemezről, és azokat a 2. példában ismertetettek szerint BAFF-kötődési vizsgálatnak vetettük alá, majd kimutattuk a kötődést. Ebben az esetben is 7-ADD-t alkalmaztunk az elpusztult sejtek analízisből történő kizárására. A mintákat FACS-analízisnek vetettük alá, és eredményeinket grafikonon ábrázoltuk. A jobb felső negyed képviseli a BAFF-kötő (phycoerythrin pozitív) és GFP-expresszáló sejteket.

Bár úgy tűnik, nem mindegyik GFP-expresszáló sejt köt BAFF-proteint, a sejtek szignifikáns része képviselteti magát a jobb felső negyedben a kontrollhoz képest. A transzfektált sejtek három-negyed része jelent meg a jobb felső negyedben, a kontroll esetében tapasztalt 8 százalékhoz képest. Lehetséges, hogy bizonyos szintű BAFF-R-expresszió szükséges a sejtek BAFF-kötő képességének kifejeződéséhez. Lehetséges az is, hogy nagy affinitású kölcsönhatás létrejöttéhez koreceptorra van szükség, és ez a receptor a korlátozó tényező a 293EBNA-sejteken.

4. példa

Flag-hBAFF immunprecipitációja BAFF-R-Fc fúziós proteinnel

Ebben a példában a flag-hBAFF és BAFF-R-Fc – a BAFF-R ciszteinben gazdag doménját (CRD) humán IgG1 Fc-doménjával fuzionáltatva tartalmazó molekula - közti specifikus kölcsönhatás létrejöttét szemlélítjük.

A BAFF CRD-doménját RT-PCR-eljárással állítottuk elő az 1. példában ismertetettek szerint, BJAB poliA+RNS alapján, 3' lánccindító 3' lánccindítóként a hBAFF-R kódoló szekvencia 132-152. nukleotidjaival komplementer oligonukleotid alkalmazásával. A kapott PCR-fragmentumot CH269-plazmidba klónoztuk az egér IgG kappa szignálszekvenciájától 3'-, a hu IgG Fc-egységétől 5'-irányba. Ezt a konstrukciót pJST538-plazmidnak neveztük. A pJST538 vagy CH269-konstrukciókkal, lipofektamin eljárással 293EBNA-sejteket transzfektáltunk. A transzfekciót követően 20 órával kondicionált tápközeget és sejtextraktumot gyűjtöttünk. A sejteket 20 mmol/l Tris (pH=7,5), 50 mmol/l NaCl, 0,5% NP40 és 0,5% dezoxikolsav összetételű puffer alkalmazásával lízáltuk, és a törmelékot centrifugálással eltávolítottuk. A kondicionált tápközeg és a sejtextraktum egy részét azonos térfogatú 2xSDS redukáló pufferrel elegyítettük, forraltuk, SDS-PAGE-eljárással szétválasztottuk, és a komponenseket Western-blot eljárással membránra vittük át. Az expresszió igazolására, a membránt 30 percig, szobahőmérsékleten, tormaperoxidázal (HRP) konjugált, egéreredetű anti-humán IgG 1:3000 hígítású oldatával érintkeztettük 5% zsírtalanított tejport tartalmazó TBST-pufferben, majd TBST-pufferrel mostuk. A blotokat ECL-vel hívtuk elő (Amersham), és filmre exponáltuk.

Az immunprecipitációt oly módon végeztük, hogy 1 órán át, 4°C-on, 25 ng flag-hBAFF- vagy flag-hTWEAK-proteint inkubáltunk rázatás mellett 0,5 ml térfogatú, pJST538- vagy CH269-plazmíddal transzfektált 293EBNA-sejtekből nyert kondicionált tápközzel, majd ehhez 30 µl ProteinA-Sepharose (Pharmacia) gyöngyöket adtunk, és a rázatást egy éjszakán át folytattuk. A ProteinA-Sepharose gyöngyöket PBS-pufferrel kétszer mostuk, 2XSDS redukáló pufferben szuszpendáltuk. SDS-PAGE-elektroforézist és Western-blottot követően, a blotokat 1 órán át, szobahőmérsékleten, 5 µg/ml, M2 anti-flag monoklonális ellenanyaggal inkubáltuk 5% zsírtalanított tejport tartalmazó TBST-pufferben. Ezután a blotokat TBST-pufferrel mostuk, és 30 percig, szobahőmérsékleten, kecskében termelt, HRP-konjugált anti-egér-IgG (Jackson ImmunoResearch) 1:3000 hígítású ol-

datával inkubáltuk 5% zsírtalanított tejport tartalmazó TBST-pufferben. A blottokat ECL-vel hívtuk elő (Amersham), és filmre exponáltuk.

Az egerben termelt anti-humán IgG (Jackson ImmunoResearch) alkalmazásával végzett Western-blot analízis szerint, a 293EBNA-sejtek pJST538-plazmíddal történő transzfektálása egy körülbelül 43 kDa protein expresszálsát eredményezte mind a sejtextraktumban, mind a kondicionált tápközegben, ami arra utal, hogy a BAFF-R-Fc fúziós protein hatékonyan expresszáldott és szekretáldott.

Az immunoprecipitátumokban, csak BAFF-R-Fc és flag-hBAFF együtt inkubálását követően volt csak megfigyelhető. Ez a csak együtt vándorolt a géltre közvetlenül felvitt flag-hBAFF-mintával. A többi sávokon nem volt jel megfigyelhető, ami azt jelenti, hogy a BAFF-R-Fc és flag-hBAFF közti kölcsönhatás specifikus.

5. példa

Szolubilis receptorformák előállítása

Humán organizmusban alkalmazható receptorinhibitor létrehozásához humán receptor extracelluláris doménját kódoló cDNS-szekvenciára lenne szükségünk. Amennyiben az egéredeti forma szekvenciája ismert, humán cDNS-génkönyvtárát szűrhetünk az egéredeti cDNS-szekvencia alkalmazásával; ilyen eljárásokat szokásosan alkalmaznak a gyakorlatban. Humán cDNS-szekvencia ismeretében, láncindító oligonukleotidokat tervezhetünk a receptor extracelluláris doménjának PCR-amplifikálására a transzmembrán és intracelluláris domén nélkül. Tipikusan, az utolsó, diszulfidhíddal összekötött „TNF-domén” és a transzmembrándomén közti aminosav-szekvencia túlnyomó részét alkalmazzuk. A „nyélrégio” hossza a szolubilis receptor hatékonyságának optimalizálása érdekében változtatható. Az így kapott, amplifikált darabot úgy módosíthatjuk, hogy megfelelő restriktációs helyeket tartalmazzon különböző C-terminális Ig fúziós kíméra vektorokba történő klónozáshoz. Eljárhatunk úgy is, hogy stopszignált inszertálunk a 3'-végre, és az Ig fúziós kíméra megközelítési mód alkalmazása nélkül állítjuk elő a receptor szolubilis formáját. A kapott vektor a biotechnológiában alkalmazott legtöbb rendszerbe inszertálhatjuk, például élesztőbe, rovarsejtekbe, baktériumokba és emlős sejtekbe; valamennyi expressziós típusra találunk példákat a szakirodalomban.

A konstrukciókhoz különböző humán Fc-doménokat kapcsolhatunk az FcR és komplement közti kölcsönhatások optimalizálására vagy kiküszöbölésére. Más eljárás szerint, az FcR-doménok mutációval módosított formáit alkalmazhatjuk az FcR vagy komplement kölcsönhatások szelektív kiküszöbölésére, vagy az N-kötés cukrok Fc-doménhoz történő kapcsolódásának megszüntetésére, amely eljárások bizonyos előnyökkel járhatnak.

6. példa

Agonista vagy antagonist ellenanyagok előállítása

A fent ismertetett szolubilis receptorformákkal egeret immunizálhatunk, és szokásos eljárásokkal monoklonális ellenanyagokat állíthatunk elő. Az ELISA-eljárással azonosított mAb-kat szolubilis ellenanyagokként vagy műanyagon immobilizált ellenanyagokként tovább szűrhetjük agonista aktivitásra, különböző *in vitro* sejtes vizsgáló eljárásokkal. A HT29-sejtvonal pusztulásának kimutatása általában megfelelő rendszer, amely számos, TNF-receptoron keresztül érvényesülő jelátadás érzékeny indikátora. Ha ez a sejtvonal nem hordozza a kérdéses receptort, a teljes hosszúságú receptor stabilan transzfektálható a HT29-sejtvonalba, lehetővé téve a citotoxicitási vizsgáló eljárás alkalmazását. Más eljárás szerint, ilyen sejtek alkalmazhatók a Cytosensor

készülékben, amellyel meghatározható, hogy a receptor aktiválása kivált-e jelátadás megtörténte utaló pH-változást. A TNF-családba tartozó receptorokon keresztüli jelátadás jól működik ilyen formátumban, és az eljárásához nem szükséges a receptor által kiváltott biológiai események pontos ismerete. Az agonista mAb-k klinikai alkalmazás céljára „humanizálhatók”. Ez az eljárás antagonistá mAb-k azonosítására is alkalmazható. Ilyen mAb-k az agonista aktivitás hiánya és receptor-ligandum kölcsönhatást gátló képességük alapján azonosíthatók ELISA-eljárással, szokásos kötődési vizsgálattal vagy BIAcore-eljárással. Végül, szűrővizsgálat alapját képezheti kemokinszekreció agonista ellenanyaggal történő kiváltása különböző sejtekben.

7. példa

Szűrés a receptor-ligandum kölcsönhatás gátlására

A receptor-Ig fúziós protein alkalmazásával kombinatorikus könyvtárak szűrhetők a receptorhoz közvetlenül kötődni képes molekulák azonosítására. Ezek a molekulák ELISA típusú vizsgálattal, a receptor-Ig fúziós protein és a ligandum szolubilis formájának alkalmazásával tesztelhetők a receptor-ligandum kölcsönhatást gátló képességre. Az ELISA-eljárással különböző természetes termék könyvtárak, stb. közvetlenül szűrhetők gátló hatású vegyületek azonosítására. A receptor sejtvonalba, például a HT29-vonalba transzfektálhatók, miáltal szűrővizsgálat alapját képező biológiai vizsgáló eljárást (ebben az esetben citotoxicitási vizsgáló eljárást) fejleszthetünk ki.

8. példa

A BAFF-R-IgG B-sejtek számának csökkenését eredményezi normális egerekben

Nyolc hetes nőstény BALB/c-egereket szereztünk be a „The Jackson Laboratory” (Bar Harbor, ME) intézetéből. Az egerek (csoportonként 3) intraperitoneálisan (i.p.) PBS-t, 400 µg humán BAFF-R-huIgG1 (hBAFF-R-Ig) fúziós proteint (Teresa Cachero, Biogen) vagy 400 µg tisztított humán IgG-t (HuIgG) (Sandoz, Basel, Svájc) kaptak a -8., -5., -1. és +2. napokon. Az egerek 100 µl 10%-os birka vörösvérsejtet (SRBC) kaptak a 0. napon. (Colorado Serum Company, Denver, CO).

Az állatok elpusztításakor szívpunkcióval, EDT-t tartalmazó csövekbe vért vettünk, és a vörösvérsejteket hipotóniás pufferrel lizáltattuk. EDTA-t nem-tartalmazó csövekbe is vettünk vért, szérum nyerésére. Különálló sejteket tartalmazó szuszpenziót állítottunk elő lépéből és mezenterialis nyirokcsomókból (MLN), és a vörösvérsejteket hipotóniás pufferrel lizáltattuk. Áramlásos citometriás vizsgálatot végeztünk PE-konjugált anti-CD45R/B220, anti-syndecan/CD138 és anti-B7.2, valamint FITC-konjugált anti-IgM és anti-CD45R/B220 alkalmazásával. Valamennyi mAb-t a Pharmingen (San Diego, CA) cégtől szereztük be. Röviden, Fc-receptorokat 15 perc alatt, 10 µg/ml „Fc Block” (Pharmingen) alkalmazásával jégen blokkolunk, majd PE- és FITC-konjugált mAb-eket adtuk hozzá, és 20-30 percig jégen inkubáltunk. Sejteket egyszer mostunk, és 0,5% paraformaldehidben szuszpendáltunk. Sejtfluoreszcencia adatokat FACSCalibur™ áramlásos citométerrel (Becton Dickinson, San Jose, CA) határoztunk meg, és CELLQuest™ programcsomag (Becton Dickinson) alkalmazásával analizáltunk.

hBAFF-R-Ig-vel történő kezelést követően, körülbelül 50%-kal csökkent a B-sejtek száma a perifériás vérben és a vizsgált perifériás nyirokszervekben. A B220^{high}IgM^{low} B-sejtek a sejtek 23,4%-át és 21,5%-át tették ki a PBS-sel kezelt és HuIgG-kezelt egerekben, míg ez a populáció csak sejtek 9,9%-át képviselte a hBAFF-R-Ig-kezelt egerekben. A plazmasejtek (syndecan/CD138+) száma szintén mérsékelten csökkent; ezek a sejtek

5,7%-át és 4,8%-át tették ki a PBS-sel kezelt és HulgG-kezelt egerek vérében, míg a sejtek 3,9%-át képviselték a hBAFF-R-Ig-kezelt egerekben. A PBS-sel kezelt és HulgG-kezelt egerek esetében, a B7.2-molekulák aránya 3,1%-ra és 4,5%-ra emelkedett a B220⁺-sejtekben, míg azok szintje 1,9% volt a hBAFF-R-Ig-kezelt egerekben.

A lépben, a B220^{high} B-sejtek száma jelentősen csökkent a hBAFF-R-Ig-kezelt egerekben; azok aránya 18,8% volt, szemben a PBS-sel kezelt és HulgG-kezelt egerek esetében tapasztalt 36,7%-os és 40%-os szintekkel. Ez a csökkenés mind az IgM^{high}, mind az IgM^{low} szubpopuláció esetében megfigyelhető volt (lásd 8.A ábra). A lépben, nem volt változás kimutatható az újonnan képződött, B220^{low}IgM^{high} B-sejtpopulációban (az erre vonatkozó adatokat nem tüntettük fel). A plazmasejtek (syndecan/CD138⁺) száma ugyancsak mérsékelten csökkent; ezek a sejtek 3,3%-át és 3,4%-át tették ki a PBS-sel kezelt és HulgG-kezelt egerekben, míg a sejtek 2,4%-át képviselték a hBAFF-R-Ig-kezelt egerek esetében.

A MLN-ban (mezenteriális nyirokcsomókban), csökkent a B220⁺B-sejtek száma; azok aránya 14,1% volt a hBAFF-R-Ig-kezelt egerekben, míg 26,7% és 35,8% a PBS-sel kezelt és HulgG-kezelt egerekben. Eredményeinket a 8.A táblázatban összegeztük.

8.A táblázat

A B-sejtpopuláció aránya a hBAFF-R-Ig-, PBS- és HulgG-kezelt egerekben ¹

Vér	B220 ^{high} IgM ^{low}	Syndecan	B7.2/B220 ^{low}
PBS	23,4 $\pm$ 5,7	5,7 $\pm$ 1,5	3,1 $\pm$ 0,5
HulgG	21,5 $\pm$ 4,5	4,8 $\pm$ 0,9	4,5 $\pm$ 1,0
HBAFF-R-Ig	9,9 $\pm$ 1,8	3,9 $\pm$ 0,6	1,9 $\pm$ 0,5
Lép	B220 ^{high} IgM ^{low}	B220 ^{high} IgM ⁺	Syndecan
PBS	27,8 $\pm$ 1,6	11,9 $\pm$ 1,6	3,3 $\pm$ 0,8
HulgG	30,5 $\pm$ 2	11,8 $\pm$ 1,0	3,4 $\pm$ 0,7
HBAFF-R-Ig	10,6 $\pm$ 0,2	8,4 $\pm$ 0,2	2,4 $\pm$ 0,2
MLN	B220 ⁺		
PBS	26,7		
HulgG	35,8 $\pm$ 3,3		
HBAFF-R-Ig	14,1 $\pm$ 5,9		

¹: Az egereket az anyagok és módszerek ismertetése kapcsán írtuk le, az adatokat százalékban adtuk meg ($\pm$ - standard eltérés).

A B7.2-sejtek csökkent százalékos aránya a hBAFF-R-Ig-kezelt egerek vérében és a plazmasejteké a hBAFF-R-Ig-kezelt egerek vérében és a lépben az SRBC-kkel történő immunizációt követően arra utal, hogy gátolt a B-sejttaktiválás és/vagy B-sejtérés, és potenciálisan fokozott az aktivált B-sejtek eliminációja. Antigén-specifikus B-sejtek igen kis százaléka aktiválódik és válaszol antigénstimulusra, ebben az esetben SRBC-stimulusra. Mivel a hBAFF-R-Ig-kezelés valamennyi vizsgált szövetben ilyen nagymértékben csökkentette a B-sejtek arányát, a hBAFF-R-Ig-aktivitás mintegy 50%-a egyúttal célspecifikus nyugvó, érett B-sejtek jelenlétének tudható be.

Arra a következtetésre jutottunk tehát, hogy a BAFF-R fúziós protein terápiás hatóanyagként alkalmazható a klinikumban, B-sejtek által közvetített betegségek kezelésére. Azok alkalmazásának lehetősége felmerül autoimmun betegségekben, például szisztémás lupus erythematosus, myasthenia gravis, autoimmun haemoliti-

kus anaemia, idiopátiás thrombocytopeniás purpura, anti-foszfolipid szindróma, Chagas-kór, Graves-betegség, Wegener-granulomatosis, polyarteritis nodosa és gyorsan progrediáló glomerulonephritis kezelésében. A terápiás hatóanyag alkalmazható továbbá plazmasejteket érintő rendellenességekben, például myeloma multiplexben, Waldenstrom makroglobulinemiában, nehézlánc-betegségben, valamint elsődleges vagy immunasszociált amyloidózis és ismeretlen eredetű monoklonális gammopathia (MGUS) betegségekben. A fenti hatóanyag szintén alkalmazható onkológiai betegségekben, például B-sejtes karcinómákban, leukémiákban és limfómákban.

9. példa

BAFF által indukált B-sejtproliferáció *in vitro* gátlása szolúbilis BAFF-R :hIgG1 fúziós protein alkalmazásával

Az alábbiakban annak bizonyítását ismertetjük, hogy a szolúbilis BAFF-R :hIgG1 fúziós protein képes BAFF által indukált B-sejtproliferáció gátlására egér lépsejtekben.

Balb/c-egerekből egér lépsejteket (5×10^5 sejt/ml) izoláltunk, és azokat 96 lyukú lemezekben, 100 μ l, 10% főtális borjúsérummal (JRH), 2 mmol/l glutaminnal, 100 egység/ml penicillinnel és 100 μ g/ml streptomycinnel kiegészített RPMI-tápközegben (Life Technologies) inkubáltuk. Ezután, különböző mennyiségű humán BAFF-proteint, 10 μ g/ml humán BAFF-R:hIgG1 fúziós proteint vagy humán Ig-t, valamint 10 μ g/ml, egér felszíni μ nehézlánc elleni ellenanyagot (Jackson Immuno Research) adtunk a sejtekhez. Miután a sejteket 48 órán át, 37°C-on inkubáltuk, 24 órán át 1 μ Ci/lyuk [metil- 3 H]timidinnel (Dupont NEN) lökésszerűen kezeltük, és Tomtec sejtgyjűjtő (Orange, CT) alkalmazásával összegyűjtöttük. A radioaktivitást Betaplate folyadékszintillátorban (Pharmacia Biotech) mértük le.

A 8. ábrán a lépsejtproliferációs vizsgálat eredményeit ábrázoltuk. Az ábrán az egér lépsejtekbe beépült percnkénti beütésszámot (CPM) ábrázoltuk a hozzáadott humán BAFF-reagens mennyiségével szemben. Az anti- μ , fúziós protein vagy kontroll hIgG szintje állandó, 10 μ g/ml volt. A sötét négyzetek a csak BAFF által indukált proliferáció szintjét képviselik. A sötét körök BAFF és anti- μ hozzáadásával kiváltott sejtproliferációt jelentik. A világos háromszögekkel jelölt görbe a BAFF-R:hIgG1BAFF és anti- μ , valamint BAFF-R:hIgG1 hozzáadásakor megfigyelhető gátlást képviseli. A világos rombusz a kontroll humán Ig hozzáadásakor észlelt gátlást jelenti.

BAFF és anti- μ hozzáadása az egér lépsejtek proliferációját eredményezte *in vitro*. A sejtekbe beépült 3 H-timidin szintje jelentősen meghaladta azt a szintet, amelyet akkor mértünk, amikor csak BAFF vagy csak anti- μ lett hozzáadva a lépsejtekhez. A lépsejtek kezelése csak BAFF-polipeptiddel csak igen magas koncentrációk alkalmazásánál eredményezte 3 H-timidin beépülését. Amikor 10 μ g/ml kontroll humán Ig-t adtunk a lépsejtekhez növekvő mennyiségű BAFF és 10 μ g/ml anti- μ jelenlétében, a proliferáció szinte mérsékelten csökkent. Ezzel szemben, amikor 10 μ g/ml humán BAFF-R:hIgG1 fúziós proteint adtunk a vizsgálati rendszerhez a fenti körülményekkel megegyező körülmények mellett, a proliferáció mértéke a csak BAFF-polipeptiddel történő kezelést követően megfigyelhető szintre csökkent. Ez azt jelenti, hogy a BAFF-R:hIgG1 fúziós protein képes gátni a BAFF- és anti- μ -kezelt lépsejtek proliferációját.

10. példa

BAFF kötődésének gátlása Raji-sejtekhez BAFF-R:hIgG1 alkalmazásával

Ebben a példában azt mutatjuk be, hogy BAFF előinkubálása BAFF-R:hlG1 fúziós proteinnel csökkenti a BAFF kötődését Raji B-sejtes limfómasejtvonal sejtjeihez.

Az alábbi FACS-analízisben, 200 ng/ml FLAG-cimkézett humán BAFF-proteint inkubáltunk elő 30 percig, jégen humán BAFF-R:hlG1 fúziós proteinnel vagy humán LTβR:hlG1 fúziós proteinnel 20-39 ng/ml koncentrációtartományt átfedő kettes hígítási sor alkalmazásával, vagy fúziós protein hozzáadása nélkül. Az inkubálást az alábbi összetételű FACS-pufferben végeztük: Ca^{2+} - és Mg^{2+} -mentes PBS; 10% FCS (JRH); és 0,05% nátrium-azid. A preinkubálást követően, a BAFF - fúziós protein elegyet 5×10^6 Raji (ATCC) sejt/ml szuszpenzióhoz adtuk. Ezt az inkubálást 30 percig, jégen végeztük, majd a sejteket 4°C -on, 2 ml FACS-pufferrel mostuk. A kötődött BAFF kimutatására, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ M2 anti-FLAG-ellenanyagot (Sigma) adtunk a sejtekhez, és azokat 30 percig, jégen inkubáltuk. A sejteket a fent ismertetettek szerint ismét mostuk, majd 30 percig PE-konjugált, számrban termelt anti-egér-Ig (Jackson Immuno Research) 1:100 hígítású oldatával jégen inkubáltuk. Miután a sejteket FACS-pufferrel ismét mostuk, 1%-os paraformaldehiddel fixáltuk, és FACS® (Becton Dickinson and Co.) készülékkel analizáltuk.

A 9. ábrán a BAFF gátlási vizsgálat eredményeit ábrázoltuk. Az ábrán a BAFF Raji-sejtekhez történő kötődésének FACS®-analízise során leolvasott MFI (átlagos fluoreszcenciaintenzitás) értékeket ábrázoltuk. A sötét négyzetek által képviselt adatokat úgy kaptuk, hogy a sejtekhez történő kötődést megelőzően a humán BAFF-R:hlG1 fúziós proteint BAFF-proteinnel előinkubáltuk. A körökkel jelzett görbe egy nem-specifikus fúziós protein - humán LTβR:hlG1 - BAFF-proteinhez történő hozzáadásával kapott eredményeket képvisel. Az X-tengelyen a sejtekkel történő inkubálást megelőzően 200 ng/ml BAFF-proteinhez adott fúziós protein mennyiségét jelöltük.

Amennyiben előzetesen nem inkubáltunk fúziós proteint a humán BAFF-proteinnel, a minta átlagos fluoreszcenciaintenzitása (MFI) 80 volt. Amikor a vizsgálatot megelőzően humán LTβR:hlG1 fúziós proteint inkubáltunk BAFF-proteinnel, még 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ koncentrációnál sem változott a BAFF kötődése Raji-sejtekhez. Amikor azonban humán BAFF-R:hlG1 fúziós proteint inkubáltunk elő BAFF-proteinnel, az MFI már 625 ng/ml fúziós protein koncentrációnál jelentősen csökkent, 20-25-ös értékre. A háttér MFI-érték ebben a kísérletben 7 volt. A BAFF-R:hlG1 fúziós protein tehát igen hatékonyan blokkolta a BAFF kötődését Raji B-sejtekhez.

11. példa

BAFF-R:IgG mérsékli a lupus szerű autoimmun rendellenességeket transzgenikus egerekben

Ebben a példában BAFF-R:IgG perifériás B-sejtpopulációt csökkentő, valamint lépnagyobbodás és nephritis kialakulását gátló hatását ismertetjük.

A kísérletben öt hónapos BAFF transzgenikus (Tg) egereket (C57BL/6) és korban egyező alomtársaikat alkalmaztuk. A BAFF-Tg-egereknél limfocitarendellenességek lépnek fel, és azokra szisztémás lupus erythematosus esetében megfigyelhetőhöz hasonló autoimmun fenotípus jellemző [Mackay és mtsai.: (1999)]. Ez a fenotípus a perifériás B-sejtpopuláció növekedésében, ezen belül, átmeneti 1 (T1) és 2 (T2), érett (M), marginális zóna (MZ) és $\text{CD1}^{\text{high}}/\text{IgM}^{\text{high}}$ B-sejtek számának növekedésében nyilvánul meg.

Az egereket a 0., 4., 7., 11., 14., 18., 21., 25., 28., 32. és 35. napokon intraperitoneálisan (i.p.) PBS-sel, 400 μg tisztított humán IgG-vel (hlG) (Sandoz, Bázel, Svájc) (3 egér/csoport) vagy 400 μg CHO-eredetű humán BAFF-R-hlG1 (hBCMA-Ig) fúziós proteinnel kezeltük, és a 40. napon leöltük.

Az állatok elpusztításakor lemértük a lépek tömegét, és a vörösvérsejtek hipotóniás pufferrel történő lizátatását követően különálló sejteket tartalmazó szuszpenziókat készítettünk. Áramlásos citometriás analízisi végeztünk FITC-konjugált anti-CD21/CD35, PE-konjugált anti-IgD és anti-CD1, citokróm-konjugált anti-CD45R/B220 és biotin-konjugált anti IgM alkalmazásával. Valamennyi mAb a Pharmingen cégtől származott. (San Diego, CA) Röviden, Fc-receptorokat 10 perc alatt, 10 µg/ml „Fc Block” (Pharmingen) alkalmazásával jégen blokkolunk, majd biotin-konjugált mAb-ellenanyagokat adtunk hozzá, és 30 percig jégen inkubáltunk. A sejteket egyszer mostuk, majd FITC-, PE-, citokróm-konjugált mAb-ellenanyagokat, streptavidin APC-vel és 10/µg/ml FC Block reagenst adtunk hozzájuk. Miután a sejteket 30 percig jégen inkubáltuk, egyszer mostuk, és 0,5% paraformaldehidben szuszpendáltuk. Sejtfloreszcencia adatokat FACSCalibur™ áramlásos citométerrel (Becton Dickinson, San Jose, CA) határoztunk meg, és CELLQuest™ programcsomag (Becton Dickinson) alkalmazásával analizáltunk.

Vizeletanalízis esetén, a proteinek jelenlétét „Multistix 10 SG” reagenscsík (Bayer Corp., Diagnostics Division) alkalmazásával mértük egervizeletben.

Eredményeinket a 11.A és 11.B táblázatokban, az alábbiakban összegeztük.

11.A táblázat

Lépsejtanalízis 3 hónapos egerekben

	Teljes sejtszám lépenként (x10 ⁶)			
BAFF Tg egerek	T1	T2	MZ	Érett
816E23	9,4	18	9	91
816E33	14	30	19	170
816E99	14	24	19	150
Átlag	13±2,6	24±6	16±5,7	140±41

Alomtárs kontrollok				
816E2	5,3	5,8	3,1	73
816E4	2,4	3,7	1,9	44
Átlag	3,9±2	4,8±1,5	2,4±1	59±20

Három hónapos Baff Tg-egerek (n=3) és korban egyező alomtársaik (n=2) lépét izoláltuk, és FACS-analízisnek vetettük alá a fent ismertetettek szerint. A T1-, T2-, M- és MZ-sejteket a következő felszíni markerek expressziója alapján azonosítottuk [a következő rövidítéseket alkalmaztuk: hi: *high* (magas; lo: *low* (alacsony; int: *intermediate* (közepes)]:

T1: IgD⁺, IgM^{high}, CD21^{lo};

MZ: IgD⁺, IgM^{hi}, CD21;

T2: IgD⁺, IgM^{hi}, CD21^{hi};

M: IgD⁺, IgM^{lo}, CD21^{int}.

11.B táblázat

Lépsejtanalízis 10 hónapos egerekben

	Teljes sejtszám lépénként ($\times 10^6$)			
BAFF Tg egerek	T1	T2	MZ	Érett
802-39	13	100	34	630
823-3-11	7,5	43	6,6	200
823-3-13	3,1	50	15	180
Átlag	7,9 $\pm$ 4,9	64 $\pm$ 30	19 $\pm$ 10	340 $\pm$ 250

Alomtárs kontrollok				
823-3-22	0,7	6,5	1,4	56
802-64	0,28	5,4	1,3	38
823-14-13	0,45	3,4	0,16	38
Átlag	0,48 $\pm$ 0,21	5,1 $\pm$ 1,5	0,95 $\pm$ 0,65	44 $\pm$ 10

Tíz (10) hónapos BAFF Tg-egerek ($n=3$) és korban egyező alomtársaikat ($n=3$) lépét izoláltuk, és FACS-analízisnek vetettük alá az 1. táblázat adataival kapcsolatban ismertetettek szerint.

Amikor hBAFF-R-Ig-t adtunk be BAFF Tg-egereknek, a T1-, T2-, M- és MZ-populáció, valamint a $CD1^{high}/IgM^{high}$ B-sejtek száma jelentősen csökkent a lépben a PBS-sel és hIG-vel kezelt BAFF Tg-egerekben mért értékekhez képest; a T1-, T2-, M-, MZ- és $CD1^{high}$ B-sejtek száma a PBS-sel kezelt kontroll alomtársakban mért értékekhez hasonló szintre vagy az alá csökkent (10.A, 10.B és 10.C ábrák).

A BAFF Tg-egerek BAFF-R-Ig-vel történő kezelése a BAFF által közvetített autoimmun betegség enyhüléséhez vezetett, mivel a BAFF-R-kezelt egerek lépé normális méretű volt, míg a kontrollkezelésben részesült BAFF Tg-egereknél lépnagyobbodást tapasztaltunk (11. ábra). Ezen felül, a proteinuria – a vesefunkció-rendellenesség indikátora – csökkent mértékű volt a BAFF-R-kezelt BAFF Tg-egerekben, míg a kontrollkezelésben részesült BAFF Tg-egerekben a fokozódó proteinuria nephritis kialakulására utalt (12. ábra).

A BAFF-génre transzgenikus egerekben nagymértékben megnőtt a perifériás B-sejtek száma, és további vizsgálataink szerint elsősorban a T1, T2 és MZ B-sejt-szubpopuláció aránya. A B-sejtfejlődés átmeneti állomása (T1 és T2) az a ellenőrzési pont, ahol az autoreaktív B-sejtek feltehetően eliminálódnak. A $CD1^{hi}/IgM^{high}$ B-sejtek száma, amelyek inkább a marginális zónában található, szintén megnövekedett a BAFF Tg-egerekben. A B-sejtek eme utóbbi populációja bizonyult az autoellenanyag-termelés fő forrásának lupusban szenvedő NZB/NZW egerekben. BAFF Tg-egerek BAFF-R-Ig-vel történő kezelése a T1-, T2-, MZ- és $CD1^{hi}$ B-sejtpopuláció csökkenéséhez vezetett, a vad-típusú alomtárs kontrollokban mért értékekhez hasonló vagy annál alacsonyabb szintre.

A BAFF-R-Ig csökkentette a perifériás B-sejtpopulációt, és gátolta a lépnagyobbodás és nephritis kialakulását. Azon felül tehát, hogy az előnyösen alkalmazható szisztémás lupus erythematosus nephritiben, a BAFF-R-Ig hatása kihasználható B-sejtek által közvetített betegségekben, például autoimmun természetű betegségek, mint például myasthenia gravis, autoimmun haemolitikus anaemia, idiopátiás trombocitopeniás purpura, anti-foszfolipid szindróma, Chagas-kór, Graves-betegség, Wegener-granulomatosis, polyarteritis nodosa és gyorsan progrediáló glomerulonephritis kezelésében. Ez a terápiás hatóanyag alkalmazható továbbá plazmasejteket érintő rendellenességekben, például myeloma multiplexben, Waldenstrom makroglobulinemiában, nehézlánc-betegségben, valamint elsődleges vagy immunasszociált amiloidózis és ismeretlen eredetű monoklonális

gammopathia (MGUS) betegségekben. A fenti hatóanyag szintén alkalmazható onkológiai betegségekben, például B-sejtes karcinómákban, leukémiákban és limfómákban.

12. példa

Átlagos artériás vérnyomás BAFF-génre transzgenikus egerekben

Ebben a kísérletben BAFF-génre transzgenikus egerek vérnyomásának alakulását vizsgáltuk. Megfigyeléseink, amelyeket BAFF-génre transzgenikus egerek fenotipusos vizsgálatával tettünk, magas vérnyomás kialakulására való hajlamra utaltak az egereknél.

Baff Tg-egereket ketaminnal elaltattunk. A baloldali nyaki verőeret (carotis artériát) a nyakon ejtett metszéssel szabaddá tettük. A vérnyomás és pulzusszám meghatározására katétert inszertáltunk a nyaki verőérbe. A katétert nyomástranzduktorral kötöttük össze, és a vérnyomást Gould adatgyűjtő rendszer (Po-Ne-Mah Data Acquisition system és Gould poligrát) alkalmazásával mértük. A pulzáló nyomáshullám formájából meghatároztuk a szisztolés nyomást, diasztolés nyomást, átlagos nyomást és pulzusszámot. Két egérecsoportot alkalmaztunk: BAFF-génre transzgenikus egereket ($n=8$) és vad-típusú kontrollokat ($n=9$).

A 13. ábrán a két csoportban meghatározott átlagos artériás nyomást ábrázoltuk („mean arterial pressure”, MAP; Hgmm-ben). Amint az ábrán látható, a BAFF-génre transzgenikus egerek átlagos MAP-értéke 102 ± 8 Hgmm volt. A kontroll egereknél 92 ± 6 Hgmm átlagos MAP-értéket állapítottunk meg. A BAFF-egerekben tehát 10 Hgmm-rel magasabb MAP-értékeket mértünk, mint a kontrolloknál, bár az emelkedés mértéke nem ért el statisztikai szignifikáns szintet (ANOVA).

Az adatok részletesebb analizisét mutatjuk be a 14. ábrán. Ezen az ábrán, az egyes állatokban meghatározott eredményeket ábrázoljuk. A vad-típusú kontrolloknál (BAFF-) az adatok megoszlása tipikus, binominális megoszlást mutat. Ezzel szemben, a BAFF transzgenikus egerek (BAFF+) vérnyomása két csoportra oszlik, az egyik csoporté 120-130 Hgmm tartományba, a másiké 80-90 Hgmm tartományba esik.

Mint populáció, a BAFF transzgenikus egerek hajlamot mutatnak magas vérnyomás kialakulására, szemben a negatív kontrollokkal. Az artériás nyomás szintjének vizsgálata az egyes egyedekben azt mutatta, hogy a BAFF-génre transzgenikus egerek két szubpopulációra oszthatók; egy magas vérnyomásúra, és egy normális vérnyomásúra. A fentiek szerint, szolúbilis BAFF-R, fúziós protein vagy ellenanyaghomológ beadásával enyhíthetők a magas vérnyomás hatásai.

13. példa

Megállapított betegségben szenvedő SNF1-egerek BAFF-R-Ig-kezelése lassítja a súlyos nephritis kialakulását

Huszonegy hetes, lupus kialakulására hajlamos, mérsékelt nephritisben szenvedő (30-100 mg/dl proteinuria) nőstény (SWR $\times$ NZB)F1(SNF1) egereknek 200 μ g humán BAFF-R-huIgG1 (hBCMA-Ig) fúziós proteint, humán IgG-t (HuIgG) (Sandoz) vagy 200 μ l PBS-t adtunk be i.p., hetente, összesen nyolc hétig. Az egyes egerek vizeletét hetente vizsgáltuk proteinuriára Albustix (Bayer Corp., Terrytown, N.Y.) alkalmazásával. Száz (100) mg/dl értéket meghaladó proteinuriát súlyos nephritis jelének tekintettünk. BAFF-R-Ig-t állítottunk elő transziens módon transzfektált EBNA293-sejtekből. hBCMA-Ig-t nagy mennyiségben expresszáló 293-sejtek kondicionált tápközegét protein-A-oszlopra vittük fel. A proteint 25 mmol/l foszfát, 100 mmol/l NaCl (pH=2,8) összetételű pufferrel eluáltuk, majd 1/20 térfogatú, 0,5 mol/l NaPO₄ (pH=8,6) pufferrel neutralizáltuk. OD₂₈₀

mellett szelektált frakciókat redukáló és nem-redukáló SDS-PAGE-géleken analizáltuk, és a tisztított protein azonosítására Western-blotnak vetítettük alá.

A kezelés befejezését követően 3 héttel, a BAFF-R-Ig-vel kezelt egerek 50%-ánál, míg a HulgG-vel kezelt egerek 75%-ánál, és a PBS-sel kezelt egerek 87,5%-ánál állapítottunk meg súlyos nephritist (lásd 15. ábra). A fenti adatok szerint, a szolúbilis BAFF-receptor, a BCMA-Ig, képes gátolni B-sejt által közvetített autoimmun betegség, például lupus nephritis kialakulását, jelentősen késleltetve a betegség progresszióját.

14. példa

Normális egerek BAFF-R-Ig-kezelése csökkenti a lép dendritikus sejtjeinek (DC) számát, és a sejtek atípusos lokalizációját eredményezi

Hét-hetes nőtény BALB/c-egereknek (csoportonként 3) 20 µg vagy 50 µg humán BAFF-R-IgG1 (hBCMA-Ig), 50 µg humán IgG-t (HulgG) vagy 100 µl PBS-t adtunk be hetente egyszer, 4 hétig. A hBCMA-Ig fúziós proteint stabilan transzfektált CHO-sejtvonal tenyészetének felüliszójából tisztítottuk. A lépeket az utolsó injekálás követően 8 héttel távolítottuk el, és azokat kollagenázzal (Sigma, katalógusszám: #C-5138) emésztettük 1 órán át, 37°C-on. Különlő sejteket tartalmazó szuszpenziót állítottunk elő, a vörösvérsejteket (RBC) hipotóniás pufferrel lizáltattuk, és a sejteket PBS-sel háromszor mostuk. A lépsejteket áramlásos citometriás analízisre készítettük elő a DC-populációk meghatározására a sejtek anti-CD11c-biotinnal, majd streptavidin-APC-vel, anti-CD8a-citokrómval és anti-CD4-FITC-vel történő festésével.

Egy másik kísérletben, nőtény BALB/c-egereknek (n=3) 100 µg hBCMA-Ig-t adtunk be i.p., hetente egyszer, 4 héten át, majd a lépeket OCT-ben, CO₂-n lehűtött 2-metil-bután alkalmazásával gyorsan lefagyasztottuk. Fagyasztott metszeteket vágtunk, és azokat acetonnal fixáltuk. A metszeteket anti-CD11c-biotinnal, majd streptavidin-AP-vel és BCIP-szubsztráttal (Pierce) inkubáluk a DC-k kimutatására; MOMA-1 monoklonális ellenanyaggal (mAb-val), majd patkány IgG elleni, HRP-konjugált ellenanyaggal (Jackson ImmunoResearch) és 3,3'-diaminobenzidin szubsztráttal (Sigma, St. Louis, MO, katalógusszám: D-1293) metallofil makrofágok kimutatására; és anti-CD35-biotinnal, majd streptavidin-AP-vel és szubsztráttal (alkalikus foszfatáz szubsztrát reagenssek; Alkaline Phosphatase Substrate Kit I; Vektor, katalógusszám: #SK-5100) a follikuláris dendritikus sejtek (FDC) kimutatására).

In vivo, hetente egyszer, négy hétig 20 µg vagy 50 µg BCMA-Ig-vel kezelt egerekben a léperedetű CD11c+ DC-sejtek számának szignifikáns (Student-teszt szerint $p < 0,05$) mértékű csökkenését figyeltük meg a HulgG-vel és PBS-sel kezelt kontrollokhoz képest. Ez a csökkenés valamennyi vizsgált CD11c+ DC-populációban megfigyelhető volt: CD8a-CD4-, CD8a+CD4- és CD8a-CD4+ (16. ábra, 14.A táblázat).

14. táblázat

A BAFF-R-Ig-kezelés a léperedetű DC-sejtek számának csökkenését eredményezi

	PBS	HulgG	20 µg BCMA-Ig	50 µg BCMA-Ig
CD11+ DC-sejtek átlagos száma ($\times 10^6$) $\pm$ SD				
CD8a-CD4-,	0,81 $\pm$ 0,15	0,49 $\pm$ 0,07	0,26 $\pm$ 0,04	0,35 $\pm$ 0,05
CD8a+CD4-	0,36 $\pm$ 0,02	0,35 $\pm$ 0,07	0,16 $\pm$ 0,02	0,2 $\pm$ 0,02
CD8a-CD4+	0,92 $\pm$ 0,02	0,84 $\pm$ 0,15	0,4 $\pm$ 0,06	0,55 $\pm$ 0,04

A leperedetű DC-sejtek, amelyek fontos antigénprezentáló sejtek, számának ez a csökkenése hatással lehet a B-sejtek aktiválódására, érésére és a humorális immunitásra.

Fagyasztoított lépmeteszeteiket készítettünk a fentiekben ismertetettek szerint. A BCMA-Ig-kezelt egerekben atípusos „DC-homing” („DC-hazatalálási”) mintázatot figyeltünk meg anti-CD11c ellenanyaggal történő festéssel. A DC-k normálisan a fehér pulpa T-sejtes zónájában és a marginális zónában találhatók, és a marginális zóna összekötő csatornáiban koncentrálnak. A BCMA-Ig-vel kezelt egerek DC-sejtjei azonban a marginális zóna pereme körül voltak kimutathatók, és azok közül kevés volt képes a fehér pulpába továbbvándorolni (erre vonatkozó adatainkat nem tüntettük fel). A BAFF/BAFF-R-kölcsönhatás gátlása szolubilis BAFF-receptorral képes tehát gátolni a DC-sejtek „homing” mintázatát, ami befolyásolhatja, hogy azok antigénprezentáló sejtekként képesek legyenek funkcionálni, ezáltal kihat a B-sejtek aktiválódására, érésére és a humorális immunitásra. Ezen felül, immunhisztokémiai vizsgálatok eredményei szerint, a BCMA-Ig-vel kezelt egerek lépéből hiányoztak a CD35+ FDC-sejtek (erre vonatkozó adatainkat nem tüntettük fel). Mivel az FDC-k szerepe az, hogy antigéneket prezentáljanak B-sejtek számára a csiraközpontokban („germinal centers”; GC), az ilyen sejtek hiánya károsan befolyásolhatja a GC-struktúrát és a B-sejtek affinitásérését.

Szakember számára nyilvánvaló, hogy a találmány szerinti polipeptidek, készítmények és eljárások módosítására és változtatására sor kerülhet anélkül, hogy a találmányi gondolatától vagy a találmány oltalmi körétől eltérnénk. Az ilyen módosítások és változtatások szintén a találmány tárgyát képezik, feltéve, hogy a csatolt igénypontok és az igényveltek ekvivalensei által behatárolt oltalmi körbe tartoznak.

See also

<210> 1

<211> 184

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 1

Met	Leu	Gln	Mat	Ala	Gly	Gln	Cys	Ser	Gln	Asn	Glu	Tyr	Phe	Asp	Ser
1				5					10					15	
Leu	Leu	His	Ala	Cys	Ile	Pro	Cys	Gln	Leu	Arg	Cys	Ser	Ser	Asn	Thr
			20					25					30		
Pro	Pro	Leu	Thr	Cys	Gln	Arg	Tyr	Cys	Asn	Ala	Ser	Val	Thr	Asn	Ser
		35					40					45			
Val	Lys	Gly	Thr	Asn	Ala	Ile	Leu	Trp	Thr	Cys	Leu	Gly	Leu	Ser	Leu
	50					55					60				
Ile	Ile	Ser	Leu	Ala	Val	Phe	Val	Leu	Met	Phe	Leu	Leu	Arg	Lys	Ile
65				70						75				80	
Ser	Ser	Glu	Pro	Leu	Lys	Asp	Glu	Phe	Lys	Asn	Thr	Gly	Ser	Gly	Leu
			85						90					95	
Leu	Gly	Met	Ala	Asn	Ile	Asp	Leu	Glu	Lys	Ser	Arg	Thr	Gly	Asp	Glu
			100					105					110		
Ile	Ile	Leu	Pro	Arg	Gly	Leu	Glu	Tyr	Thr	Val	Glu	Glu	Cys	Thr	Cys
		115					120					125			
Glu	Asp	Cys	Ile	Lys	Ser	Lys	Pro	Lys	Val	Asp	Ser	Asp	His	Cys	Phe
	130					135					140				
Pro	Leu	Pro	Ala	Met	Glu	Gly	Ala	Thr	Ile	Leu	Val	Thr	Thr	Lys	
145				150					155					160	
Thr	Asn	Asp	Tyr	Cys	Lys	Ser	Leu	Pro	Ala	Ala	Leu	Ser	Ala	Thr	Glu
			165						170					175	

Met	Asp	Thr	Leu	Leu	Leu	Trp	Val	Leu	Leu	Leu	Trp	Val	Pro	Gly	Ser
1				5					10					15	
Thr	Gly	Met	Leu	Gln	Met	Ala	Gly	Gln	Cys	Ser	Gln	Asn	Glu	Tyr	Phe
			20					25					30		
Asp	Ser	Leu	Asp	Val	Thr	Met	Leu	Gln	Met	Ala	Gly	Gln	Cys	Ser	Gln
			35					40					45		
Asn	Glu	Tyr	Phe	Asp	Ser	Leu	Leu	His	Ala	Cys	Ile	Pro	Cys	Gln	Leu
	50					55					60				
Arg	Cys	Ser	Ser	Asn	Thr	Pro	Pro	Leu	Thr	Cys	Leu	His	Ala	Cys	Ile
65					70					75					80
Pro	Cys	Gln	Leu	Arg	Cys	Ser	Ser	Asn	Thr	Pro	Pro	Leu	Thr	Cys	Gln
				85						90				95	
Arg	Tyr	Cys	Asn	Ala	Ser	Val	Thr	Asn	Ser	Val	Lys	Gly	Gln	Arg	Tyr
			100					105					110		
Cys	Asn	Ala	Ser	Val	Thr	Asn	Ser	Val	Lys	Gly	Val	Asp	Lys	Thr	His
			115					120				125			
Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val
						135					140				
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr
145					150					155					160
Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu
				165					170					175	
Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys
			180					185					190		

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Tyr Val Val Ser Val
 195 200 205

<210> 4

<211> 540

<212> DNS

<213> homo sapiens

<400> 4

atggagacag acacactcct gttatgggtg ctgctgctct gggttccagg ttccactggt
 60
 gacgtcacga tgttcagat ggctgggcag tgctcccaaa atgaatattt tgacagtgtg
 120
 ttgcatgctt gcataccttg tcaacttcga tgtttctcta atactcctcc tctaaccatgt
 180
 cagcgttatt gtaatgcaag tgtgaccaat tcagtgaag gagtcgacaa aactcacaca
 240
 tgccacccgt gccagcacc tgaactcctg gggggacgt cagtcttctt ctcccccca
 300
 aaacccaagg acacctcat gatctcccg gacccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac
 360
 gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc aactggtagc tggacggcgt ggaggtgcat
 420
 aatgccaaaga caaagccgcg ggaggagcag tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc
 480
 ctcacgctcc tgcaccagga ctggctgaat ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac
 540

<210> 5

<211> 140

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 5

Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys
1				5					10					15	
Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser
			20					25					30		
Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro
			35				40					45			
Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val
			50				55				60				
Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly
						70				75				80	
Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp
				85					90					95	
Gly	Ser	Phe	Phe	Lys	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln
			100				105					110			
Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His
			115				120					125			
Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys				
			130			135					140				

<210> 6

<211> 369

<212> DNS

<213> homo sapiens

<400> 6

aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa
60
ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg
120
acctgcctgg tcaaaggcct ctatcccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg
180
cagccggaga acaactacaa gaccacgcct cccgtgttgg actccgacgg stctttcttc
240
ctctacagca agctcacctg ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc
300
tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccc
360
gggaaatga
369

<210> 7

<211> 184

<212> FRT

<213> homo sapiens

<400> 7

Met	Leu	Gln	Met	Ala	Gly	Gln	Cys	Ser	Gln	Asn	Glu	Tyr	Phe	Asp	Ser
1				5					10					15	
Leu	Leu	His	Ala	Cys	Ile	Pro	Cys	Gln	Leu	Arg	Cys	Ser	Ser	Asn	Thr
			20					25					30		
Pro	Pro	Leu	Thr	Cys	Gln	Arg	Tyr	Cys	Asn	Ala	Ser	Val	Thr	Asn	Ser
			35				40					45			
Val	Lys	Gly	Thr	Asn	Ala	Ile	Leu	Trp	Thr	Cys	Leu	Gly	Leu	Ser	Leu
	50					55					60				
Ile	Ile	Ser	Leu	Ala	Val	Phe	Val	Leu	Met	Phe	Leu	Leu	Arg	Lys	Ile
65					70					75				80	
Ser	Ser	Glu	Pro	Leu	Lys	Asp	Glu	Phe	Lys	Asn	Thr	Gly	Ser	Gly	Leu
			85						90					95	
Leu	Gly	Met	Ala	Asn	Ile	Asp	Leu	Glu	Lys	Ser	Arg	Thr	Gly	Asp	Glu
			100					105					110		
Ile	Ile	Leu	Pro	Arg	Gly	Leu	Glu	Tyr	Thr	Val	Glu	Glu	Cys	Thr	Cys
		115					120					125			
Glu	Asp	Cys	Ile	Lys	Ser	Lys	Pro	Lys	Val	Asp	Ser	Asp	His	Cys	Phe
	130					135				140					
Pro	Leu	Pro	Ala	Met	Glu	Glu	Gly	Ala	Thr	Ile	Leu	Val	Thr	Thr	Lys
145				150						155				160	
Thr	Asn	Asp	Tyr	Cys	Lys	Ser	Leu	Pro	Ala	Ala	Leu	Ser	Ala	Thr	Glu
			165					170						175	
Ile	Glu	Lys	Ser	Ile	Ser	Ala	Arg								
			180												

<210> 8

<211> 995

<212> DNS

<213> homo sapiens

<400> 8

aagactcaaaa cttagaaact tgaattagat gtggtattca aatccttacg tgccgcgaag
60
acacagacag cccccgtaag aacccacgaa gcaggcgaag ttcattgttc tcaacattct
120
agctgetctt gctgcatttg ctctggaatt cttgtagaga tattacttgt ccttcacagc
180
tgttctttct gtatctccct tgttttcttt ttgtgatcat gttgcagatg gctgggcagt
240

gctcccaaaa tgaatatttt gacagtttgt tgcattgcttg cataccttgt caacttcgat
300
gtttctctaa tactctctct ctaacatgtc agcgttatgt taatgcaagt gtgaccaatt
360
cagtgaagg aacgaatgag attctctgga cctgtttggg actgagctta ataatttctt
420
tggcagtttt cgtgctaattg tttttgctaa ggaagataag ctctgaacca ttaaaggagc
480
agtttaaaaa cacaggatca ggtctctctg gcattggctaa cattgacctg gaaaagagca
540
ggactgggtga tgaaattatt cttccgagag gcctcgagta cacgggtggaa gaatgcacct
600
gtgaagactg catcaagagc aaaccgaagg tgcactctga ccattgcttt ccactcccag
660
ctatggagga aggcgcaacc attcttctga ccacgaaaac gaatgactat tgcaagagcc
720
tgccagctgc tttgagtgtc acggagatag agaaatcaat ttctgctagg taattaacca
780
tttgactcg agcagtgcca ctttaaaaat cttttgtcag aatagatgat gtgtcagatc
840
tctttaggat gactgtatgt ttcagttgcc gatacagctt tttgtctctt aactgtggaa
900
actctttatg ttagatatat ttctctaggt tactgttggg agcttaatgg tagaaacttc
960
cttgggttca tgattaaagt cttttttttt cctga
995

Szabadalmi igénypontok

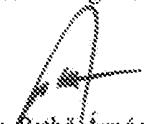
1. A következők bármelyike, gyógyszerként történő alkalmazásra:
 - (a) az 1. azonosítószámú szekvenciára (SEQ ID NO: 1) specifikus ellenanyag; és
 - (b) az 1. azonosítószámú szekvencia (SEQ ID NO: 1) szerinti 8-41. aminosavak szekvenciáját magában foglaló polipeptid.
2. A következők:
 - (a) az 1. azonosítószámú szekvenciára (SEQ ID NO: 1) specifikus ellenanyag; és
 - (b) az 1. azonosítószámú szekvencia (SEQ ID NO: 1) szerinti 8-41. aminosavak szekvenciáját magában foglaló polipeptid,
 bármelyikének alkalmazása emlősből autoimmun rendellenesség, B-sejtes limfoproliferációval kapcsolatos rendellenesség vagy gyulladás kezelésére alkalmas gyógyászati készítmény előállítására.
3. Az 1. igénypont szerinti polipeptid vagy a 2. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a polipeptid egy immunglobulin Fc-doménjét is tartalmazza.
4. A 3. igénypont szerinti polipeptid vagy alkalmazás, ahol az immunglobulin IgG.
5. A 4. igénypont szerinti polipeptid vagy alkalmazás, ahol az immunglobulin humán.
6. A 2-5. igénypontok bármelyike szerinti polipeptid vagy alkalmazás, ahol a gyógyászati készítmény gátolja a B-sejtek szaporodását az emlősből.
7. A 2-5. igénypontok bármelyike szerinti alkalmazás, ahol a gyógyászati készítmény gátolja az immunglobulin termelődést az emlősből.
8. A 2-5. igénypontok bármelyike szerinti polipeptid vagy alkalmazás, ahol a gyógyászati készítmény gátolja a dendritikus sejtek által kiváltott B-sejtszaporodást az emlősből.

9. A 2-8. igénypontok bármelyike szerinti polipeptid vagy alkalmazás, ahol az emlős ember.

A meghatalmazott:

DANUBIA

Szabadalmi és Jogi Iroda Kft.


Dr. Pethő Árpád

szabadalmi ügyvivő