

PO101690

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY



AZ

Onkosztatin-M-antagonista alkalmazása

K I V O N A T

A találmány tárgyát képezi kisméretű, szerves molekulájú, vagy antitest-jellegű onkosztatin-M-antagonista alkalmazása gyulladásos arthropathiák vagy gyulladásos rendellenességek kezelésére vagy megelőzésére szolgáló gyógyszer előállítására.

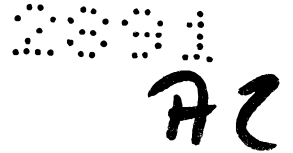
A találmány szerinti megoldásban az onkosztatin-M alkalmazható az ilyen antagonisták szkrínelésére is.

jellemző abra: φ

FA

PO101690

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY



Képviselő:

Danubia

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

B u d a p e s t

Onkosztatin-M-antagonista alkalmazása

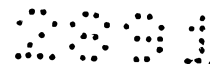
A találmány tárgyát képezi az onkosztatin-M (OSM) antagonistájának alkalmazása gyulladásos arthropathia vagy gyulladásos rendellenességek kezelésében vagy megelőzésében, és az ilyen antagonisták szkrínelésére szolgáló eljárásokban.

A rheumatoid arthritis (RA) az ízületeket érintő krónikus gyulladásos betegség, amely synovialis hyperplasiával, valamint a mononukleáris sejtek és a polimorfonukleáris leukociták (PMN) extenzív infiltrációjával jellemezhető. A rezidens és az infiltrálódó sejttypusok komplex és nem teljesen tisztázott kölcsönhatása vezet a metalloproteinázok (MMP-k) szekréciójához, és ez az ízületi porc, az ínszalagok és a porc alatti (subchondralis) csont roncsolódását eredményezi [Firestein, G.S., Current Opinion in Rheumatology 4: 348-54 (1992)]. Kimutatták, hogy a számos, proinflammatorikus citokin között, amely a RA patológiás folyamatainak irányításában szerepet játszik, a TNF α -nak kulcsszerepe van, és az anti-TNF α -terápiák ezt egyértelműen



bizonyítják [Elliot, M.J. és mtsai., *Lancet* 344(8930): 1105-10 (1994)]. A TNF α közvetít néhány patológiás hatást: többek között az MMP-k indukcióját [Dayer, J.M. és mtsai., *Journal of Experimental Medicine* 162(6): 2163-8 (1985)], más, proinflammatorikus citokinek serkentő szabályozását („upregulation”) [Haworth, C. és mtsai., *European Journal of Immunology* 21(10): 2575-9 (1991); Dinarello, C.A. és mtsai., *Journal of Experimental Medicine* 163(6): 1433-50 (1986)], és a PMN-adhéziót és a tranzendotheliális sejtmigrációt [Smart, S.J., Casale, T.B. *American Journal of Physiology* 266: L238-45 (1994)]. Viszonylagosan keveset tudunk a TNF α pozitív szabályozásáról, annak ellenére, hogy jelenleg a proinflammatorikus citokinkaszád iniciátorának tekintjük [Feldman, M. és mtsai., *Annual Review of Immunology* 14: 397-440 (1996)].

Az onkosztatin-M (OSM) egy 28 kDa méretű glikoprotein [Rose, T.M., Bruce A.G. *PNAS USA* 88(19): 8641-5 (1991)], amely az IL-6-ot, az IL-11-et, a leukémia-inhibitoros faktort (LIF), a ciliáris neutrotrofikus faktort (CNTF) és a kardiotrofin-1-et (CT-1) magában foglaló citokincsaládhoz tartozik [Taga, T., Kishimoto, T., *Annual Review of Immunology* 15: 797-819 (1997)]. A citokincsalád minden tagja közös jelátviteli láncon, a gp130-on osztozik, amely a heterodimer és homodimer receptorok egy komplex családjá részét képezi [Grotzinger, J. és mtsai., *Proteins* 27(1) 96-109 (1997)]. Az OSM-nek és az LIF-nek közös, heterodimer receptorja van (LIFr: I-es típusú gp130), és az OSM-nek van egy saját, egyedi receptorja is, amely OSMr β -láncot és (II-



es típusú) gp130-at tartalmaz [Mosley, B. és mtsai., Journal of Biological Chemistry 271(51): 32635-32643 (1996)]. Az OSM sokáig a sejtnövekedésre és differenciálódásra gyakorolt hatásáról volt ismert [Horn és mtsai., Growth Factors 2(2-3): 157-65 (1990)]. Újabban kimutatták, hogy az OSM *in vivo* hatásos, proinflammatorikus tulajdonságokkal rendelkezik egér esetében [Modur, V. és mtsai., J. Clin. Invest. 100: 158-168 (1997)], és az IL-1-gyel hatékony szinergiát mutat az ízületi porc degradációjának gyorsításában, *ex vivo* modellrendszerekben [Cawston, T., Biochemical & Biophysical Research Communications 215(1): 377-85 (1995)].

Az OSM az endothelsejtekből a P-szelektin (és az E-szelektin) meghosszabbított serkentését idézi elő [Yao, L. és mtsai., Journal of Experimental Medicine 184(1): 81-92 (1996)], a humán eredetű synovialis fibroblaszt esetében stimulálja az urokináz-típusú plazminogén-aktivátor-aktivitást [Hamilton, J. és mtsai., Biochemical & Biophysical Research Communications 180(2): 652-9 (1991)] és az endothelsejtekből származó IL-6 hatékony indukálója [Brown, T.J. és mtsai., Journal of Immunology 147(7): 2175-80 (1991)]. Az OSM-ről újabban kimutatták, hogy RA esetében kimérhető, de OA esetében nem mérhető ki a synovialis folyadékban [Hui, W. és mtsai., Annals of the Rheumatic Diseases 56(3): 184-187 (1997)] és a synoviumban, ahol termelése a makrofágokhoz köthető [Okamoto, H. és mtsai., Arthritis and Rheumatism 40(6): 1096-4405 (1997); Cawston és mtsai., Arthritis and Rheumatism 41(10): 1760-1771



(1998)]. A további kísérletek ezen a területen feltételezésekre épülnek és az IL-6-alcsaládba tartozó tagok hasonlóságán alapulnak [Carroll, G. és mtsai., *Inflamm. Res.* 47: 1-7 (1998)].

Felismertük, hogy az OSM képes a TNF α -szekréció indukálására makrofágokban. Az a felismerés, hogy az OSM indukálja a TNF α -szekréciót, azt sugallta számunkra, hogy az OSM valójában szerepet játszik a porc roncsolódásának közvetítésében; ez ellentétben áll a jelenleg rendelkezésre álló adatokkal, amelyek valószínűsítik, hogy az OSM serkentőleg szabályozza a metalloproteináz-1 (TIMP-1) szöveti típusú inhibitorát [Nemoto és mtsai., *A&R* 39(4): 560-566 (1996)], amely komplexet képez az MMP-1-gyel, inaktiválja azt és ezáltal csökkenti a kollagénkiáramlást. E felismerésre alapozva bebizonyítottuk, hogy semlegesítő, anti-OSM-antitest terápiás célú beadása más, az IL-6 családba tartozó tagok gátlása nélkül önmagában képes enyhíteni a kollagén által indukált arthritist egérmodellben. A kollagén porc által történő kibocsátásának gyorsításában a TNF α és az OSM szinergizmusát később kimutatta T. Cawton [Cawton, T. és mtsai. *Arthritis and Rheumatism* 41(10): 1760-1771 (1998)].

A találmány tárgyát képezi az OSM antagonistájának alkalmazása gyulladáisos arthropathia vagy gyulladáisos rendellenesség kezelésére vagy megelőzésére szolgáló gyógyszer előállításában. Közelebbről a találmány tárgyát képezi az OSM antagonistájának alkalmazása a kollagén ízületi porcból történő kiáramlásának megelőzésére vagy csökkentésére szol-

gáló gyógyszer előállításában. A találmány tárgyat képezi továbbá gyulladákos arthropathia vagy gyulladákos rendellenesség kezelésére vagy megelőzésére szolgáló eljárás, amely magában foglalja az OSM antagonistája hatásos mennyiségének beadását az ilyen rendellenességben szenvedő beteg részére.

Az antagonista kifejtheti hatását úgy, hogy blokkolja az OSM-et a gp130-as OSM-receptorral, vagy más receptorokkal, az OSM β -val vagy az LIFr-rel való kölcsönhatásával szemben, vagy blokkolhatja e fehérjék heterodimerjeinek kialakulását, és így akadályozza meg az OSM kötődését és szignalizációját, ezáltal csökkentve a gyulladáskeltő citokinek és/vagy MMP-k szintézisét. A találmány szerinti antagonista így tehát lehet liganduma az OSM-nek, vagy egy vagy több OSM-receptornak (a gp130-nak, az OSM β -nak vagy az LIFr-nek), vagy lehet olyan hatóanyag, amely képes e reakciókba történő beavatkozásra olyan módon, amely az OSM biológiai aktivitására hat. Az alábbiakban az „OSM antagonistája” kifejezés alatt magának az OSM-nek vagy receptorai egyikének antagonistáját értjük.

Kimutattuk, hogy rheumatoid arthritis-ben a synovialis vaszkuláris endotheliumban a P-szelektin és az E-szelektin a gp130-cal, az I. és a II. típusú OSM-receptor szignalizációs elemével együttesen fordul elő. Noha nem kívánjuk a találmány szerinti megoldást az elmélethez kötni, úgy tűnik, ez azt jelzi, hogy az ízületi makrofágok által termelt OSM készítheti RA-ban a vaszkuláris endotheliumot a leukocita-toborzásra a P-szelektin és az E-szelektin serkentő szabályozása („upregulation”) útján. Az a felismerés,



hogy az L-szelektin kötése akár specifikus antitesttel, akár fukoidánnal (L-szelektin-antagonista) a mononukleáris sejteket OSM szekréciójára készíti, nagy jelentőségű lehet a gyulladásos válaszreakció erősítése szempontjából, az OSM lokális forrásának további biztosításával a TNF α , P-szelektin és E-szelektin serkentése céljából.

Azonosították azokat az aminosavakat, amelyek fontosak az OSM és a gp130 kölcsönhatásában. Az OSM publikált aminosav-szekvenciája alapján [Mali és mtsai., Mol. Cell. Biol. 9(7):2847-53 (1989); az M27288-as DNS-bejegyzés az EMBL-adatbázisban, a P13725-ös fehérjeszekvencia-bejegyzés a *Swissprot*-ban] ezek az aminosavak: a G120, a Q16 és az N123, és az N124 szintén szerepet játszhat (lásd a 12. azonosítószámú aminosav-szekvenciát és az alábbi szekvenciát). Az első 25 aminosav szignálpeptidet alkot, és az érett fehérje az AAIGS-szekvenciánál kezdődik (13. azonosítószámú szekvencia, ezentúl a. sz.). Ezt a szekvenciát az érett fehérje első aminosavától kezdve számozzuk, amint azt bemutatjuk.

12. azonosítószámú szekvencia

	1	5	15	25	35
MGVLLTQRTL	LSLVLALLFP	SMASMAAIGS	CSKEYRVLLG	QLQKQTDLMQ	DTSRLLDPYI
45	55	65	75	85	95
RIQGLDVPKL	REHCRERPGA	FPSEETLRGL	GRRGFLQTLN	ATLGCVLHRL	ADLEQRLPKA
105	115	125	135	145	155
QDLERSGLNI	EDLEKLQMAR	PNILGLRNNI	QCMAQLLDNS	DTAEPTKAGR	GASQPPTPTP
165	175	185	195	205	215
ASDAFQRKLE	GCRFLHGYHR	FMHSVGRVFS	KWGESPNSRSR	RHSPHQALRK	GVRRTSPSRK
225	227				
GKRLMTRGQL	PR				

Így továbbá a találmány tárgyát képezi olyan antagónista vagy hatóanyag, amely rendelkezik e specifikus aminosavak közül az egyikkel vagy többel való kölcsönhatás képességével, és/vagy az ezek segítségével meghatározható kötéshelyekkel való kölcsönhatás képességével, és amely az OSM biológiai aktivitásának megváltoztatására szolgál.

A találmány szerinti megoldásban kezelhető gyulladásos arthropathia-k többek között a rheumatoid arthritis, a psoriasis arthritisa, a gyulladásos osteoarthritis és/vagy a reaktív arthritis. A találmány szerinti megoldásban kezelhető gyulladásos rendellenességek többek között, a Crohn-betegség, a colitis ulcerosa, a gastritisek, többek között a *H. pylori* fertőzése által okozott gastritis, az asztma, a krónikus, obstruktív tüdőbetegség, az Alzheimer-betegség, a sclerosis multiplex és a psoriasis.

Az OSM lehetséges antagonistái, többek között, az OSM-mel specifikus kölcsönhatást kialakító kisméretű szerves molekulák, ionok, például szubsztrát, lehetőleg természetes szubsztrát, sejtmembránalkotó, receptor vagy természetes ligandum, ezek fragmense vagy peptid vagy más fehérjeszerű molekula, előnyösen az OSM szignalizációra nem képes mutáns alakja, amely blokkolja az OSM OSM-receptorhoz való kötődését, valamint módosított OSM-molekulák. Az ilyen antagonisták lehetnek a fehérjét vagy peptidet kódoló DNS formájában és szolgálhatnak az antagónista *in vivo* expressziójára. Az antagonisták lehetnek az ilyen fehérje- vagy peptidmolekulákat, vagy DNS-t tartalmazó vakcinák, amelyek az OSM-re irányuló antagónista hatást keltenek a



nativ OSM-et célzó *in vivo* antitestválasz indukálásával. Az ilyen antagonisták lehetnek többek között antitestek, antitest-eredetű reagensek vagy kiméramolekulák. Az antagonista definíciója magában foglalja bármely, fent ismertetett molekula szerkezeti vagy funkcionális analógját vagy mimetikumát. Az olyan nukleinsav-molekulákat, mint a DNS vagy RNS-aptamerek, szintén ide soroljuk.

Előnyös antagonisták többek között a kisméretű szerves molekulák. Az ilyen vegyületek tartozhatnak bármely vegyületcsoportba, azonban az OSM biológiai aktivitására gyakorolt, a fentiekben ismertetett mechanizmusok szerinti hatás alapján kerülnek kiválasztásra, és fiziológiailag elfogadhatónak kell lenniük, azaz nem lehetnek toxikusak; vagy elfogadható szintű toxicitással, vagy más mellékhatásokkal rendelkeznek. Az alkalmas antagonistákat biztosító egyik vegyületcsoport lehet a ribonukleozidok csoportja, mint például az N-(1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-il)benzamid [Davoll és Kerridge, J. Chem. Soc. 2589 (1961)].

Más, előnyös antagonisták többek között az antitestek, ezek fragmensei, vagy az antitesteket vagy fragmenseiket tartalmazó mesterséges konstrukciók, vagy az antitestek vagy fragmenseik kötésének utánzása céljából tervezett mesterséges konstrukciók. Ilyen konstrukciók részletes leírását közli Dougall [Dougall és mtsai., Tibtech. 12: 372-379 (1994)].

Az antitest definíciója magában foglalja a rekombináns antitesteket, például rekombináns, humán eredetű antitesteket, amelyek szintén alkalmazhatóak. Az antitesteket

módosíthatjuk, azaz ezek lehetnek „kiméra” antitestek, amelyek egy donorantitest variábilis doménjait és egy humán eredetű antitest konstans doménját tartalmazzák [amint WO86/01533. sz. nemzetközi közzétételi iratban van leírva], vagy lehetnek „humanizált” antitestek, amelyek esetében csak a CDR-ek származnak más fajból, mint az antitest variábilis doménjének vázszekvenciája [az EPA-0239400. sz. európai közzétételi iratban van feltárva]. A komplementaritást meghatározó régiók („complementarity determining region”, CDR) származhatnak rágcsálóeredetű vagy főemlős-eredetű (primate) monoklonális antitestből. A megváltoztatott antitest variábilis doménjeinek vázszekvenciája és konstans doménjai rendszerint humán eredetű antitestből származnak. Egy ilyen humanizált antitest nem válthat ki olyan nagymértékű immunválaszt embernek történő beadáskor, mint egy teljesen idegen antigén, például egy rágcsálóból származó antigén beadása.

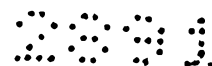
Előnyös antagonisták többek között a komplett antitestek, az $F(ab')_2$ -fragmensek, az Fab-fragmensek, az Fv-fragmensek, az ScFv-fragmensek, más fragmensek, CDR-peptidek és mimetikumaik. Ezek a szakember által kinyerhetőek vagy előállíthatóak. Például enzimes emésztést alkalmazhatunk $F(ab')_2$ -fragmensek és Fab-fragmensek előállítására (IgG-molekula pepszinnel vagy papainnal történő hasításával). Az „antitest” kifejezés az alábbi leírásban magában foglal minden, fent említett lehetőséget.



Amint az a szakember számára nyilvánvaló, alkalmazhatóak az antagonisták származékai is ott, ahol specifikus fehérje- vagy peptidantagonista leírását adjuk meg. A „származék” kifejezés magában foglalja a leírt antagonista olyan változatait, amelyek az antagonistához viszonyítva egy vagy több aminosavban szubsztituáltak, deletáltak vagy inszerciót tartalmaznak, azonban rendelkeznek a leírt kötési aktivitással. Előnyösen az ilyen származékok aminosav-szekvenciája alapvetően azonos a megadott antagonista aminosav-szekvenciájával.

Az aminosavszekvencia-azonosság mértéke kiszámítható olyan programok alkalmazásával, mint pl. a *bestfit* [Smith és Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 482-489 (1981)], amellyel bármely két szekvencia közötti hasonlóság legjobb szegmense megkereshető. Az illesztés végrehajtható az aminosavak-hasonlóságok mátrixa, például a Schwarz és Dayhof [Schwarz és Dayhof, *Atlas of Protein Sequence and Structure*, szerk.: Dayhof, M.O. 353-358 (1979)] által leírt eljárás alkalmazásával kapott pontok maximalizálását alapul véve.

Előnyösen a szekvenciaazonosság mértéke legalább 50%, előnyösebben legalább 75%. A szekvenciaazonosság a legelőnyösebben legalább 90% vagy legalább 95%. Mindazonáltal a szakember számára nyilvánvaló, hogy nagymértékű szekvencia-azonosság nem szükségszerűen követelmény, mivel számos aminosav gyakran helyettesíthető más, hasonló tulajdonságokkal rendelkező aminosavakkal, anélkül, hogy jelentős mértékben megváltoztatnánk vagy kedvezőtlenül befolyásolnánk egy fe-



hérje bizonyos tulajdonságait. Ezeket időnként „konzervatív” aminosavcsereként említjük. Így a glicin, valin, leucin vagy izoleucin aminosavakat gyakran helyettesíthetjük egymással, és ugyanígy helyettesíthetők egymással a következők: a fenilalanin, tirozin és triptofán (aromás oldallánccal rendelkező aminosavak); lizin, arginin és hisztidin (bázikus oldallánccal rendelkező aminosavak); aszparaginsav és glutaminsav (savas oldallánccal rendelkező aminosavak); aszparagin és glutamin (amid-oldallánccal rendelkező aminosavak); cisztein és metionin (kéntartalmú oldallánccal rendelkező aminosavak). Így a „származék” kifejezés alatt érthetünk olyan aminosavszekvencia-változatot, amely az adott szekvenciához viszonyítva egy vagy több ilyen „konzervatív” változtatást tartalmaz.

A találmány tárgyát képezik a találmány tárgyát képező antagonisták olyan fragmensei vagy származékai, amelyek még rendelkeznek az leírt kötési aktivitással. Az előnyös fragmensek legalább tíz aminosav hosszúak, de lehetnek hosszabbak (például legfeljebb 50 vagy 100 aminosav hosszúságúak). Az OSM találmány szerinti megoldásban alkalmazható további, előnyös antagonistái oligonukleotid-ligandumok. A „ligandumok szisztematikus kifejlesztése exponenciális dúsítással” („systematic evolution of ligands by exponential enrichment”, SELEX) egy olyan eljárás, amellyel egyes szálú oligonukleotidok óriási méretű könyvtárai szkrínélhetőek egy célfehérjére vagy más célmolekulára irányuló, kivánt aktivitásra nézve [Tuerk és Gold, *Science* 249:505-510 (1990); Green és mtsai., *Meths. Enzymol.* 2 (75-86 (1991);



Gold és mtsai., *Annu. Rev. Biochem.* 64:763-797 (1995); Uphof és mtsai., *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6: 281-288 (1996)]. A szkrinelés terméke egy egyes szálú oligonukleotid-szekvencia, amelyet aptamernek neveznek, és a célfehérje szempontjából rendelkezik a kívánt aktivitással, rendszerint nagy kötési affinitással. A *SELEX*-eljárást rendszerint mintegy 10^{14} - 10^{15} *random* oligonukleotid-szekvenciát tartalmazó RNS-könyvtárral vagy DNS-könyvtárral indítják. Egy teljesen *randomizált* oligonukleotid-könyvtár esetében minden molekula egy egyedi harmadlagos szerkezetet képvisel, amely teljes mértékben a molekula nukleotid-szekvenciájától függ. Így célfehérjére szkrinelve az oligonukleotid kötési affinitását az adott fehérje esetében az oligonukleotid és a célfehérje epitópjainak alakja közötti illeszkedés határozza meg. Annak következtében, hogy óriási méretű és nagy változatosságú könyvtárból indulnak ki, rendszerint lehetséges a célfehérjéhez nM-nál kisebb affinitással rendelkező, a célfehérjére más fehérjékhez viszonyítva szelektív, általános szerkezeti homológiájú aptamerek azonosítása [Tuerk és Gold (1990, lásd fentebb); Green és mtsai. (1991, lásd fentebb); Gold és mtsai. (1995, lásd fentebb); Uphof és mtsai. (1996, lásd fentebb)]. A *SELEX*-eljárás alkalmazásával több, mint 100 fehérjéhez és kis molekulához fejlesztettek ki aptamereket, többek között a dopaminhoz [Mannironi és mtsai., *Biochemistry* 36:9726-9734 (1997)], a P-szubsztanciához [Nieuwlandt és mtsai., *Biochemistry* 34: 5651-5659 (1995)], a humán eredetű neutrofil elasztázhoz [Bless és mtsai., *Current Biol.* 7:



877-880 (1997)], a trombocita eredetű növekedési hormonhoz („platelet derived growth factor”, PDGF) [Green és mtsai., *Biochemistry* 35: 14413-14424 (1996)], a vaszkuláris endotheliális növekedési faktorhoz (VEGF) [Green és mtsai., *Chem. Biol.* 2: 683-695 (1995)], a trombinhoz [Bock és mtsai., *Nature* 355: 564-66 (1992) és az L-szelektinhez [O’Connell és mtsai., *PNAS USA* 93: 5883-5887 (1996)].

Számos aptamerről kimutatták, hogy biológiai aktivitással, rendszerint receptor-antagonizmussal vagy enzim-inhibitoros tulajdonságokkal rendelkeznek, *in vitro* és *in vivo* egyaránt. Például a humán eredetű neutrofil elasztáz (hNE) elleni nagy affinitású és inhibitoros aktivitású aptamert fejlesztettek ki vegyes *SELEX* alkalmazásával [Bless és mtsai., lásd fentebb, (1997)]. Az *in vivo* stabilitást növelését szolgáló módosítást követően az aptamert a tüdőgyulladás patkánymodelljében tesztelték [Bless és mtsai., lásd fentebb (1997)]. Egy másik, példaértékű esetben egy 49 nukleotid hosszúságú, a fehérje iránt nM-os affinitást mutató DNS-aptamert fejlesztettek ki a humán eredetű L-szelektin ellen [O’Connell, lásd fentebb (1996)] Az aptamer 600-szoros szelektivitású az L-szelektin iránt, az E-szelektinhez viszonyítva, és 10 000-szeres szelektivitású az L-szelektin iránt a P-szelektinhez viszonyítva. Az aptamer PEG-ben formulázott intravénás injekciója dóziszfüggő módon gátolta a radioaktív jelzéssel ellátott humán eredetű PBMC-k nyirokcsomókba történő vándorlását, de más szervekbe történő vándorlását nem [Hicke és mtsai., *J. Clin. Invest.* 98: 2688-2692 (1996)]. Egy harmadik példa



esetében nagy affinitású RNS-aptamereket fejlesztettek ki humán eredetű VEGF ellen a VEGF angiogenezisben betöltött szerepének tanulmányozása céljából [Jellinek és mtsai., *Biochemistry* 33: 10450-10456 (1994); Green és mtsai. (1995); Ruckman és mtsai., *J. Biol. Chem.* 273: 20556-20567 (1998); Willis és mtsai., *Bioconjug. Chem.* 9: 573-582 (1998)]. A VEGF-aptamer egy liposzómális formulája gátolja a VEGF által indukált endothelsejt-proliferációt *in vitro* és a vezikuláris permeabilitás növekedését és az angiogenezist *in vivo* [Willis és mtsai. lásd fentebb (1998)]. Így a találmány tárgyát képezi az OSM vagy az OSM-receptor (OSMR, LIFR, gp130) találmány szerinti alkalmazás célját szolgáló oligonukleotid-liganduma.

A találmány szerinti alkalmazás céljait szolgáló aptamer kifejlesztése céljából az OSM-et vagy egy receptort szkríneléshez lemezekre kell kikötnünk. A humán eredetű OSM elleni RNS- vagy DNS-aptamerek kifejlesztése céljából a szelekció és amplifikáció iteratív lépéseit (azaz a *SELEX*-eljárást) megvalósíthatjuk Fitzwater és Polisky [Fitzwater és Polisky, *Meths in Enzymol.* 267: 275-301] eljárásának megfelelően. Jellemző módon ezek az aptamerek módosított RNS-aptamerek, mivel az RNS biztosítja a legnagyobb szerkezeti diverzitást és ezáltal a nagy affinitású molekulák lehetőségét. Nagy affinitású aptamer kifejlesztése után számos, *SELEX*-eljárást követő optimalizációs eljárást hajthattunk végre az aptamer stabilitásának növelése céljából; az aptamer csonkolásával „magszekvencia” eléréséig (az aptamer jellemzően 100 tagú vagy rövidebb), amely alkalmasabb szí-



lárd fázisú szintézisre (így csökkenthető a szintézis költsége); és az *in vivo* formulák kialakítása céljából.

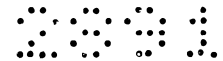
Az első eljárási lépésben az aptamert csonkolhatjuk a molekula lerövidítése céljából, az aktivitáshoz szükséges „magszekvencia” eléréséig. A rövid, gyakran 20 és 40 nukleotid hosszúságú magszekvencia szintézise olcsóbb és gyorsabb, és a biológiai hozzáférhetősége nagyobb. A magszekvencia összetételére vonatkozó információkat szekven-ciahomológia-összehasonlításokból kaphatjuk. A csonkolási kísérletek azonban rendszerint magukban foglalják fokozato-san rövidülő aptamerek szintézisét, addig, míg az aktivi-táshoz szükséges minimális szekvenciát előállítjuk. Ez rendszerint a nem változó („fixed”) szekvencia eltávolítá-sával jár, azonban számos példa van arra, hogy a nem válto-zó szekvencián belüli nukleotidok hozzájárulnak az aptamer affinitásához [Fitzwater és Polisky, lásd fent (1996) Ruckman, J. és mtsai., *J Biol. Chem.* 273: 20556-20567 (1998); Green és mtsai., lásd fentebb (1995)]. Ezért a ta-lálmány tárgyát képezi az olyan aptamerek, amelyek a kivá-lasztott aptamer csonkolt vagy kiterjesztett változatai, vagy egy olyan változata, amely több, mint 70%-os homológiát mutat egy kiválasztott aptamerrel.

A csonkolást követően számos módosítási alapkísérle-tet hajthatunk végre az aptamer stabilitásának javítására, ribonukleáz által történő hasítás elleni védelem kialakítá-sával. A *SELEX*-eljárás során nem lehetséges 2'-módosított purinbázisok beépítése, mivel az *in vitro* transzkripció so-rán alkalmazott T7-polimerázok nem tűrik ezt a módosítást.



Így a *SELEX*-eljárás utáni aptamerstabilitás-növelés céljából az aptamer purinbázisait rendszerint 2'-módosított purinbázisokkal helyettesítik. E módosítást rendszerint 2'-metil-purinok alkalmazásával hajtják végre, azonban más, módosított purinokat, többek között 2'-amino-purinokat vagy 2'-fluoro-purinokat is alkalmazhatunk [Ruckman és mtsai., lásd fentebb (1998); Green és mtsai., lásd fentebb (1995)]. Ezt fokozatosan kell végrehajtani, mivel ez a *SELEX*-eljárás utáni módosítás szintén az affinitásvesztést eredményezhet [Green és mtsai., lásd fentebb (1995)].

A csonkolás és stabilizálás után lehetséges nagyon nagy mennyiségű, rövid, teljes mértékben módosított aptamer előállítás, kémiai, szilárd fázisú szintézis alkalmazásával. Sok molekulát adhatunk az aptamer 5'-végéhez abból a célból, hogy lehetővé tegyünk az aptamer alkalmazását *in vivo* alkalmazásokra történő formulázás céljaira. Ez lehet, többek között, a képi megjelenítést elősegítő „kalitkába zárt” („caged”) molekularész [Hnatowich, D.J., Q. J. Nucl. Med. 40: 202-8 (1996)], fluoreszcein, a molekuláris detektálás elősegítésére [German és mtsai., Anal. Chem. 70: 4540-5 (1998)], egy lipidcsoport liposzómába történő beépítés céljaira [Willis és mtsai., lásd fentebb (1998)], vagy egy kismolekulájú hatóanyaggal vagy peptiddel képzett konjugátum [Charlton, J. és mtsai., Biochemistry 36: 3018-3026 (1997b)]. Általában egy molekula hozzáadása egy aptamer 5'-végéhez nem eredményez az affinitásvesztést vagy a specificitás elvesztését.



Az *in vivo* féléletidő javítása céljából aptamereket módosítottak polietilén-glikol (PEG) hozzáadásával vagy liposzómákba történő beépítéssel. Az ilyen módosítás mindkét esetben az *in vivo* féléletidő jelentős mértékű növekedését okozhatja [Willia és mtsai., lásd fentebb (1998)].

A liposzómális formulázáson kívül az aptamereket formulázták 20K-os, és 40K-os PEG-gel is az *in vivo* szérumbstabilitás növelése céljából. DNS-aptamert fejlesztettek ki a humán eredetű L-szelektin ellen. Az *in vivo* stabilitás növelése céljából 20K-os PEG-észtert kapcsolnak az aptamerhez az N-terminális aminrészen keresztül. A PEG-gel konjugált aptamerről kimutatták, hogy blokkolja az L-szelektin-függő *in vivo* limfocitavándorlást SCID-egerekben [Hicke és mtsai, lásd fentebb (1996)]. Így ezáltal a találmány tárgyát képezi a találmány szerinti megoldásban alkalmazható aptamer-molekula hordozóval, például PEG-gel képzett konjugátuma. A találmány ilyen megvalósítása esetében az aptamert és a hordozót például az N-terminális aminrészen keresztül kapcsoljuk össze. Ráadásul a találmány tárgyát képezi a találmány szerinti megoldásban alkalmazható, aptamert és hordozómolekulát, például liposzómát tartalmazó formula vagy készítmény. A találmány ilyen előnyös megvalósítása szerint az aptamer és a hordozó között nem lehet kapcsolat; az aptamer lehet egyszerűen kapszulázva, diszpergálva vagy elosztatva közvetlenül a hordozóban.

Az izolált aptamerek lehetnek módosítva diagnosztikai molekulákként, a humán OSM jelenlétének szérumban, szövetekben vagy más *ex vivo* mintákban történő detektálása cél-



jából, vagy a humán OSM jelenlétének kimutatására a teljes emberi test *in vivo* képkalkotási vizsgálataiban [Charlton, J. és mtsai., *Chemistry and Biology* 4: 809-816 (1997); Hnatowich, lásd fentebb (1996)]. Fluoreszcenciát, vagy más, fluoreszcens detektálás célját szolgáló csoportot adhatunk az aptamermolekula 5'-végéhez a fluoreszcens detektálás elősegítése az olyan alkalmazások céljából, mint például a FACS („Fluorescence Activated Cell Sorting”, fluoreszcencia-aktivált sejtválogató) [Davis, K.A. és mtsai., *Nuc. Acids Res.* 24: 702-6 (1996); Charlton és mtsai., lásd fent (1997)], az ELONA mérési eljárások („Enzyme Linked Oligonucleotide Assays”, enzimhez kötött oligonukleotid mérési eljárás) [Drolet, D.W. és mtsai., *Nature Biotech.* 14: 1021-1025 (1996)] és más diagnosztikai alkalmazások. A technécium-99m (Tc^{99m}) kelátképző „peptidkalitkák” („cage”), mint például a MAG3 [Fritzberg, A.R. és mtsai., *J. Nucl. Med.* 27: 111-6 (1986)] megjelenése nagyban hozzájárult ahhoz, hogy lehetővé vált molekulák [Kubo, A. és mtsai., *Kaku Igaku* 35: 909-28 (1998)] és makromolekulák [Taillefer, R. és mtsai., *Eur. J. Nucl. Med.* 22: 453-64 (1995)] széles választékának alkalmazása a célfehérje *in vivo* jelenlétének megjelenítése [Palella, V.R. és mtsai., *Nucl. Med.* 40: 352-60 (1999)]. A képeket γ -kamera segítségével vizualizálják, és az eljárást a fajok széles választéka esetében megvalósították, az egértől az emberig. A Tc^{99m} -kelátképzők újabb módosításai lehetővé teszik molekulák hatékonyabb és stabilabb jelölését, enyhe körülmények között [Hnatowich, D.J. *Nucl. Med.* 39: 56-64 (1998)]. Ki-



fejlesztettek egyszálú, radioizotóppal jelölt oligonukleotidokat alkalmazó eljárásokat, az ilyen, nem módosított jelölt oligonukleotidok sorsát előzetesen *in vivo* tanulmányozták [Hnatowich, lásd fent (1996)].

Természetesen a találmány szerinti bármely peptid-, fehérje- vagy nukleinsav-alapú antagonistát előnyösen tisztított formában van, azaz mentes az olyan anyagoktól, amelyek a természetes állapotában vagy az előállítás eredményeként vele asszociálódnak, közelebbről tisztasága nagyobb, mint 70%, de előnyösen a 80%-nál vagy 90%-nál nagyobb tisztaságú.

A találmány szerinti antagonistát alkalmazható önmagában vagy immunszuppresszív hatóanyagokkal kombinálva, mint például szteroidokkal (prednizolon, stb.), ciklofoszfamidokkal, ciklosporin-A-val, vagy purinanalóggal (például metotrexáttal, 6-merkaptopurinnal, vagy ilyenekkel), vagy antitestekkel, mint például antilimfocita-antitesttel, vagy előnyösebben egy toleranciát indukáló, anti-autoimmun vagy gyulladáscsökkentő hatóanyaggal, mint például egy CD4+T-sejtet gátló hatóanyag, például egy anti-CD4-ellenanyaggal (előnyösen egy blokkoló vagy nem depletáló antitest), egy anti-CD23 ellenanyaggal, TNF-antagonistával, például anti-TNF antitesttel vagy TNF-inhibitorral, például oldható TNF-inhibitorral, vagy az NSAID-khez hasonló hatóanyagokkal, vagy más citokininhibitorral.

A találmány szerinti antagonistát megfelelő adagolása olyan faktoroktól függ, mint a kezelendő betegség vagy rendellenesség, a beadás módja, az egyén kora és súlya, és



az antagonista természete. Anélkül, hogy állást foglalnánk bármely konkrét dózis mellett, feltételezzük, hogy például parenterális beadás esetében a találmány szerinti antitest (vagy más nagy molekula) napi dózisa 0.01-20 mg/kg (rendszerint egy gyógyászati készítmény részeként, a fentiek szerint) alkalmas lehet egy felnőtt tipikus kezelésekor. Az alkalmas dózisegység 1-400 mg lehet. Kisméretű, szerves molekulák dózisa hasonló lehet, és oligonukleotid-ligandumok alkalmas dózisa lehet például 0.1-100 mg/kg.

A találmány tárgyát képezi továbbá gyógyászati készítmény, amely gyógyászatilag elfogadható hordozót vagy hígítót, és aktív összetevőként a találmány szerinti antagonistát, és kívánt esetben más terápiás hatóanyagot tartalmaz, a fentiek szerint. A találmány szerinti antagonisták és gyógyászati készítményeik különösen alkalmasak parenterális beadásra, például szubkután, intramuszkuláris vagy intravénás beadásra, de az antagonista természetétől függően a beadás más módjai, mint például az orális, inhalálással történő, intranazális, topikális, intraartikuláris beadás megfelelőbb lehet.

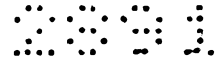
A parenterális beadás céljait szolgáló készítmény általában tartalmazza az antagonista oldatát, vagy egy elfogadható hordozóban, előnyösen egy vizes hordozóban oldott „koktélját”. Az vizes hordozók bő választéka alkalmazható, például víz, pufferolt víz, 0.4% só, 0.3% glicin és ehhez hasonlóak. Az oldatok sterilek és általában szemcsés anyagtól mentesek. Ezek a készítmények sterilizálhatók hagyományos, közismert sterilizáló eljárások alkalmazásával. A ké-



szítmények tartalmazhatnak gyógyászatilag elfogadható segédanyagokat, amelyek a fiziológiai körülmények megközelítéséhez szükségesek, mint például pH-állító és pufferoló hatóanyagok, toxicitást állító hatóanyagok és ehhez hasonlók, például nátrium-acetát, nátrium-klorid, kálium-klorid, kalcium-klorid, nátrium-laktát, stb. Az antitest vagy más antagonisták koncentrációja ezekben a formulákban széles határok között változhat, például kevesebb, mint körülbelül 0.5%, rendszerint 1% vagy legalább 1%, egészen 15%-ig vagy 20%-ig (w/w) és elsődlegesen a folyadéktérfogat, a viszkozitások, stb. alapján határozzuk meg, a konkrét, kiválasztott beadási módtól függően.

Így egy tipikus, intramuszkuláris injekció célját szolgáló gyógyászati készítmény összeállítása lehet 1 ml steril, pufferolt víz és 50 mg antagonisták. Egy intravénás infúzió céljait szolgáló készítmény tartalmazhat 250 ml steril Ringer-oldatot, 150 mg, a találmány tárgyát képező antitestet vagy más antagonistát. A parenterálisan beadható készítmények aktuális eljárásai ismertek, vagy nyilvánvalóak a szakterületen jártas szakember előtt, és részletesebb leírásuk megtalálható például Remington kiadványában [Remington's Pharmaceutical Science, 15. kiadás, kiad.: Mack Publishing Company, Easton Pennsylvania (1980)]. A nukleinsav-antagonisták formulázására alkalmas eljárásokat fentebb ismertettük.

A találmány tárgyát képező fehérjeantagonistákat, mint például az antitesteket tárolás céljára liofilizálhatjuk és alkalmazás előtt rekonstituálhatjuk egy alkalmas



hordozóban. Ez az eljárás hatékonynak bizonyult hagyományos immunglobulinok esetében. Bármely liofilizálási és rekonstituálási eljárást alkalmazhatjuk. A szakember számára nyilvánvaló, hogy a liofilizálás és a rekonstituálás az antitest aktivitásának különböző mértékű veszteségéhez vezethet (például hagyományos immunglobulinok esetében az IgM-antitestek az IgG-antitestekhez viszonyítva nagyobb mértékű aktivitásvesztésre hajlamosak) és az alkalmazási szinteket a kompenzációhoz kell beállítanunk.

A készítmény egyszeri vagy többszöri beadását végrehajthatjuk a kezelőorvos által kiválasztott dózisszintek és dóziselosztás szerint. Bármely esetben a gyógyászati készítményeknek a találmány szerinti antitestek vagy más antagonisták olyan mennyiségét kell biztosítaniuk, amely elegendő a beteg hatékony kezeléséhez.

A találmány oltalmi körébe tartozik olyan vizsgálati eljárás, amely annak megállapítására szolgál, hogy egy adott hatóanyag, amely kötést létesít az OSM-mel, alkalmas-e egy gyulladáisos betegség kezelésére. Így a találmány tárgyát képezi az OSM antagonistáinak azonosítására szolgáló eljárás, amely szerint az OSM-et és a teszt-hatóanyagot egyesítjük, és meghatározzuk, hogy a hatóanyag képes-e az OSM és az OSM-receptor közötti kölcsönhatás blokkolására vagy képes-e hatást gyakorolni az OSM biológiai aktivitására egy markermolekula differenciális expresszióján keresztül.



A találmány szerint alkalmazható antagonistá kiválasztásához, a fentiek szerint, az OSM-et, vagy az OSM kötésében kulcsszerepet játszó aminosavait (lásd fentebb) egy hordozóhoz kötve, vagy olyan módon kell előállítanunk, ahogy a kötőhelyek definiálva vannak („OSM-kötő molekularész”); vagy OSM-receptort kell előállítanunk. A humán eredetű OSM-et kódoló cDNS-t előállíthatjuk szintetikus úton, az *EMBL*-szekvencia alapján (katalógusszám: M17288), alkalmas expressziós eszközbe klónozva és megfelelő gazdasejtet, például rendszerint *E. coli*-t transzformálva. A humán eredetű OSM-fehérjét ezután a tápközegből tisztítjuk és szkríneléshez lemezekhez kötjük.

Az OSM-et, az OSM-kötő molekularészt és/vagy OSM-receptort alkalmazhatunk a kis molekulájú szubsztrátok és ligandumok kötésének megállapítására, például sejtekben, sejtmentes preparátumokban, kémiai könyvtárakban, és természetes termékek keverékeiben. Így a találmány tárgyát képezi az OSM antagonistájának azonosítására szolgáló mérési eljárás, amely szerint az OSM-et a teszt-hatóanyaggal érintkezésbe hozzuk és a kötést mérjük. A szubsztrátok és a ligandumok lehetnek természetes szubsztrátok és ligandumok, vagy szerkezeti, vagy funkcionális mimetikumok. Az ilyen molekulák is az OSM-antagonisták definíciójába foglaltatnak. A szkrínelési eljárás lehet nagy átbocsátási képességű. Például antagonistá szkrínelésékor szintetikus reakcióelegyet, celluláris kompartmentumot, mint például membránt, sejtburkot vagy sejtfalat, vagy ezek bármelyikének preparátumát előállíthatjuk az OSM-receptort expresszáló sejtből.



A preparátumot ezután jelzett OSM-mel inkubáljuk jelöltmolekula jelenlétében vagy anélkül. A jelöltmolekula OSM-receptorhoz való kötődésének képességét a jelzett OSM csökkenő mértékű kötése tükrözi. Valószínűleg azok a jó antagonistamolekulák, amelyek az OSM funkcionális hatásának indukálása nélkül kötődnek. Megvalósíthatjuk az eljárás fordítottját, és alkalmazhatunk jelzett OSM-receptort nem jelzett OSM-mel. *ELISA*-szkínélést alkalmazhatunk az OSM-antagonisták azonosítására, ahol a jelöltmolekulának azt a képességét mérjük, hogy OSM-receptorkonjugátum, például a gp130-Fc-fúziós fehérje lemezhez kötött OSM-hez való kötődését megakadályozza; ebben a mérési eljárásban a kötött gp130-Fc-t detektáljuk enzimmel jelzett antiFc antitest és kolorimetriás mérési eljárás alkalmazásával.

A potenciális antagonisták funkcionális hatásait mérhetjük például „riporter”-rendszer aktivitásának meghatározásával, a jelöltmolekula egy sejttel vagy megfelelő sejt-preparátummal való kölcsönhatását követően, és összehasonlíthatjuk az OSM hatásával vagy az OSM-en ugyanolyan hatást kiváltó molekulák hatásával. Az ebből a szempontból alkalmas „riporter”-rendszerek többek között, de nem kizárólag a kolorimetriásan jelölt szubsztrát átalakulása termékké, az OSM-receptor funkcionális aktivitásában bekövetkező változásokra fogékony „riporter”-gén, és a technikában ismert kötési mérési eljárások.

Az alábbiakban röviden ismertetjük az ábrákat:

1.a ábra: Az ízületi biopsziakultúrák *ex vivo* onkosztatin-M szekrécióját bemutató *ELISA*.

1.b ábra: Gyulladásos és nem gyulladásos synovialis tenyészetek spontán, *ex vivo* onkosztatin-M-szekréciója.

2. ábra: Az rhOSM hatása a TNF-alfa-termelésre a PMA által differenciált THP-1-sejtek esetében.

3.a és 3.b ábra: Az OSM és a TNF α szinergetikus hatása az *ex vivo* kollagénkibocsátás gyorsításában.

4.a ábra: Az anti-L-szelekciós antitest által közvetített OSM szekréció.

4.b ábra: A fukoidan által indukált OSM-szekréció.

5.a-5.d ábra: Az RA-vaszkuláris endothelium gp130P- és L-szelekciós antitest alkalmazásával történő festődését bemutató mikrofotók.

6. ábra: A kontroll-egerek és a CII-arthritises egerek ízületeinek OSM-mRNS-tartalma.

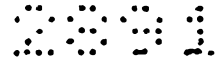
7. ábra: Kecse eredetű anti-OSM-mel vagy kontrollként kecske eredetű IgG-vel kezelt arthritis-DBA-1 egerek.

7.a ábra: klinikai pontszámok,

7.b ábra: lábvastagság.

8. ábra: Az ízületi beszűrődést és a porcronsolódást bemutató szövettani adatok kollagén által indukált arthritisben megbetegedett egereknél.

8.a és 8.b ábra: A kontroll-egerek ízületei kiterjedt PMN- és mononukleáris sejtinfiltrációt és az ízületi felszín kiterjedt neutrofil-infiltrációjával jellemezhető ronszolódását mutatja (8b).



8.c és 8.d ábra: A közepes/enyhe arthritis-es, anti-OSM-mel kezelt állatok reprezentatív ízületei, kifejezetten csökkent szintű celluláris infiltrációval és ép ízületi porccal.

9. ábra: A HepG2-B6 (sejtek) sPAP és MTS N-{1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4Y1)benzamidin}-mérések: az OSM által indukált sPAP koncentrációfüggő kibocsátását mutatják.

10. ábra: A TNF α -, az sPAP és az MTS N-{1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4Y1)benzamidin}-mérések: a TNF α által indukált, A549-es sejtekből történő sPAP-kibocsátás korlátozott gátlását mutatja be.

11. ábra: Az sPAP-termelés antitest-gátlása a HEPG2-B6-mérési eljárásban. M2-M4 négy egyedi egér szérumait jelenti; OM5-6.1, OM5-6.10, OM6-10.111 kísérleti eredetű hibridóma-felülűszókat jelöli.

12. ábra: A vad típusú és mutáns OSM-GST fúziós fehérje kompetíciója a lemezhez kötött, vad típusú OSM-mel a pgl30-Fc kötéséért egy *ELISA*-kísérletben.

13. ábra: A három mutáns OSM-GST OD-görbéi mutatják a legkisebb aktivitást a HepG2-sejteknél az sPAP-termelés kiváltásában.

Az alábbiakban a példák ismertetésével a találmány részletes leírását adjuk, a kísérő ábrákra hivatkozva.



1. példa

Az OSM detektálása ex vivo synovialis szövetkultúrákban

1. kísérlet:

Diagnosztizált rheumatoid arthritis-ben, osteoarthritis-ben vagy bűtyök létrejöttétől szenvedő betegek frissen kimetszett szöveteket steril, hipodermikus tűkkel mechanikusan felvágunk körülbelül 1 mm^3 fragmensekre. Ezeket lapos fenekű, $200 \text{ }\mu\text{l}$ -es űrtartalmú üregekkel ellátott, 96-lukú szövettenyésztő lemezre (Costar) helyeztük és 10% hőinaktivált, AB^+ férfitől származó szérummal (North London Blood Transfusion Centre), 10 mM Hepes-sel, 1% nátrium-piruváttal, 1% nem esszenciális aminosavakkal (mindegyik a Sigmától), 4 mM L-glutaminnal (Hyclone), 100 U/ml penicillinnel + $100 \text{ }\mu\text{g/ml}$ sztreptomocinnel (Hyclone) kiegészített RPMI 1640-et (Sigma) (komplett humán eredetű tápközeg, CHM) adtunk hozzá és 37°C -on inkubáltuk.

Üregenként $100 \text{ }\mu\text{l}$ tenyészet-felülúszót összegyűjtöttünk a 0., 2., 5. és 9. napon, -20°C -on megfagyasztottuk és ELISA-val OSM-re teszteltük (Quntikine R & D Systems). Az adatokat az 1.a ábrán mutatjuk be. Szekretált OSM-et detektáltunk az RA-betegekből származó synovium-mintában, de az OA-betegek és az arthritis-ben nem szenvedő, kontrollként alkalmazott betegekből származó synovium-mintákban nem. Az OSM-szintek az RA-tenyészetekben körülbelül az inkubáció 5. napján érték el maximális szintjüket, megközelítőleg 1400 pg/ml -es koncentrációval és 800 pg/ml -nél magasabban maradtak a 9. napon is.



2. kísérlet:

Az ízületi nedvből származó szövetet PBS-ben mostuk, és a zsírszövetet eltávolítottuk. A szövetet steril ollókkal kis fragmensekre (1-4 mm) vágtuk. A szövetet PBS-ben mostuk feldolgozás előtt. A szövet tömegét megmértük, és közvetlenül kilemeztük 24-üregű vagy 48-üregű lemezekre (Costar), 100 mg/üreg mennyiségben. A szövetet 37°C-on tenyésztettük 5% CO₂-ben, 1.5 ml módosított *Dulbecco Eagle*-tápközegben (Sigma), amely 10% hőinaktivált, AB+ humán eredetű szérummal (Sigma), 2 mM L-glutaminnal (Life Technologies), 200 U/ml penicillinnel és 200 µg/ml sztreptomocinnel (Life Technologies), 480 U/ml nystatinnal (Sigma), 50 µg/ml gentamicinnel (Life Technologies), és 10 mM Hepes-sel (Sigma) volt kiegészítve, és szűréssel volt sterilizálva. A 3. napon a felülúszókat eltávolítottuk és OSM-re teszteltük párosított („paired”) antitesteket alkalmazó (R&D Systems) *ELISA*-mérési eljárással.

Az RA-ban vagy a gyulladáshoz OA-ban szenvedő betegek-ből származó térdbiopszia-szövettenyészetek spontán módon szekretálnak OSM-et. 3 napos inkubációs periódust követően az RA-tenyészetek felülúszójának átlagos OSM-szintje 246 pg/ml (a 30-982 pg/ml-es tartományban, n=12) és az OA-tenyészetek felülúszóiban 473 pg/ml (a 44-2001 pg/ml-es tartományban, n=14). A gyulladáshoz ízületi szövet szekretált OSM-et, a nyugvó ízületi szövet azonban nem (1.b ábra).



2.a példa

a THP-1-sejtek differenciálódása

Humán eredetű, pro-monocitikus THP-1-sejteket (AECACC) hetenként kétszer passzáltunk (átoltottunk) 10% hőinaktivált FCS-sel, 10 mM HEPES-sel, 1% nem esszenciális aminosavakkal (a SIGMA-tól), 4 mM L-glutaminnal (Hyclone), 100 U/ml penicillinnel + 100 µg/ml sztreptomocinnel (Hyclone) kiegészített RPMI-ben (komplett tápközeg, CM) és ezután PMA-t adtunk (Sigma) a mosott sejtekhez 1 µg/ml koncentrációban, és 37°C-on 30 percig inkubáltuk. A sejteket háromszor mostuk előmelegített PBS-ben, CM-ben reszuszpendáltuk és kilemezeztük 96-üregű, lapos fenekű lemezekre (Costar) 1.5×10^5 sejt/ml koncentrációban. A lemezeket 48 órán át inkubáltuk 37°C-on 5% CO₂-ben, majd PBS-ben mostuk, a tápközeget pótoltuk, és további 24 órán át inkubáltuk. A sejteket egyszer mostuk PBS-ben feldolgozás előtt.

2.b példa

IFN γ által stimulált vér-monociták előállítása

Humán eredetű, álhártyás burkokat (buffy coat) (North London Transfusion Centre) 1:3 arányban hígítottunk PBS-sel, Lymphoprep-re rétegeztük (Nycomed UK), és centrifugáltuk (600 x g, 30 perc, szobahőmérséklet). Az összegyűjtött PBMC-eket 3-szor mostuk PBS-sel, számláltuk, majd 10 FCS-t tartalmazó, 80 ml RPMI 1640-ben 5×10^6 sejt/ml koncentrációban reszuszpendáltuk. Négy darab, 175 cm²-es edénybe 20 ml-nyi szuszpenziókat vittünk és egy éjszakán át 37°C-on inkubáltuk, a monociták kitapadása céljából. A nem kitapadó



sejteket eltávolítottuk; a kitapadó sejteket lekapartuk, miután jéghideg versenest adtunk hozzá, és 4°C-on inkubáltuk 15 percig. A sejteket kétszer mostuk PBS-ben, reszuszpendáltuk 10% humán eredetű, hőinaktivált szérummal kiegészített (Sigma) RPMI 1640-ben 6.9×10^5 /ml koncentrációban és 250 μ l sejtszuspenziót vittünk egy 96-üregű, lapos fenekű lemez minden üregébe (Costar). A lemez felén 100 IU/ml IFN γ -t (Genzyme) adtunk hozzá, a másik felét kontrollként alkalmaztuk. A lemezeket egy éjszakán át inkubáltuk 37°C-on, 5% CO $_2$ -ben, mielőtt a méréseket elvégeztünk.

2.c példa

A TNF α -kibocsátás stimulálása

Liofilizált, rekombináns, humán eredetű onkosztatin-M-et (rhOSM) (az R&D System-től) 10 μ g/ml-re hígítottuk steril, 0.1% BSA-t (Sigma) tartalmazó PBS-sel, és aliquot mennyiségekre szétosztva -20°C-on tároltuk felhasználásig. Az rhOSM-et, *E. coli*-eredetű LPS-t vagy CM-et adtunk triplikátumban a fentiek szerint előállított makrofágokhoz, monocitákhoz vagy Thp-1-sejtekhez, és inkubáltuk 7 órán át 37°C-on, 5% CO $_2$ -ben. A felülúszókat összegyűjtöttük, -20°C-ra fagyasztottuk a TNF α -fehérje ELISA-val történő meghatározásáig. A TNF α mRMS együttes meghatározására tervezett mérési eljárásban a sejteket a fentiek szerint 4 órán át inkubáltuk, egyszer mostuk PBS-ben és RNS-extrakciós pufferben (RNazole) lizáltuk.



Az RNS-t a következőképpen detektáltuk. Összes RNS-t állítottunk elő a gyártó utasításai szerint és -80°C -on tároltuk DEPC-vel kezelt vízben. RT-PCR céljaira megközelítőleg $1\ \mu\text{g}$ RNS-t reverz transzkripciónak vetettünk alá oligo-dT-láncindítás alkalmazásával (*first strand* cDNS-szintézis reagenskészlet, Pharmacia Biotech) és az eredményül kapott cDNS-sel 30-ciklusos PCR-t hajtottunk végre a következő, TNF α -ra tervezett láncindítók alkalmazásával (Clontech amplimers): 3': GAGTGACAAGCCTGTTGTAGCA (1. azonosítószámú, ezentúl 1. a. sz. szekvencia), 5': GCAATGATCCCAAAGTAGACCTGGCCCAGAC (2. a. sz.). Az amplifikált terméket (444 bp) agarózgél-elektroforézissel (2%) elválasztottuk és etídium-bromid festéssel tettük láthatóvá.

2.d példa

Az OSM indukálja a TNF α -termelést a monocitákból származó humán eredetű sejteknél

A humán eredetű, pro-monocitikus *Thp-1*-sejtvonal esetében PMA alkalmazásával differenciálódást indukáltunk; a sejteket alaposan mosásnak vetettük alá, és rekombináns, humán eredetű OSM-mel inkubáltuk a fentiek szerint. A tenyészet-felülűszókat 8 óra elteltével levettük, és TNF α -termelést mértünk specifikus ELISA (TNF Quantikine, R&D Systems) alkalmazásával, a gyártó utasításainak megfelelően. Az OSM dóziszfüggő, $1\ \text{ng/ml}$ OSM-felett mérhető TNF α -kibocsátást indukált, rendszerint nagyobb, mint $2500\ \text{pg/ml}$ TNF α -szekréciós szintet elérve. A fentiek szerint, RT-PCR-rel meghatározott TNF α -mRNS-expresszió erősen megnőtt a

100 ng/ml OSM-mel 4 órán át inkubált THP-1-sejtek esetében, a nem stimulált kontroll-sejtekhez viszonyítva (2. ábra).

Nagy jelentőséggel bír az, hogy a TNF α indukciója nem szennyező endotoxinnak tulajdonítható, mivel az OSM előzetes forralása teljesen megszüntette a TNF α -szekréción (az adatokat nem mutatjuk be). Az OSM specifikus antitestek alkalmazásával végrehajtott immunprecipitációja szintén megszüntette az aktivitást (az adatokat nem mutatjuk be). Ezeket a felismeréseket kiterjesztettük humán eredetű, IFN γ -val előaktivált vér-monocitákra, és tenyésztetben 7 napon át differenciáltatott humán eredetű vér-makrofágokra is. 8 órán át OSM-mel inkubálva mindkét sejttípus szekretált TNF α -t, az *ELISA*-mérések szerint. A monociták átlagos TNF α -szekréciónja 1447 pg/ml (a 137-4709 pg/ml-es tartományban, n=4 donor), és a makrofágok átlagos TNF α -szekréciónja 542 pg/ml (a 62-1428 pg/ml-es tartományban, n=3 donor) volt.

3.a példa

Ízületi degradáció vizsgálata

Marha eredetű orrsövényt 4°C-on tartottunk a vágás után. 2 mm átmérőjű korongokat vágtunk ki 2 mm-es szeletekből, és kétszer mostuk *HBSS*-ben. 24-üregű lemezen (Costar) üregenként két korongot 37°C-on, 5% CO₂-ben 24 órán át inkubáltuk 600 μ l térfogatú, 25 mM HEPES-t tartalmazó, 2 mM glutaminnal, 100 μ g/ml sztreptomocinnal, 100 U/ml penicillinnel és 2.5 μ g/ml amfotericin-B-vel kiegészített *DMEM*-ben (Sigma) (porcdegradálódási tápközeg, CDM). A porc-szövetet négy üregben tenyésztettük: 600 μ l CDM-ben, 2, 10

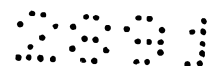


vagy 50 ng/ml koncentrációjú, humán eredetű, rekombináns TNF α -ban, 10 ng/ml rhOSM-ben (R&D Systems), vagy TNF α + OSM-ben, és 7 napon át inkubáltuk 37°C-on, 5% CO₂-ben. A felülúszókat összegyűjtöttük, és friss, azonos teszt-reagenseket tartalmazó tápközeggel pótoltuk 1 napra. A kísérletet további 7 napig folytattuk; a 14. napon minden tápközeget eltávolítottunk, és a maradék porcszövetet 4.5 mg/ml papainnal (Sigma) emésztettük 5 mM EDTA-t és 5mM cisztein-hidrokloridot tartalmazó 0.1 M foszfátpufferben (pH 6.5), 65°C-on 16 órán át, a porcfragmensek maradék hidroxiprolin-tartalmának meghatározása céljából. A 14. napig a tápközegbe kiáramló OH-prolin kumulatív szintjét a teljes, kiáramló anyag százalékában fejeztük ki, az alábbiak szerint.

3.b példa

Hidroxi-prolin mérési eljárás

A hidroxiprolin-kiáramlást (mint a kollagéndegradáció mértékét) Bergman eljárásának [Bergman, I. és Ioxley, R. Anal. Biochem. 35: 1961-1965 (1963)] mikrotiter-lemezre alkalmazott módosításával hajtottuk végre. Klóramin-T-t (7%, w/v) hígítottunk 1:4 arányban acetát-citrát pufferben (57 g nátrium-acetát, 37.5 g trinátrium-citrát, 5.5 g citromsav, 385 ml propán-2-ol 1 liter vízben). P-dimetilamino-benzaldehidet (DAB, 20 g 30 ml 60%-os perklórsavban) hígítottunk 1:3 arányban propán-2-olban. A mintákat 6 M HCl-ben 20 órán át 105°C-on hidrolizáltuk, és a hidrolizátumot *Savan Speed Vac* alkalmazásával, NaOH felett, vákuumban szárítva neutra-



lizáltuk. A maradékot vízben oldottuk, és 40 μ l mintát, vagy standardot (hidroxi-prolin; 5-30 μ g/ml) adtunk mikrotiter-lemezekhez klóramin-T-reagenssel együtt, majd 4 perc elteltével DAB-reagenst (150 μ l) adtunk hozzá. A lemezt ezután 65°C-ra melegítettük 35 percre, lehűtöttük, és az abszorbanciát 560 nm-en meghatároztuk.

3.c példa

Az OSM és a TNF α szinergizmusa az MMP1 és a porc kollagénkibocsátásának ex vivo serkentésben

Marhaeredetű, orrból származó porcot lemezeken tenyésztettünk 14 napon át OSM-mel vagy anélkül, vagy csak TNF α -val (mindkettő az R&D Systems-től), vagy ezek kombinációjával, a fenti leírás szerint. A tenyészetek felülúszóit teljes kollagenáz-aktivitásra teszteltük a 7. napon, és kibocsátott kollagénre a 14. napon. A 3.b ábra adatai bizonyítják, hogy a önmagában sem az OSM, és a TNF α sem (10 ng/ml, vagy 50 ng/ml koncentrációban alkalmazva) indukált jelentős mértékű MMP1-szekrúciót. Az OSM és a TNF α ilyen koncentrációban alkalmazott kombinációja azonban mérhető MMP1-szekrúciót indukált. Ez a felismerés az OSM-nek és a TNF α -nak a porc kollagénkibocsátásra gyakorolt meglepő, szinergikus hatásának felismerésével párosult. A 3.a ábra bemutatja, hogy az OSM önmagában 10 ng/ml-es koncentrációban nem indukált kollagénkibocsátást, míg a TNF α legnagyobb, alkalmazott koncentrációja (50 ng/ml) kismértékű, de kimutatható kollagénkibocsátást (10%-nál kisebb) indukált. 10 ng/ml OSM és 50 ng/ml (vagy akár 10 ng/ml) TNF α kombiná-



ciója nagyobb, mint 80%-os (és 30%-os) kollagénkibocsátást indukált.

4.a példa

A PBMC L-szelektin általi stimulálása

Mononukleáris sejteket izoláltunk humán eredetű állhártyás burkokból (buffy coat), a fentiek szerint. 5×10^5 sejtet 0.5 ml térfogatban kilemezelünk, és 24 órán át 37°C-on, 5% CO₂-ben inkubáltunk 60-80 kD molekulatömegű fukoidannal (Sigma), monoklonális anti-L-szelektin antitestekkel, (LAM1-3 és TQ1), vagy egy izotípus-azonos, kontroll-IgG-vel (a Coultertől). A felülúszókat egy specifikus ELISA-mérési eljárással (Quantikine R&D Systems) vizsgáltuk, a gyártó utasításai szerint.

4.b példa

Az L-szelektin lekötése OSM-szekréciót indukál

Egészséges donoroktól származó mononukleáris sejteket 24 órán át inkubáltunk a humán eredetű L-szelektin elleni antitesttel (TQ1-gyel, vagy akár LAM-1-gyel), vagy izotípus-azonos kontroll-antitesttel, és a tenyészet-felülúszókat ELISA-val OSM-re teszteltük. A kontroll-antitest minimális hatást mutatott. Ezután az L-szelektin-agonista fukidan OSM-indukálási képességét vizsgáltuk a mononukleáris sejkultúrában. A 4.b ábra bemutatja, hogy a fukoidan az OSM-szekréció hatékony stimulálója, hasonló szinteket indukálva, mint amelyek az RA és OA ízületi



biopsziakultúrákban mérhetőek (1. példa, 2. kísérlet, 1.b ábra).

5.a példa

Immunhisztokémia

Friss, humán eredetű szövetmintákat lefagyasztottunk CO₂-ben lehűtött cseppfolyós hexánban, és cseppfolyós N₂ gőzterében tároltuk feldolgozásig. 7 mm-es kriosztát-metszeteket vágunk 3-aminopropil-trietoxi-szilánnal (APES) [Maddox, P. és mtsai., J. Clin. Path. 40: 1256-1260 (1987)] burkolt üvegből készült tárgylemezekre, és 10 percig 4°C-on 2% para-formaldehidben fixáltuk. Az endogén peroxidáz-aktivitást 20 perces 0.05%-os H₂O₂-ben blokkoltuk. A nem konjugált, monoklonális, első antitesteket a következők szerint szereztük be: a CD62P: CLB, Hollandia; CD62E és gp130: R&D Systems, Egyesült Királyság. Az első antitesteket optimális hígításban 45 percig alkalmaztuk, szobahőmérsékleten. A negatív kontrollként szolgáló metszeteket monoklonális, anti-BrdU-antitestekkel (Sigma) inkubáltuk, és a teszt-antitestekkel egyenértékű fehérjekoncentrációban alkalmaztuk. Biotinilált második antitestet, majd ezt követően peroxidázzal jelölt ABC-t (Vector Elite) alkalmaztunk az első antitest jelölésére. A peroxidázt DAB-szubsztráttal (3,3'-diamino-benzidin, Sigma) hívtuk elő.



5.b példa

A szelektinek és az OSM-receptorok együttes előfordulása az RA-synoviumban

A fagyasztott, gyulladákos, RA metszeteket a gp130-ra, a P- és E-szelektinre specifikus antitestek alkalmazásával festettük. Az 5. ábra mikrofotóján bemutatjuk, hogy az RA-vaszkuláris endothelium erősen pozitívan festődik gp130-ra. Az RA-ízület P- és E-szelektin expressziójára való festődése a gp130-cal azonos festődési mintázatot mutat, a vaszkuláris endothelsejtekre korlátozódva (5b és c. ábrák). Megjegyezzük, hogy az 5c. ábrán a perivaszkuláris mononukleáris sejtinfiltráció összefügg az E-szelektin-festődéssel. A sorozatmetszetek kontrollként alkalmazott antitestekkel történő festése negatív eredményt adott a vaszkuláris endothelsejtek esetében (5. panelek, c és d).

6.a példa

A kollagén által indukált arthritis kezelése anti-OSM antitesttel

Az arthritis-t kollagénnel indukáltuk hímnemű, *DBA/1*-egereknél (8-12 hetesek) natív, marha eredetű, II. típusú kollagénnel (CII) történő immunizálással, a korábban leírtak szerint [Plater-zyberk, C. Clin. Exp. Immunol. 98: 442-7 (1994), és Plater-zyberk. Nature Medicine 1: 781-5 (1995)]. A CII-immunizálást követő 16. napon az egereken naponta megfigyeltük az ízületi pír és a duzzadás jeleit. A klinikai tünetek első megjelenésétől az egereket hetente háromszor vizsgáltuk, és mindegyik végtagot osztályoztuk a



betegség súlyossága szempontjából az alábbi, vizuális pontszámok alapján: 0 = normális állapot, 0.5 = az arthritis 2 vagy több ujjon, 1 = csekély mértékű duzzadás és a láb erithémája az ujjak érintettsége nélkül, 1.5 = ugyanaz, mint az 1-nél, az ujjak érintettségével, 2 = kifejezettebb duzzadás a láb erithémájával, az ujjak érintettsége nélkül, 2.5 = ugyanaz, mint a 2-nél, az ujjak érintettségével, 3 = súlyos duzzadás a mozgás gátoltsága mellett, 3.5 = ugyanaz, mint az 3-nál, az ujjak érintettségével. A láb vastagságát mérőkörző alkalmazásával mértük (*Proctest 2T*, Kroepelin Langenmesstechnik).

A CII-vel immunizált *DBA/1*-egereket a betegség klinikai megjelenése után 100 mg kecske eredetű, egér-OSM-elleni antitest i.p. injekcióival (R&D Systems, kat. szám: AF-495-NA) kezeltük. A betegség előrehaladását a fentiek szerint állapítottuk meg. A betegség fellépte utáni 14. napon az egereket a nyakcsigolya eltörésével feláldoztuk, és a lábakat hisztopatológiai vizsgálatok céljaira összegyűjtöttük.

6.b példa

Az arthritis-es egérizületek hisztológiai vizsgálata

A lábakat lenyúztuk (a bőrt eltávolítottuk), a térdeket és a lábfejeket levágtuk. Az ízületeket 10%-os, pufferolt formalinba fixáltuk 4 napon át (térdek) vagy 1 napon át (lábfejek), és 3 napon át mésztelenítettük 25%-os hangyasavban; szárítottuk és parafinviaszba ágyaztuk. Az ízületek nyíllirányú metszeteit (5-7 mm) viasztalanítottuk, *Safranin-O*-val festettük, és *fast green*/vas-hematoxillin



festékkel utánszíneztük [Plater-zyberk fenti, Nature medicine-ben megjelent cikke szerint]. A synovitist vakpróba elvei szerint pontoztuk 0-tól (nincs beszűrődés) 3-ig (extenzív infiltráció és synovialis hyperplasia). A Safranin-O-festődés intenzitáscsökkenésének mértékét, a porc proteoglikán-veszteségének mértékét egy 0-tól (teljes mértékben festett porc) 3-ig (teljes kimerülés és a porcvesztés) terjedő skálán pontoztuk.

6.c példa

Az OSM-mRNS detektálása a kollagén által indukált-arthrititis-es egerek ízületi szöveteiben

Arthritis-es egereket és kezeletlen kontroll-állatokat feláldoztunk, a lábfejeket és a lábakat levágtuk, és cseppfolyós nitrogénben lefagyasztottuk, majd -80°C -on tároltuk. RNS-t állítottunk elő úgy, hogy minden végtagot megőröltünk RN-azol-ban, ultraturrax mechanikus homogenizátorban. A darabos anyagot ülepitettük, és a felülúszót ezután 1/10 térfogatú kloroformmal összekevertük, és centrifugáltuk az RNS-t tartalmazó vizes fázis elválasztása céljából. Az RNS-t RNAmate (BioChain Institute Inc, San Leandro, California) alkalmazásával kicsaptuk a szennyező proteoglikánok eltávolítása céljából. A teljes RNS-t 75% etanolban mostuk, majd DEPC-vízben feloldottuk és reverz transzkripciónak vetettük alá a Pharmacia first strand cDNS reagenskészlete és oligo-dT-láncindítás alkalmazásával. A PCR-reakciót a következő, az egér eredetű OSM szekvenciájából [Yoshimura, A. és mtsai., OMBO Journal 15: 1055-1063 (1996)] származó láncin-



dítók (Life Technologies, rendelésre készült láncindító) alkalmazásával hajtottuk végre: GGGTGCCTACCAAGGAACA (3. asz. sz.), CTGAGACCTTTCAAGAGGAC (4. asz. sz.). 30 PCR-ciklus után a reakciótermékeket (379 bp) agarózgél-elektroforézis alkalmazásával detektáltuk. RT-PCR-t alkalmaztunk az OSM-mRNS arthritis-es egérlábakban történő detektálására, a fentiek szerint. A 6. ábrán bemutatjuk, hogy az OSM-re specifikus PCR-termékek mennyisége nagyobb a fokozottabban növekvő klinikaibetegség-pontokkal jellemzett egerekből származó ízületekben. Ezzel szemben a kontrollként alkalmazott állatokban nem detektáltunk mRNS-t.

6.d példa

Az OSM semlegesítése enyhíti a kollagén által indukált arthritis-t

A feltételezés (amely szerint a semlegesítés javíthat az arthritis klinikai tüneteinek) közvetlen tesztelése céljából a neutralizáló poliklonális antitestből két, 100 µg-os injekciót adtunk be *i.p.* egy 6 egérből álló csoport egyedeinek az 1. és 3. napon, a klinikai arthritis első megjelenésekor. Ezzel párhuzamosan egy másik, 6 egérből álló csoport arthritis-es egereit azonos módon kezeltünk, az anti-OSM helyett nem immunjellegű, kecske eredetű IgG-vel. Az egereket az arthritis klinikai súlyossága szempontjából pontoztuk, és az egyedi lábfejek duzzadásának mértékét a második antitest-injekciót követően 11 napon át nyomon követtük. A kontrollként alkalmazott, kecske eredetű IgG-vel



kezelt egerek esetében a lábfejek nagyobb mértékű duzzadásával kísért progresszív arthritis alakult ki.

Ezzel éles ellentétben áll az, hogy az OSM-elleni antitesttel kezelt egerek esetében a klinikai pontszámokban és a lábfejek duzzadásában kifejezve jelentősen kevésbé súlyos arthritis fejlődött ki (7.a és 7.b ábra). Az arthritis-es lábfejek száma az OSM-elleni antitesttel kezelt egerek esetében szintén csökkent a kontrollként alkalmazott IgG-vel kezelt állatokhoz viszonyítva, ezzel bizonyítva, hogy ez a terápiás előirat a már kifejlődött betegséggel jellemezhető egerek esetében hatásos volt a betegség további előrehaladásával szembeni védelemben (az adatokat nem mutatjuk be). Ezt a kísérletet megismételtük azonos módon, 7 egerből álló csoport alkalmazásával, és teljesen hasonló adatokat kaptunk (az adatokat nem mutatjuk be).

Azt, hogy az OSM-elleni antitesttel történő kezelés a klinikai súlyosság csökkenését eredményezi, megerősítettük az arthritis-es lábfejek *post mortem* elvégzett hisztológiai vizsgálatával, a betegség kezdete utáni 14. napon. A kollagén által indukált arthritis-ben megbetegedett, kontrollként alkalmazott IgG-vel vagy OSM-elleni antitesttel kezelt egerek esetében az ízületi infiltrációt és a porc roncsolódását összehasonlító hisztológiai adatokat a 8 ábrán mutatjuk be. A kontrollként alkalmazott IgG-vel kezelt egerek ízületei kiterjedt PMN-infiltrációt és mononukleárissejt-infiltrációt mutattak (8.a ábra). Ezzel ellentétben, a 8.c és 8.d ábra az OSM-elleni antitesttel kezelt állatok tipikus ízületeit mutatja be: minimális mértékű arthritis, ki-



fejezetten alacsonyabb szintű sejtinfiltrálódás, ép ízületi porc. Ráadásul az ízületeket pontoztuk a porc és a synovium hisztopatológiai épségének szempontjából vakpróba elvei szerint, és normálisnak, mérsékeltnek vagy súlyosnak nyilvánítottuk. Kezelési csoportonként összesen 73 egyedi ízületet bíráltunk el; az adatokat az 1. táblázatban foglaltuk össze. Az OSM-elleni antitesttel kezelt állatok esetében a vizsgált ízületek 47%-a volt normális vagy mutatott enyhe synovitis-t, a kontrollként alkalmazott IgG-vel kezelt csoportnál tapasztalt 6%-hoz viszonyítva. Ehhez hasonlóan, az OSM-elleni antitesttel kezelt egereknél a vizsgált ízületek 58%-a kis mértékű porcroncsolódást mutatott, vagy nem mutatott porcroncsolódást, a kontrollként alkalmazott IgG-vel kezelt csoport 21 %-os értékéhez viszonyítva. Az OSM-elleni antitesttel kezelt, az ízületi pír és duzzadás nyilvánvaló jeleket mutató két egér ízületei a kezelés 1. napján, és ezt követően az arthritis enyhülését mutatták, és sem sejtinfiltrálódás, sem a porc és a synovium látható abnormalitása volt látható (az adatokat nem mutatjuk be).

1. táblázat

Az OSM-elleni antitesttel, vagy kontroll IgG-vel kezelt egerek ízületeinek hisztológiai pontozása

Kezelés	Normális/enyhe		Mérsékelt		Súlyos	
	porc	synovium	porc	synovium	porc	synovium
OSM-elleni	58%	47%	21%	23%	22%	31%
IgG	21%	6%	26%	37%	53%	57%

Összes vizsgált ízület: 73 ízület/kezelés



7. példa

Kisméretű, szerves molekulájú antagonisták azonosítása

Az OSM kisméretű, szerves molekulájú antagonistáit úgy azonosítottuk, hogy azok „riportersejtvonal” OSM-által indukált biológiai válaszreakcióját gátolják anélkül, hogy szemmel látható citotoxicitást okoznának. Kontrollként a vegyületek TNF α -ra reagáló sejtvonalra gyakorolt hatását is teszteltük.

7.a példa

Humán eredetű OSM expressziója és tisztítása

Humán eredetű OSM-et (hOSM) kódoló DNS-fragmenst, amely tartalmazza a 25 aminosavból álló *leader*-szekvenciát, polimeráz láncreakcióval amplifikáltunk aktivált leukocitákból származó cDNS-könyvtárból, a hOSM-re az EMBL-szekvenciája (M27288) alapján tervezett szintetikus láncindító oligonukleotidok alkalmazásával: 5'-GCATAGGATCCGCGGCTA TAGGCAGCTGCTCG-3' (5. a. sz.) és 5'-ATCGTGAATTCCTACCGGGG CAGCTGTCCCCT-3' (6. a. sz.). A PCR-terméket *pCR2.1*-be (Invitrogen) szubklónoztuk, a *pCR2.1hOSM*-et előállítva.

SalI restrikciós endonukleáz számára hasítóhelyet hoztunk létre a *pGEX-3X* bakteriális expressziós vektor (Pharmacia) Xa-faktor helyén belül a *TG* helyett *AC*-t beillesztve *Quickchange* helyspecifikus mutagenézis célját szolgáló reagenskészlet (Stratagene) alkalmazásával, az alábbi szekvencia (7. a. sz.) létrehozása céljából:



BamHI

EcoRI

AAA TCG GAT CTG ATC GAA GGT CGA CGG ATC CCC GGG AAT TCA TCG

K S D L I E G R R I P G N S S

Xa faktor

(14. azonosítószámú szekvencia)

A *pCR2.1hOSM* OSM-beillesztésének szekvencia-ellenőrzése után a humán eredetű, érett OSM-et kódoló DNS-t a vektorból PCR-rel amplifikáltuk, a következő, *BsmBI* restriktációs endonukleáz számára (aláhúzással jelölt) hasítóhelyet tartalmazó 5'-3' láncindító: 5'-GATACGATCGTCTCATCGAGCGGCTATAGGCAGCTGC--3' (8. a. sz.), és az *EcoRI* számára (aláhúzással jelölt) hasítóhelyet tartalmazó 3'-5' láncindító: ATTACATGGAATTCCTATCTCCGGCTCCGGTTCGG-3' (9. a. sz.) alkalmazásával. Ez a PCR-termék a humán eredetű OSM érett formáját tartalmazza, a *leader*-szekvencia, és a C-terminális 31 aminosav nélkül, amelyek a fehérje érése során távoznak. A PCR-reakciót követően az amplifikált DNS-t tisztítottuk, *BsmBI* és *EcoRI* restriktációs enzimekkel hasítottuk, és módosított *pGEX-3X*-vektorba (a *GST*-t kódoló DNS-t tartalmazza, Pharmacia) szubklónoztuk; a vektort *SalI* és *EcoRI* enzimekkel hasítottuk a *pGEX*-plazmid létrehozása céljából. A szekvencia ellenőrzése után a *pGEX196*-plazmidot *BLR-DE3*-as *E. coli*-sejtekbe (Novagen) transzformáltuk. A transzformált sejteket 100 µg/ml ampicillinnel kiegészített *2xYT+G*-tápközegben (16 g/l *tryptone*, 10 g/l élesztőkivonat, 5 g/l NaCl, pH 7.0 NaOH-val beállítva, 2% glükóz) tenyésztettük.



Tisztított fehérje előállítása céljából a *pGEX-196D* *BLR-DE3*-as *E. coli*-sejtekben készített egy éjszakás tenyészetét 1:100 arányban hígítottuk és 37°C-on 0.8-as A_{600nm} -értékig növesztettük. A *GST-hOSM* fúziós fehérje expresszióját 0.1 mM IPTG (izopropil-1-tio- β -D-galaktopiranozid) hozzáadásával indukáltuk, és a tenyésztést további két órán át folytattuk.

A *GST-hOSM*-et az *E. coli*-tenyészetből *batch*-tisztítással izoláltuk. 3 literes baktériumtenyészetet centrifugálással (3000 rpm) összegyűjtöttük, és az eredményül kapott csapadékot 50 ml jéghideg, proteínáz-inhibitor tablettákat (Boehringer) tartalmazó PBS-ben (foszfáttal pufferolt sóoldat) reszuszpendáltuk. 5 ml lizozimot adtunk a sejtsuszpenzióhoz, és 5 percig jégen inkubáltuk. A sejteket 4°C-on szonikáltuk, és 1% *Triton-X100*-at, és 100 mM ditio-treitolot adtunk hozzá. A lizátumot billegtetve („end over end”) kevertük 4°C-on 10 percig, és végül centrifugáltuk (14000 g). A felülúszót glutation-agarózhoz (Sigma, *G4510*) adtuk, és billegtetve összekevertük 30 percen át, 4°C-on. A szuszpenziót rövid centrifugálásnak vetettük alá, a felülúszót leszívtuk, és a leülepedett agarózt kétszer mostuk jéghideg PBS-ben. Elúciós puffert (20 mM glutation, 100 mM TRIS pH 8.0, 100 mM NaCl, pH 8.0) adtunk hozzá, és a szuszpenziót 5 percig inkubáltuk, jégen. A felülúszót összegyűjtöttük, és a frakciókat nátrium-dodecil-szulfát/poliakrilamid-gélelektroforézissel (*SDS-PAGE*) analizáltuk, majd festettük *Coomassie brilliant blue* alkalmazásával, a tisztított fehérje azonosítása céljából.



Proteolitikus hasítást optimalizáló kísérleteket állítottunk be a Xa-faktor és trombin alkalmazásával; a trombin eredményezte a *hOSM* optimális mennyiségét, amint azt a *Coomassie brilliant blue* alkalmazásával végrehajtott SDS-PAGE bizonyította. A GST és az OSM termékeinek elválasztását ioncserélő kromatográfia alkalmazásával hajtottuk végre, és a tisztított OSM-terméket N-terminális szekvenálás és tömegspektrometria alkalmazásával igazoltuk.

7.b példa

OSM-által indukált *spAP*-mérési eljárás

HepG2-sejtvonalat (*ECACC*) stabil módon transzfektáltunk hat, funkcionális *STAT3*-ra reagáló elemmel (*STAT3 response elements*) az *spAP* (szekretálódó placentális eredetű alkalikus foszfatáz) cDNS-hez viszonyított 5'-irányban a *HepG2B6* létrehozása céljából, az alábbi leírás szerint. A *STAT3* (jelátvivő és transzkripció-aktivátor, *signal transducer and activator of transcription*) az IL-6 citokincsalád intercelluláris jelátviteli kaszkádjának közvetítője. A sejtfelszíni receptorok dimerizációja után a *STAT3* foszforilálódik, ezután a nukleuszban (sejtmagban) kötődik a DNS *RE*-khez, és aktiválja a 3'-irányú DNS-t; ebben a konstrukcióban ez a DNS az *spAP*-DNS. Így ennél a vonalnál egy éjszakás, onkosztatin-M-mel történő inkubálással *spAP*-termelés váltható ki.

STAT-reaktív, szekretálódó placentális alkalikus foszfatáz (*spAP*) riportergént hoztunk létre a következőképpen. Először a *STAT*-reaktív, palindrom szekvenciájú elem



három kópiáját tartalmazó oligonukleotid-pár [Wegenka, U. M. és mtsai., Mol. Cell. Biol. 13: 276-288, 1. táblázat a 277. oldalon (1993)], és az *XhoI* számára 5' helyet klónoztunk a *pBluescript tkSPAP* plazmid egyetlen *SalI*-helyére, a *pIIP3-tk-SPAP* létrehozása céljából. A fibrinogén- β -promóterben található *STAT*-reaktív elemet kódoló szintetikus oligonukleotid további hat kópiáját [Dalmon és mtsai., Mol. Cell. Biol. 13: 1183-1193; a 9. ábrán, az *IL6RE*-konszenzus-szekvenciát és a *TTG-leader*-szekvenciát (a *GAT*-végződés nélkül) magában foglaló *h β FG*-szekvencia] ezután a *pIIP3-tk-SPAP* *hoI*-helyére klónoztuk a *pIIX6/II3-tk-SPAP* létrehozása céljából. A (*STAT*-) reaktív elemek számának igazolását szolgáló szekvenálás után a *pIIX6/II3-tk-SPAP*-t *NruI* és *XbaI* enzimekkel emésztettük, a 9 *STAT*-reaktív elemet és a *tk-SPAP*-ot kódoló szekvenciákat tartalmazó DNS-fragmens izolálása céljából. A fragmenst ezután, *HEPG*-sejtvonal alapítása céljából, a *pcDNA4*-plazmid (Invitrogen) *NruI* és *XbaI* hasítóhelyei közé vittük át (a *CMV*-promótert helyettesítve), 9 *STAT3*-reaktív elemet és a szelekcióra alkalmas *NeoR*-markert tartalmazó *SPAP*-riporter gént létrehozása céljából.

HepG2-sejteket (ECACC) tenyésztettünk 2 mM L-glutamminal, 1% *NEAA*-val, és 10% *HI* magzati borjúsérummal kiegészített *DMEM*-tápközegben 37°C-on, 5% CO₂-t tartalmazó, 92% páratartalmú légtérben. A *STAT*-*SPAP*-riporter génnel történő transzfekeció céljából a sejteket 1%-os *konfluencia* mellett 10cm-es szövettenyésztő edényben kilemezeztük, és kalcium-foszfát transzfekeciós reagenskészlet (Invitrogen)



alkalmazásával 10 μg *STAT-sPAP*-riportervektorral transzfektáltuk. Az 1 mg/ml *G418* jelenlétében történő klónszelekciót követően az egyedi sejtvonalakat az *STATsPAP*-riprtergéből az *sPAP*-expresszió IL-6-által kiváltott növekedésére szkríneltük.

HepG2B6-sejteket kilemezeltünk 96-üregű lemezekre, 3×10^4 sejt/üreg koncentrációban, 100 μl tápközegben (1% nem esszenciális aminosavakat, 2 mM glutamint, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ *G418*-at (Life Technologies) tartalmazó *DMEM*, SIGMA). A sejteket 48 órán át egyensúlyba hoztuk. A szilárd formájú, feltételezett anti-OSM vegyületekből törzsoldatot készítettünk 20 mM koncentrációban, DMSO-ban, és 1:3 arányban DMSO-val sorozathígítást készítettünk. Ezt tovább hígítottuk *HepG26B*-mérési tápközegben (ez a fent ismertetett tápközeg), 10% *FCS* helyett 1% hőinaktivált, alacsony szintű alkalikusfoszfataz-aktivitással rendelkező *FCS*-sel (Life Technologies) kiegészítve. A vegyületeket 1:3 arányban hígítottuk (200 μM -tól 0.09 μM -ig, a DMSO 1%-os végkoncentrációjáig, azaz 200 μM , 66.67 μM , 22.22 μM , 7.41 μM , 2.47 μM , 0.82 μM , 0.27 μM , 0.09 μM). A tápközeget minden üregből eltávolítottuk, és 2 ng/ml OSM-et (R&D Systems) is tartalmazó, hígított vegyülettel helyettesítettük, és a sejteket további 20 órán át inkubáltuk. Minden hígítást háromszorosán vittünk fel. 20 μl tápközeget eltávolítottunk minden üregből és *sPAP*-aktivitásra vizsgáltuk *pNPP*-t (p-nitrofenil-foszfát SIGMA) szubsztrátként alkalmazva. Az endogén alkalikus foszfatazt L-homoargininnel blokkoltuk. A szubsztrát optikai denzitását 405-650 nm-en olvastuk le. A



vegyület koncentrációját az OD-vel szemben ábrázoltuk a ke-
letkezett sPAP mértékeként; ez az ábrázolás az IC50-értékek
meghatározása céljából elemezhető.

7.c példa

A549-es sejtek: TNF α által indukált sPAP-mérési eljárás

A mérésben az A549-es sejteket alkalmaztuk, amelyek az E-szelektin citokin-reaktív régiójának alkalikus foszfátázzal kapcsolt génjét tartalmazó riportergénnel stabilan vannak transzformálva [Ray és mtsai., Biochem. J. 328: 707-715 (1997)]. Ennél a transzfektált sejtvonalnál sPAP-termelést válthatunk ki a TNF α -val történő, egy éjszakai inkubációval.

A549-es sejteket 96-üregű lemezekre vittünk 5×10^4 sejt/üreg koncentrációban, 100 μ l tápközegben. A sejteket 24 órás inkubációval egyensúlyba hoztuk. A szilárd formájú, feltételezett anti-OSM vegyületekből törzsoldatot készítettünk 20 mM koncentrációban, DMSO-ban, és 1:3 arányban DMSO-val sorozathígítást készítettünk. Ezt tovább hígítottuk mérési tápközegben [1% hőinaktivált, alacsony szintű alkalikusfoszfátáz-aktivitással rendelkező FCS-sel, 1% nem esszenciális aminosavakkal, 2 mM glutaminnal, 500 μ g/ml G418-cal (Life Technologies) tartalmazó DMEM], 0.09-200 μ M-os koncentrációjú válaszreakciót kiváltó koncentrációig, a DMSO 1%-os végkoncentrációjáig. A tápközeget az üregekből eltávolítottuk, és 3 ng/ml TNF α -t (R&D Systems) is tartalmazó, hígított vegyülettel helyettesítettük, és a sejteket további 20 órán át inkubáltuk. Minden hígítást háromszoro-



san vittünk fel. 20 μ l tápközeget eltávolítottunk minden üregből és *sPAP*-aktivitásra vizsgáltuk *pNPP*-t (p-nitrofenil-foszfát SIGMA) alkalmazva szubsztrátként. Az endogén alkalikus foszfatázt L-homoargininnel blokkoltuk. A szubsztrát optikai denzitását 405-650 nm-en olvastuk le. A vegyület koncentrációját az OD-vel szemben ábrázoltuk a keletkezett *sPAP* mértékeként; az ábrázolás az *IC50*-értékek meghatározása céljából elemezhető.

7.d példa

Sejtéletképesség-vizsgálat

A sejtek életképességének mérésekor a metabolikusan aktív sejtekben mértük a dehidrogenáz-enzimek tetrazólium-vegyületet [3-(4,5-dimetil-tioazol-2-il)-5-(3-karboxi-metoxi-fenil)-2-(4-szulfofenil)-2H-tetrazólium, belső só; MTS] oldható, 490 nm-en mérhető formazántermékké átalakító redukáló képességét.

0.046 μ g/ml fenazin-metoszulfátot (PMS, Sigma) tartalmazó, 2 mg/ml MTS-oldatot (Promega) állítottunk elő *Dulbecco's* PBS-ben. A tápközeg *sPAP*-aktivitás mérése céljából történő eltávolítása után 20 μ l/üreg MTS/PMS-t adagoltunk. A sejteket ezután további 45 percig inkubáltuk. Ezután mértük 490 nm-en az abszorbanciát, 630 nm-es referenciát alkalmazva.



7.e példa

Antagonisták

Az N-{1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-il)benzamid} [Davoll és Kerridge, J. Chem. Soc. 2589 (1961)] (GW 340442X) az OSM által indukált sPAP-kibocsátás koncentrációfüggő gátlását okozta, 0.3 μM -os IC_{50} -értékkel (9. ábra), azonban kevésbé hatásos volt a $\text{TNF}\alpha$ által indukált sPAP-kibocsátás gátlásában (megközelítőleg 92 μM -os IC_{50} -érték, 10. ábra). Így ez a vegyület 100-szorosnál nagyobb mértékű szelektivitást mutat az OSM-re a $\text{TNF}\alpha$ -val szemben.

8.a példa

Humán eredetű OSM-elleni antitestek előállítás és tesztelése

A humán eredetű OSM (R&D Systems) elleni monoklonális antitesteket állítottunk elő egerekben a következőképpen: nőstény, *SJL*-egereket (Jackson, Inc. Bar. Harbor, MA) rekombináns, humán eredetű OSM-mel immunizáltunk (R&D Systems): vagy *RIBI*-adjuvánsban (*RIBI*, Hamilton, MT) emulgeált 1 μg rekombináns, szubkután módon beadott humán OSM-antigénnel, és intraperitoneális módon beadott komplett Freund's adjuvánssal a 0., 3., 5. és 24. napon (a 27. napon 1 μg antigént adtunk be sóoldatban intraperitoneális módon); vagy *RIBI*-adjuvánsban emulgeált, intraperitoneálisan beadott 1 μg antigénnel a 0., 3., 5., 24. és 53. napon (az 54. napon 1 μg antigént adtunk be sóoldatban intraperitoneális módon, injekcióban).



Az utolsó immunizálás után 24 órával az egereket feláldoztuk, splenocitákat gyűjtöttünk és előkészítettünk fúziós célokra. A fúziós eljárást Su J-L. leírása szerint valószínűsítettük meg. [Su J-L. és mtsai., *Hybridoma* 17(1): 47-53 (1998)] Röviden: splenocitákat és mielómasejteket (*P3X63Bcl-2-13*) [Kilpatrick, K.E. és mtsai., *Hybridoma* 16(4): 387-395 (1997)] 5:1 vagy 1:1 arányban polietilén-glikol-1500 (Boehringer Mannheim, Németország) alkalmazásával fuzionáltattunk. A fuzionált sejteket 1×10^6 sejt/ml koncentrációban reszuszpendáltuk hibridóma „növekedési” tápközegben, amely egyenlő térfogatú *RPMI 1640*-ból (Life Technologies, Inc. Gaithesburg, MD) és 10% magzati borjúszérummal (Hyclone, Logan, UT), 1 X *Origen Hybridoma Cloning Factor*-ral (Igen, Gaithesburg, MD), 2 mM L-glutaminnal, penicillinnel és sztreptomocinnel kiegészített *EXCELL-610*-ból (JRH Biosciences, Lenexa, KS) állt. A sejteket ezután 24-üregű mikrotiter-lemezekre (Costar, Cambridge, MA) vittük, 1 ml/üreg mennyiségben. 24 óra elteltével minden üreghez 1 ml 2x *HAT*-szelekciós tápközeg: 100 μ M hipoxantint, 0.4 μ M aminopterint, 16 μ M timint (Life Technologies, Inc.) adtunk hibridóma „növekedési” tápközegben. A sejteket 2 hétig tenyésztettük 37°C-on, 5% CO_2 -ben, majd a hibridóma-felülűszókat *ELISA* alkalmazásával OSM-elleni antitest-szekréciónak szkríneltük. A kiválasztott hibridómákon „határhígítási klónozási” hajtottunk végre.

A hibridóma-felülűszókat és hígított szérumot inkubáltunk humán eredetű OSM-mel burkolt 96-üregű lemezekben. A hOSM-elleni antitesteket alkalikus foszfatázzal je-



lőtt, egér elleni antitestekkel detektáltuk. A pozitív eredményt adó antitestek dupla OD-értékeit a 2. táblázatban foglaltuk össze:

2. táblázat

Hibridóma	OD 1:10	OD 1:100	OD 1:1000
OM 5-6.1	1.346	0.901	0.302
	1.329	0.929	0.249
OM 5-6.10	1.347	1.017	0.296
	1.434	1.122	0.352
OM 6-10.111	1.77	1.073	0.36
	1.615	1.557	0.0524
Egérszérum	OD 1:500	OD 1:2500	OD 1:5000
M1	0.006	0	0.005
	0.006	0.001	0.003
M2	1.843	1.086	0.73
	1.86	1.052	0.794
M3	1.405	0.445	0.198
	1.338	0.324	0.217
M4	1.48	0.537	0.18
	1.631	0.484	0.18

A felülúszók közül három, és az egérszérumok mindegyike, egy kivételével pozitív eredményt adott az *ELISA*-ban. Az *ELISA*-adatokat felhasználva az antitest-koncentráció közelítőleg megbecsültük, és a pozitív anti-



testeket ezután 2 ng/ml OSM-mel szemben titráltuk a 7b. példánál leírt *HepG2-B6* *sPAP*-méréssel. Összefoglalva, anti-testet inkubáltunk egy éjszakán át a citokinnel 4°C-on, majd a *HepG2 B6*-sejtekkel. A *sPAP*-termelést a 7b. példánál leírtak szerint mértük. A hibridómafelülűzők és az egérszérumok által okozott *sPAP*-termelés-gátlást a 11. ábrán mutatjuk be.

9.a példa

Az OSM-nek receptorhoz való kötődésében kulcsszerepet játszó aminosavak azonosítása

A hOSM receptorkötő régióit kezdetben az IL-6-citokincsalád rokonságban levő tagjait figyelembe véve azonosítottuk. az 1. és 3.régió feltehetően a receptor citokin-specifikus láncához (láncaihoz) való kapcsolódásban, míg a 2.régió a közös receptorkomponenshez, a *gp130*-hoz való kötődésben játszik szerepet. Az IL-6 citokincsaládba tartozó leukémia inhibitoros faktor (LIF) [Hudson és mtsai., J. Biol. Chem. 271: 11971-11978 (1996)] és az interleukin-6 (IL-6) [Paonessa és mtsai., EMBO J. 14:1942-1951 (1995); Savino és mtsai., EMBO J. 13: 1357-1367 (1994)] 2. régióját érintő mutációs vizsgálatok azt valószínűsítik, hogy a 2. régióban az aminosavak változtatása a *gp130*-hoz való kötődésben változást idéz elő. Az OSM *gp130*-hoz való kötődésében fontos szerepet játszó aminosavak tanulmányozásának céljából szükséges, hogy azonosítsuk azokat az aminosavakat, amelyek az OSM 2. régiójában a felszínen vannak. Az NMR-kísérletekből származó információkat [Hoffmann és



mtsai. J. Biomol. NMR 7:273-282 (1996)] és az LIF leközölt szerkezetét [Robinson és mtsai., Cell 77: 1101-16 (1994)] alkalmazva az OSM homológiamodelljét megszerkesztettük. A modellben a 2. régióban, a felszíni pozíciókat elfoglaló aminosavakat választottuk ki mutagenézis céljából. Meghatározták növekedési hormon (az OSM homológja) és receptora között kialakuló komplex szerkezetét [De Vos és mtsai., Science 255:306 (1992)]. Az OSM modellje és a növekedési hormon modelljének egymásra helyezésével meghatároztuk az OSM és a *gp130* közötti potenciális kölcsönhatás további helyeit.

A modellezési vizsgálatok alapján 27 pozíciót választottunk ki az OSM-ben mutációra, a *gp130*-cal való kölcsönhatása tanulmányozás céljából, lásd a 3. táblázatot. Mindegyik esetben alaninra cseréltük a vad típusú fehérjében előforduló aminosavat.

Pozíció	Lokalizáció	Megjegyzés
Ser 7	N-terminális régió	
Lys 8	N-terminális régió	
Glu 9	N-terminális régió	
Tyr 10	A-hélix	
Arg 11	A-hélix	
Leu 13	A-hélix	A jelenlegi modell szerint e leucinok ilyen elhelyezkedése nem bizonyított. Ha a 17. aminosav alatt a hélix torzul, az 1. hélix felső része elfordulhat, és ezek a csoportok eltemetődnek



Leu 14	A-hélix	
Leu 17	A-hélix	
Gly 15	A-hélix	
Gln 16	A-hélix	A 16-22. aminosavak szinte a hidrofil csoportok folyamatos sorát képezik; ha az alapul szolgáló szerkezet helikális, akkor ezek közül néhány lehet a fehérje magjában eltemetett, és feltehetően hidrogénkötést alakítanak ki más aminosavakkal. Alternatív esetben a hélix torzul, és ezek az aminosavak exponálódnak.
Gln 18	A-hélix	
Lys 19	A-hélix	
Gln 20	A-hélix	
Thr 21	A-hélix	
Asp 22	A-hélix	
Gln 25	A-hélix	
Asp 26	A-hélix	
Met 113	C-hélix	
Pro 116	C-hélix	
Asn 117	C-hélix	
Leu 119	C-hélix	
Gly 120	C-hélix	Az oldalláncok nem hordoznak funkciót, de a humán eredetű LIF egyik négyszeres mutánsában megváltozott a <i>gp130</i> -kötés
Arg 122	C-hélix	
Asn 123	C-hélix	
Asn 124	C-hélix	
Tyr 126	C-hélix	
Gln 130	C-hélix	



9.b példa

A mutáns OSM-GST fúziós molekulák szintézise

Mind a 27 mutáció esetére egy pár mutagén oligonukleotidot terveztünk. Ezek megközelítőleg 33 bázis hosszúságúak, és előnyösen G- vagy C-csoport van egyik vagy másik (vagy mindkettő) végükön. Ezeket a (IPTG által indukálható) *lac*-promóter szabályozó hatása alatt álló vad típusú OSM-DNS-t (12. a. sz.) tartalmazó, *pGEX*-ből származó (Pharmacia) expressziós vektorhoz hibridizáltuk („anneal”), és natív *Pfu*-polimeráz alkalmazásával (Stratagene) meghosszabbítottuk. Az eredeti, templátként szolgáló DNS-t *DpnI*-enzimmel (New England Biolabs) emésztettük, és az újonnan szintetizált plazmidot (amely nem szubsztrátja a *DpnI*-nek) *DH5alfa E. coli*-ba (GibcoBBL/Life Technologies) transzformáltuk. Néhány telepet (rendszerint 4-et) felvetünk, plazmid-DNS-t izoláltunk, és a DNS-szekvenciát meghatároztuk. Minden mutáció esetében egy reprezentatív mutáns klónt, és egy hasonlóan szerkesztett, vad típusú klónt *E. coli BLR*-törzsébe transzformáltuk (*non DE3*: Novagen) a rekombináns fehérjék expressziója céljából. 0.5 l-es tenyészeteket alapítottunk és megközelítőleg 0.5-ös OD₅₅₀-érték mellett indukáltuk. 3 órás indukció után a sejteket centrifugálással ülepitettük, és lizozimet, és szonikálást együttesen alkalmazó eljárással lizáltuk. Mivel a rekombináns mutáns fehérjék a GST-vel képzett fúziós fehérje formájában expresszázódtak, glutation-Sepharose-oszlopokat alkalmaztunk a fúziós fehérjék kikötéséhez. A fúziós fehérjéket ezután az oszlopról szabad glutation alkalmazásával



eluáltuk, majd 10 mM DTT-ben 4 órán át inkubáltuk szobahőmérsékleten a glutation-melléktermék eltávolítása céljából, és -80°C-on tároltuk.

9.c példa

A pontmutációk hatása az OSM-GST és a vad típusú OSM kompetíciójára a gp-130-Fc-kötésért ELISA-n

Nunc immunlemezeket (*F6 Maxisorp*, Life Technologies) egy éjszakán (4°C-on) át burkoltunk vad típusú OSM-mel (a 7a. példánál leírtak szerint); 50µl/üreg mennyiségben, 1 µg/ml koncentrációban karbonát/bikarbonát pufferben, pH 9.4). A lemezeket mostuk (0.05% TWEEN-20-at tartalmazó PBS-sel, *Skatron* lemezmosó alkalmazásával), szárazra „ütögettük”, és blokkoltuk, a nem specifikus kötés csökkentése céljából (1% BSA/PBS, 200 µl/üreg). 1 órás inkubációt (szobahőmérsékleten, billenőasztalon) követően a lemezeket szárazra „ütögettük”, és a 9.b példa szerint előállított vad típusú (wt) vagy mutáns OSM-GST-t adtuk hozzá (50 µl/üreg, 20-0.002 µg/ml, 1% BSA/PBS-ben titrálva). Pozitív kontrollként poliklonális, humán OSM-elleni antitestet (R&D Systems) szintén teszteltünk (20-0.02 µg/ml). Gp130-Fc (az alábbiak szerint előállítva, 300 ng/ml) és humán eredetű IgG alkalikus foszfatázzal jelölt konjugátumának (1:500, Sigma) komplexét 1 % BSA/PBS-ben (50 µl/üreg) adtuk közvetlenül a tesztelendő hatóanyag után. 5 órás inkubálás után (szobahőmérsékleten, billenőasztalon) a lemezeket mostuk (hatszor), és ELISA-amplifikálási rendszerrel (Life Technologies) hívtuk elő a gyártó utasításai alapján, és az



OD-t 490 nm-en mértük. Mindegyik lemez esetében a teljes kötést gp130-Fc/konjugátummal és OSM-mel határoztuk meg 1% BSA/PBS jelenlétében, és a nem specifikus kötést gp130-Fc/konjugátummal, OSM nélkül, 1% BSA/PBS jelenlétében határoztuk meg; a konjugátum OSM-hez való kötődését gp130-Fc nélkül határoztuk meg.

A humán eredetű gp130 extracelluláris doménjét kódoló DNS-t polimeráz láncreakció (PCR) alkalmazásával amlifikáltuk, a következő szintetikus láncindítók alkalmazásával, amelyeket a *GenBank* adatbázis gp130-szekvenciája (M57230) alapján terveztünk:

5'-3' láncindító:

5' CATCGGATCCAAGCTTTACAGTTACTGAGCACAGGACCTCACC (10. a. sz.)

BamHI - HindIII 5' UTR szekvencia

ATGTTGACGTTGCAGACTTG

M L T L Q T (15. a. sz.)

és 3'-5' láncindító:

5' CATCCTCGAGTTTCTCCTTGAGCAAACTTTGG (11. asz. sz.)

XhoI

Az 5'-3' láncindító tartalmazott a *BamHI* és *HindIII* restriktív endonukleázok számára hasítóhelyeket, és 5' irányban nem transzlálódó konszenzusszekvenciát, amelyet a gp130 kódoló szekvenciája startjával komplementer DNS-szekvencia követett. A 3'-5' láncindító tartalmazott az *XhoI* restriktív endonukleáz számára hasítóhelyet, amely után a gp130 extracelluláris doménjét kódoló szekvencia 3'-



végével komplementer DNS-szekvencia következett. A PCR-fragmenst tisztítottuk, és *pCR2.1*-be (Invitrogen) klónoztuk a *pCR2.1gp130* előállítására céljából.

A *pCR2.1gp130* plazmidot *BamHI* és *XhoI* restrikciós enzimekkel emésztettük, a *gp130*-as fragmenst tisztítottuk, és a humán IgG1 Fc-fragmensét kódoló DNS-szekvenciát tartalmazó plazmid *BamHI* és *XhoI* endonukleáz-helyei közé szubklónoztuk. A plazmidot ezután *HindIII* restrikciós enzimmel emésztettük, és az eredményül kapott *gp130Fc*-fragmenst tisztítottuk, és *pFastBac1* bakulovírus expressziós vektor (Life Technologies) *HindIII*-helyére szubklónoztuk a *pBACgpFc*-nek nevezett plazmid előállítására céljából.

A *gp130Fc* fúziós fehérjét a *Bac-to-Bac* bakulovírus expressziós rendszer (Life Technologies) alkalmazásával rovarsejtekben expresszáltuk, a sejttenyészet felülúszójából *protein-A* affinitási oszlopkromatográfia alkalmazásával tisztítottuk, és *Coomassie brilliant blue*-val festett *SDS-PAGE*, és anti-*gp130* és anti-hIgG antitestekkel *Western blot* alkalmazásával ellenőriztük.

A mutáns és vad típusú OSM-GST-t 3-6 kísérletben teszteltük az IC_{50} -értékek meghatározására céljából. Az átlagos OD-értékek OSM és *gp130-Fc* jelenlétében, kompetícióban levő ligandum nélkül (azaz a teljes kötés esetében) 1.157 (a 0.825-1.807 tartományban), és a nem specifikus kötés 0.08-nál kisebb volt. Az OSM elleni antitest minden mérésben koncentrációfüggő gátlást mutatott (74%±1% 1 µg/ml-nél). A vad típusú OSM-GST a lemezre kötött OSM-mel kompetícióban volt, koncentrációfüggő gátlást mutatva (12. áb-



ra), 0.139 ± 0.0258 $\mu\text{g/ml}$ -es IC_{50} -értékkel, amelyet 6 független kísérletben határoztunk meg. A mutáns OSM-GST lemezre kötött vad típusú OSM-mel való kompetíciós képességét a 4. táblázatban foglaltuk össze. A vad típusú OSM-mel a gp130-hoz való kötésért való kompetíció képességében lényeges csökkenést eredményező mutációk a következők voltak: L13A, Q16A, Q20A, G120A, N123A, N124A. Ezek közül a Q20A és a Q16A volt a leggyengébb: a maximális, tesztelt koncentrációnál ($10\mu\text{g/ml}$) a Q20A $66 \pm 2.3\%$ -os, a Q16A csak $15 \pm 8\%$ -os gátlást mutatott (12. ábra).

4. táblázat

A vad típusú és a mutáns OSM-GST hatásossága a lemezre kötött, vad típusú OSM-mel való kompetícióban a gp-130-Fc-kötésért, ELISA-n mérve. Az IC_{50} -értékeket 3-6 független kísérletben határoztuk meg.

Mutáns	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)			Átlag	Standard hiba
vad típus	0.110	0.120	0.257	0.139	0.026
	0.136	0.070	0.142		
(1) S7A	0.199	0.078	0.121	0.133	0.035
(2) K8A	0.252	0.055	0.106	0.138	0.059
(3) E9A	0.208	0.163	0.097	0.156	0.032
(4) Y10A	0.320	0.180	0.168	0.223	0.049
(5) R11A	0.181	0.255	0.280	0.239	0.030
(6) L13A	2.960	1.990	2.640	2.530	0.285
(7) L14A	0.660	0.470	0.412	0.514	0.075
(8) G15A	0.090	0.203	0.171	0.155	0.034
(9) Q16A	>10	>10	>10	>10	
(10) L17A	2.210	1.900	1.350	1.820	0.251

(11) Q18A	0.320	0.310	0.555	0.395	0.080
(12) K19A	0.047	0.075	0.300 0.040	0.116	0.062
(13) Q20A	4.130	5.570	4.100 6.200	5.000	0.527
(14) T21A	0.108	0.044	0.101	0.084	0.020
(15) D22	0.040	0.080	0.092	0.071	0.016
(16) M113A	0.511	0.199	0.252	0.321	0.096
(17) P116A	0.232	0.169	0.197	0.199	0.018
(18) N117A	0.983	0.756	0.617	0.785	0.107
(19) L119A	0.272	0.266	0.227	0.255	0.014
(20) G120A	3.650	2.680	2.950	3.090	0.289
(21) R122A	0.140	0.220	0.167	0.176	0.024
(22) N123A	4.750	1.570	2.560	2.960	0.940
(23) N124A	1.630	1.950	2.380	1.990	0.217
(24) Y126A	0.386	0.359	0.400	0.382	0.012
(25) Y130A	0.145	0.180	0.094	0.140	0.025
(26) Q25A	0.042	0.036	0.055	0.044	0.006
(27) D26A	0.170	0.280	0.481	0.310	0.091

9.d példa

Az OSM pontmutációinak hatása az OSM által kiváltott sPAP-termelésre HepG2-B6 in vitro mérésben

A 7.b példánál leírt mérési eljárást alkalmaztuk. OSM-GST-mutánsokat hígítottunk 100 ng/ml koncentrációig a 9b. példában előállított, intakt OSM-mutánsok ismert koncentrációit alkalmazva. Vad típusú OSM-GST-t alkalmaztunk kontrollként. A hígításokat 1% hőinaktivált, alacsony alkalikusfoszfatáz-aktivitású FCS-t tartalmazó HepG2-B6 tápközegben készítettük. 1:3 arányú sorozathígításokat készítettünk (100; 33.33; 11.11; 3.7; 1.23; 0.4 ng/ml). 3×10^4 HepG2-B6 sejtet osztottunk 96-üregű lemez egyedi üregeiben 100 μ l tápközegben. A sejteket 48 órán át egyensúlyba hoz-



tuk. A tápközeget eltávolítottuk, és 100 μ l, hígított OSM-GST-mutánssal helyettesítettük. A sejteket további 20 órán át inkubáltuk. Minden hígítást háromszorosan vittünk fel. 20 μ l tápközeget levettünk, és *sPAP*-mérést végeztünk pNPP-szubsztrát alkalmazásával. Az endogén ALP-t L-homoargininnel blokkoltuk. Az OD-t 405-650 nm-en olvastuk le. A kísérletet kétszer megismételtük.

A mutánsok legtöbbször a vad típusú fehérjéhez hasonló módon *sPAP*-kiáramlást váltott ki. Három mutáns nagyon alacsony *sPAP*-szintet produkált. E mutánsok esetében az EC_{50} -értékeket nem határoztuk meg. A 13. ábra mutatja az OD-görbéket 9. mutáns (Q16A), a 13. mutáns (Q20A), a 20. mutáns (G120A) esetében, amelyek kevésbé hatásosak voltak az *sPAP*-termelésben. A vad típusú OSM-GST-t mutatjuk be összehasonlításképp. Ezeket az adatokat alkalmaztuk az EC_{50} -értékek kiszámításához. A tényleges EC_{50} -értékeket minden mutáns esetében a vad típusú fehérje EC_{50} -értékek százalékában fejeztük ki, és az 5. táblázatban mutatjuk be.



17.P11 6A	104	25	47	15			75.5	hatá- sosabb
18.N11 7A	241	58	132	42.5			186.5	kevés- bé ha- tásos
19.L11 9A	115	27.8	72	23			93.5	azonos
20.G12 0A		NC		NC				nem számí- tottuk
21.R12 2A	135	32.4	43	13.8	124	47.3	101	azonos
22.N12 3A	157	37.9	154	49.7			155.5	kevés- bé ha- tásos
23.N12 4A	125	30.2	113	36.2			119	azonos
24.Y12 6A	386	93	32	10.3	106.5	40.8	175	kevés- bé ha- tásos
25.Q13 0A	52	12.5	26	8.2			39	hatá- sosabb
26.Q25 A	55	13.3	41	13			48	hatá- sosabb
27D26A	81	19.5	79	25.5			80	azonos

Az EC_{50} -értékeket a vad típusú EC_{50} -érték százalékában fejeztük ki és az aktuális EC_{50} -értékeket mutatjuk be: 80%-nál kisebb érték: hatásosabb, mint a vad típusú, 80%-120%. a vad típusúval azonos hatásosság, 120%-nál nagyobb érték: kevésbé hatásos, mint a vad típusú, NC: nincs kiszámítva.

A táblázatot megvizsgálva, az *ELISA*-mérésekben a vad típusútól lényegesen különbözőnek bizonyult mutánsok közül három mutáns szintén kevésbé hatásos az *sPAP*-mérésben: a 6.: L13A; a 10.: L17A; a 22.: N123A, és a negyedik, a 23.: N124A az önkényes pontozási rendszer szerint az azonos hatásosságú fokozatba esik. Így a két mérési típus jó egye-

zést mutat. A mutánsok közül néhány a vad típusúnál „kevésbé hatásos” volt az *sPAP*-termelés kiváltásában, de itt eltérés mutatkozik a két mérés között, kivéve azokat a mutánsokat (Q16A, Q20A, G120A), amelyek egyáltalán nem váltottak ki *sPAP*-termelést. A mérési eredmények azt jelzik, hogy a Q20A, Q16A, G120A (mutációk) hatást gyakorolnak az OSM *gp130*-hoz való kötődésére. Úgy tűnik, hogy az N123A és az N124A szintén kifejt valamilyen mértékű hatást a *gp130*-vel való kölcsönhatásokra.

10. példa

Az OSM szerepe gasztritiszben

A *H. pylori* egy Gram-negatív, spirálalakú baktérium, amely szerepet játszik a gasztritisz, a gyomorfekély és a gyomorrák előidézésében. A *H. pylori* *Cag*⁺-törzsei nagyobb gyakorisággal fordulnak elő fekélyekben, mint a *H. pylori* *Cag*⁻-törzsek. A *H. pylori* törzseket (a patogénebb *Cag*⁺-t és a *Cag*⁻-t) együtt tenyésztettük *in vitro*, gyomorból származó KATO-III (ECACC) epitelsejt-vonallal, a *H. pylori* fertőzés által kiváltott gazdasejt-reakció differenciális génexpresszió-analízissel történő tanulmányozása céljából. Különböző időpontokban mRNS-t izoláltunk: 45 percnél, 3 óránál és 24 óránál; származékolt radioaktív próbákat hibridizáltattunk a nagysűrűségű dDNS-génsorozatokra (array), amelyek megközelítőleg 136 humán eredetű gént, többek között citokineket, citokinreceptorokat és adhéziós molekulákat tartalmaznak. A kapott génexpressziós profil analízise szerint a *H. pylori* törzsek számos gén indukcióját/ex-

presszióját váltják ki. Úgy találtuk, hogy az onkosztatin-M indukálódott az erősen patogén *H. pylori* törzsek (*Cag*⁺) hatásának kitett sejtek esetében, az enyhén patogén *H. pylori* (*Cag*) hatásának kitett sejtekhez, vagy a kezeletlen kontrollsejtekhez viszonyítva.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. OSM-antagonista alkalmazása gyulladáisos arthropathia vagy gyulladáisos rendellenesség kezelésére szolgáló gyógyszer előállítására.

2. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás, amelyben az antagonista a humán eredetű OSM antagonistája.

3. A 2. igénypont szerinti alkalmazás, amelyben az antagonista a humán eredetű OSM G120, Q16-os, Q20-as, N123-as vagy N124-es aminosavai közül az egyikkel vagy többel képes kölcsönhatásba lépni.

4. Az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti alkalmazás, ahol az antagonista kisméretű szerves molekula.

5. Az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti alkalmazás, ahol az antagonista antitest.

6. Az 5. igénypont szerinti alkalmazás, ahol az antitest humanizált antitest vagy kiméra antitest.

7. Az 1-6. igénypont szerinti alkalmazás gyógyszerként a porc kollagénkibocsátásának megelőzésére alkalmazható gyógyszer előállítására.

8. Az 1-7. igénypont szerinti alkalmazás gyógyszerként rheumatoid arthritis kezelésére alkalmazható gyógyszer előállítására.

9. Az 1-8. igénypont szerinti alkalmazás, ahol az antagonista immunszuppresszív, toleranciát indukáló, vagy gyulladáscsökkentő hatóanyaggal van kombinálva.

10. A 9. igénypont szerinti alkalmazás, ahol anta-
gonista $CD4^+$ -T-sejtet gátló hatóanyaggal, $CD23$ -elleni anti-
testtel vagy TNF-antagonistával van kombinálva.

69 oldal
19 oldal

88 oldal

TH

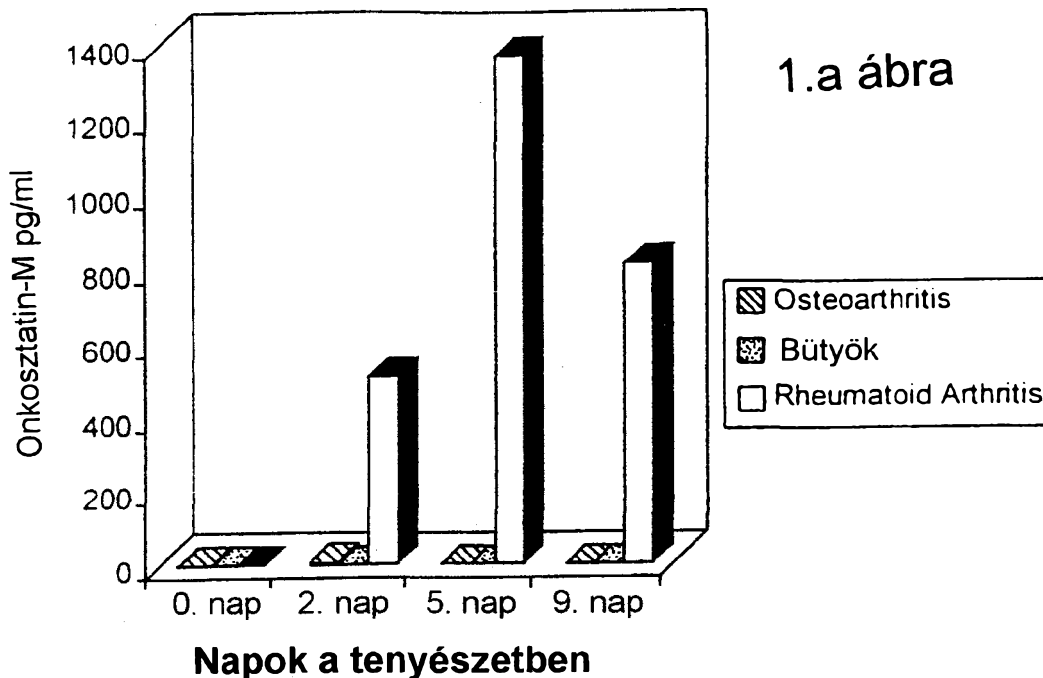
A meghatalmazott:

Danubia

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

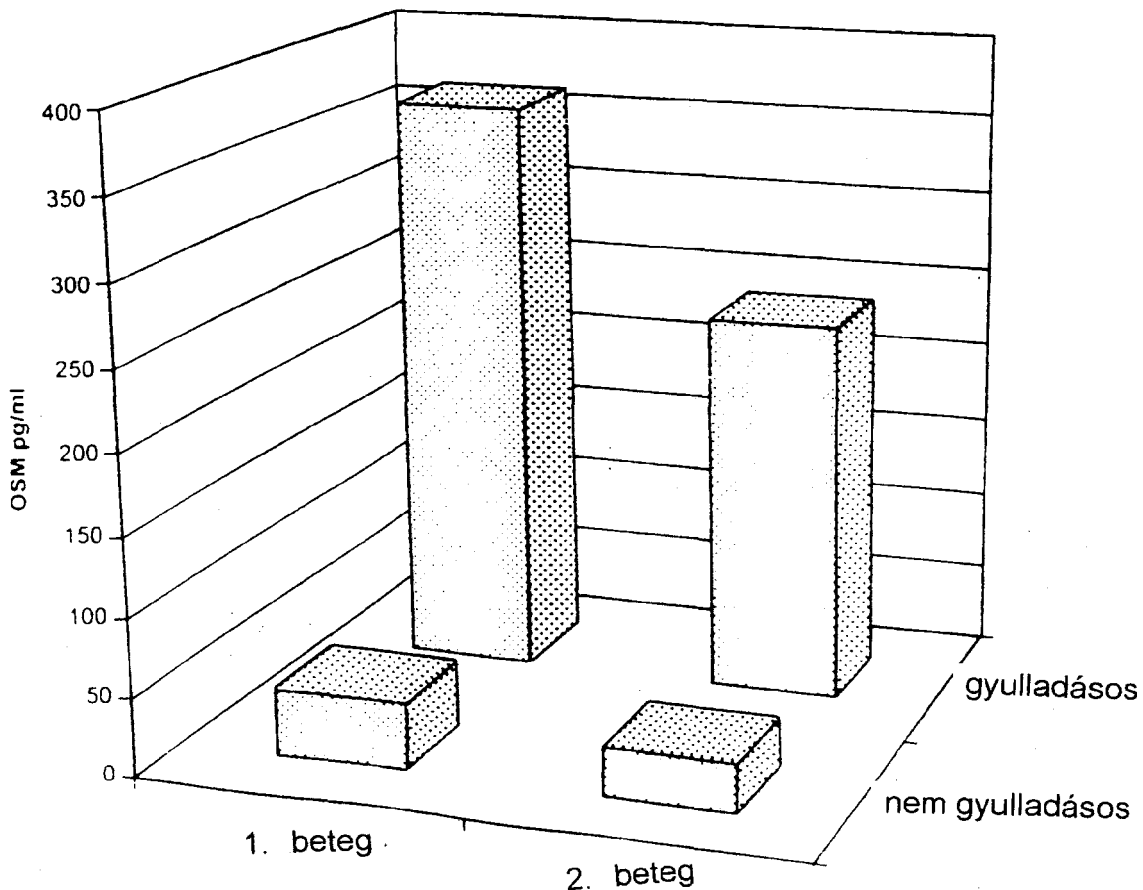
Svingor Ádám

Svingor Ádám



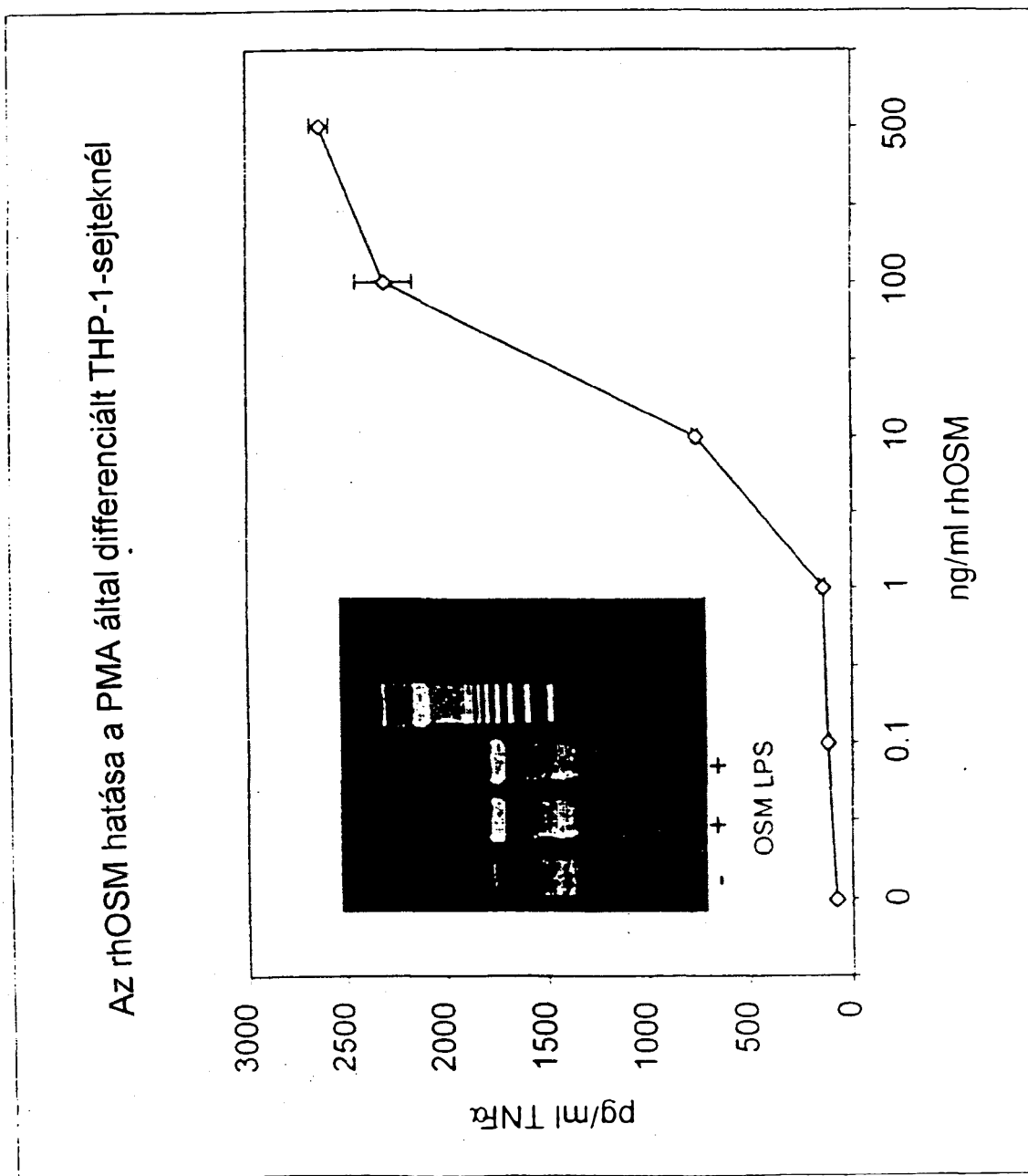
1.b ábra

Spontán OSM-kibácsátás a synovialis szövetben



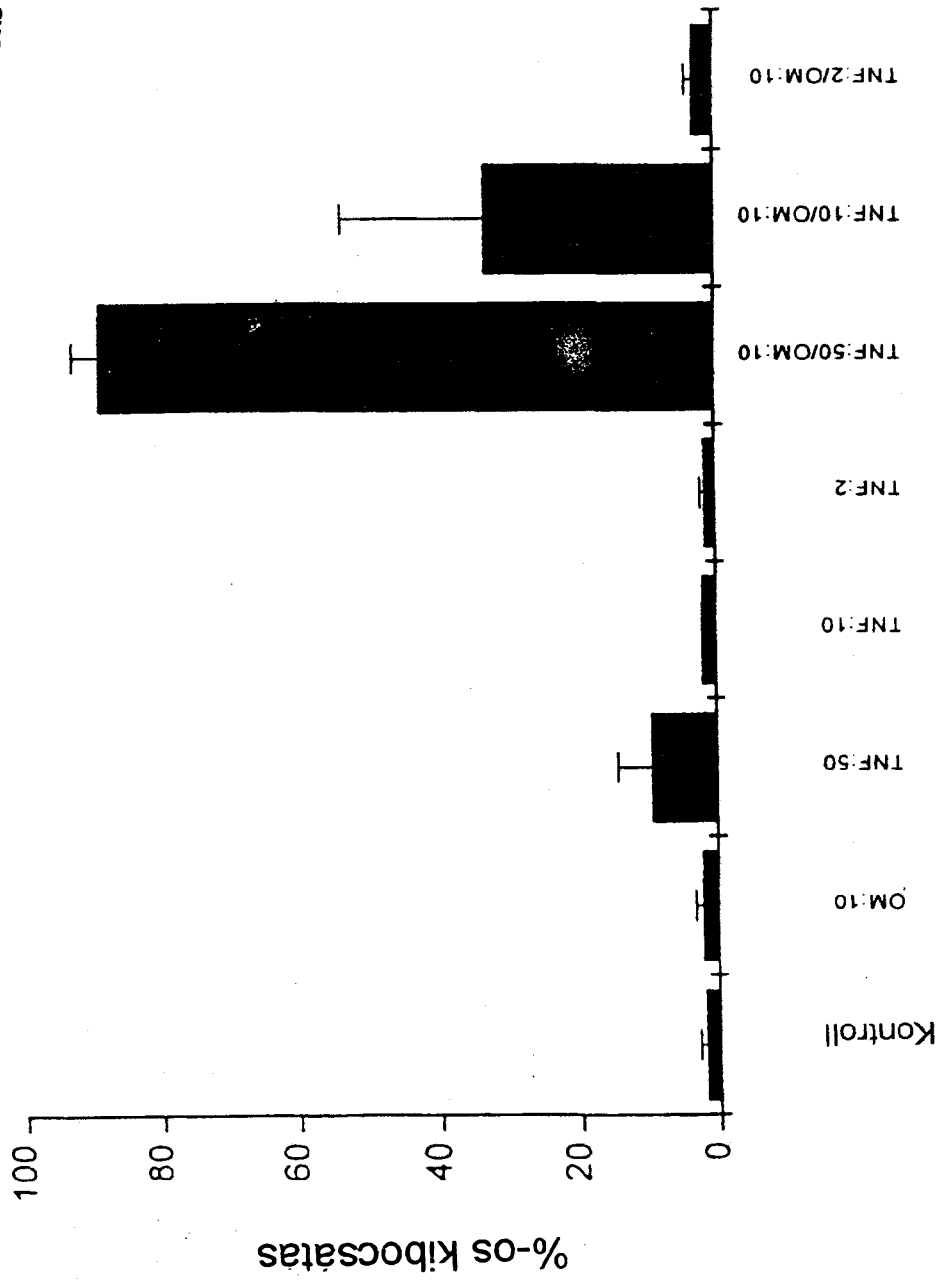
Handwritten signature

2. ábra



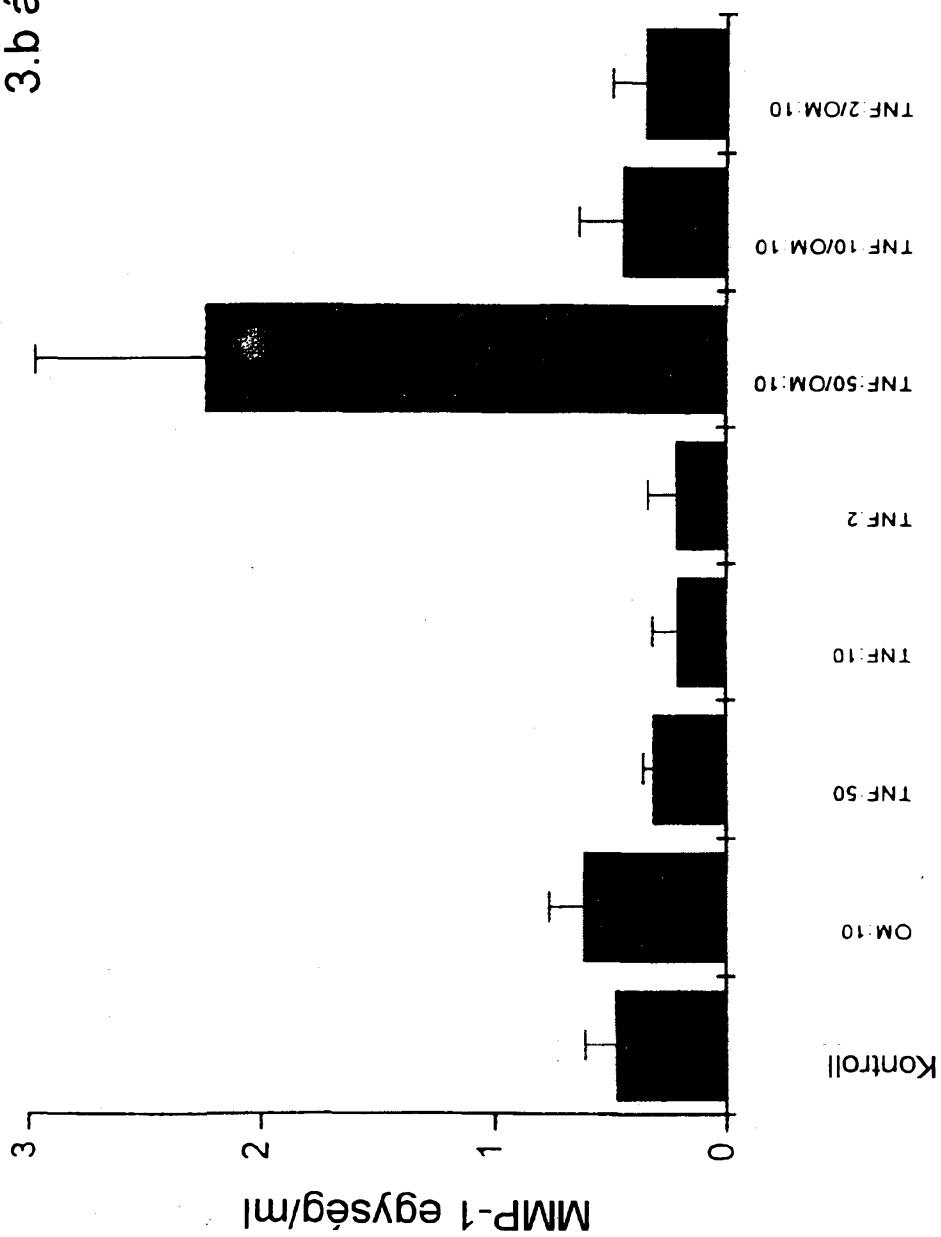
Handwritten mark

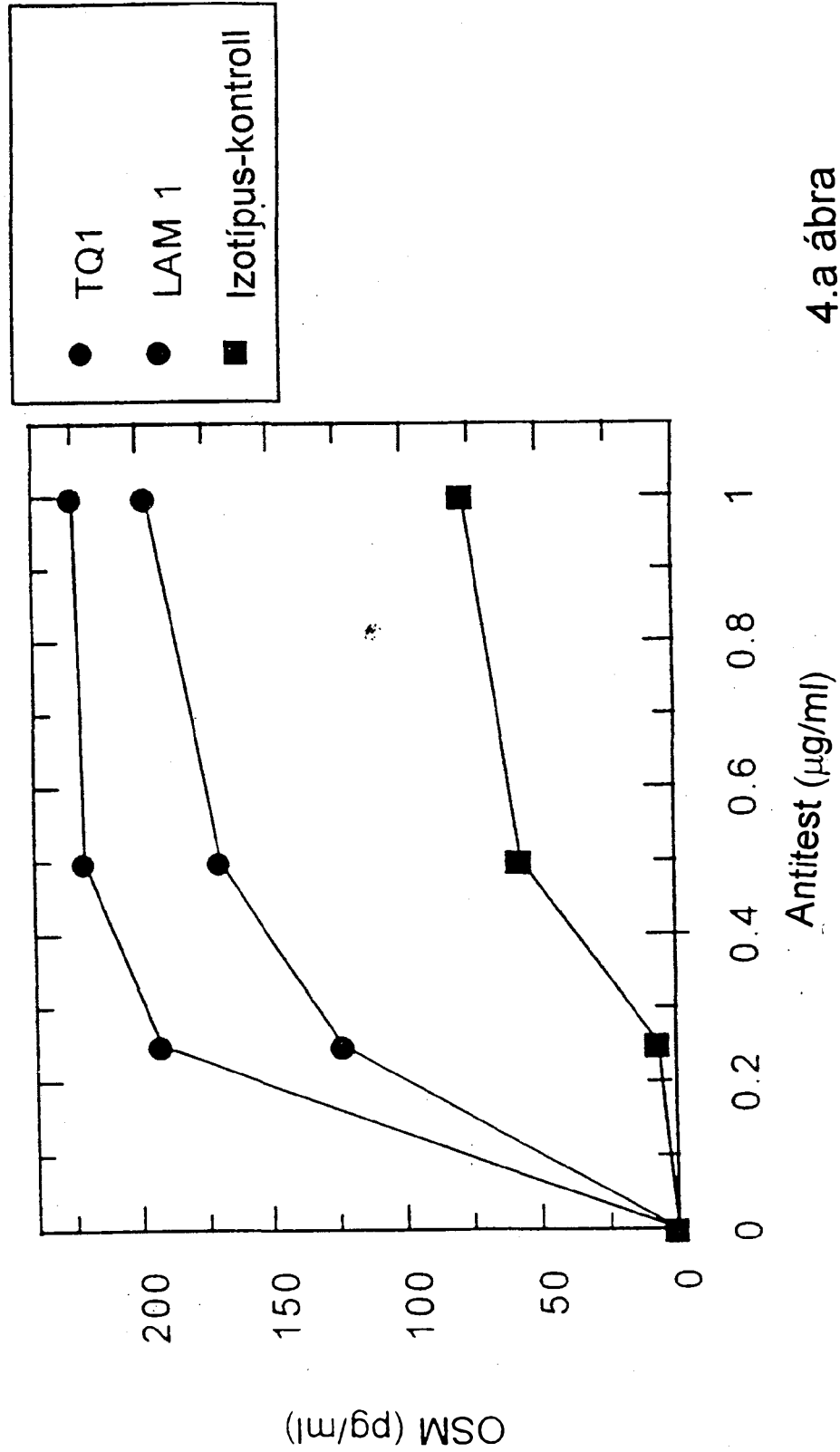
3.a ábra



Fr

3.b ábra

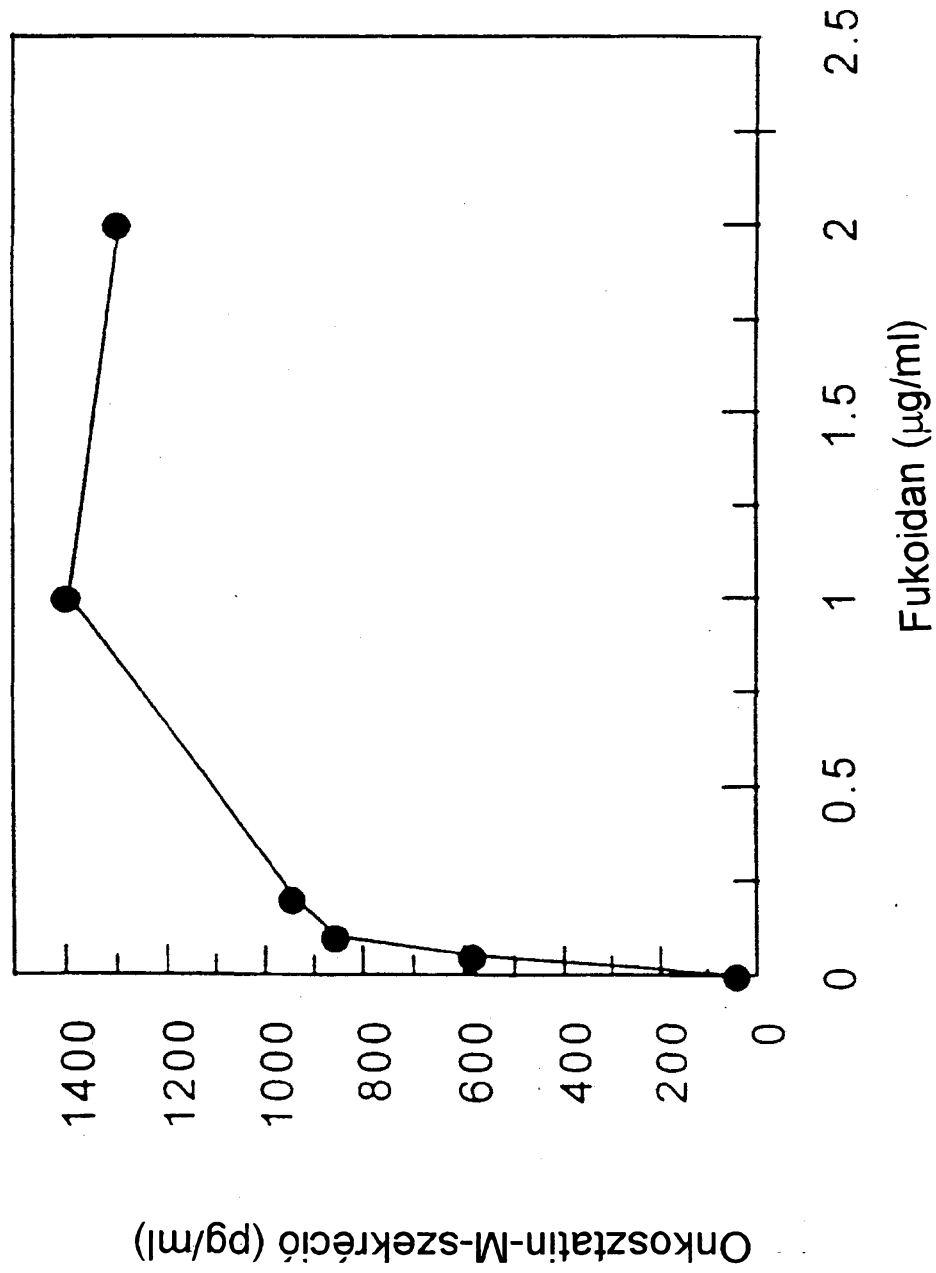




4.a ábra

43

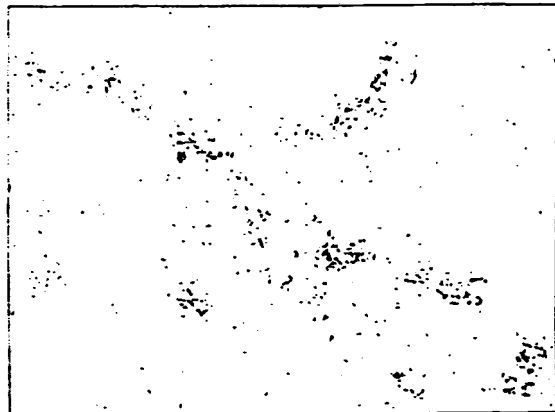
4.b ábra



FA

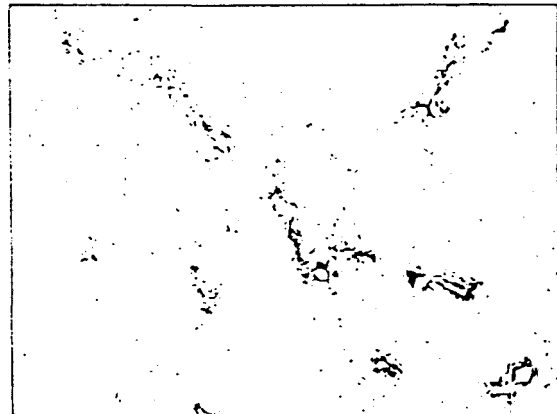
5.a ábra

Rheumatoid Arthritis
A CD130 az ízületi vérerek
endotélsejtjeiben lokalizálódik



5.b ábra

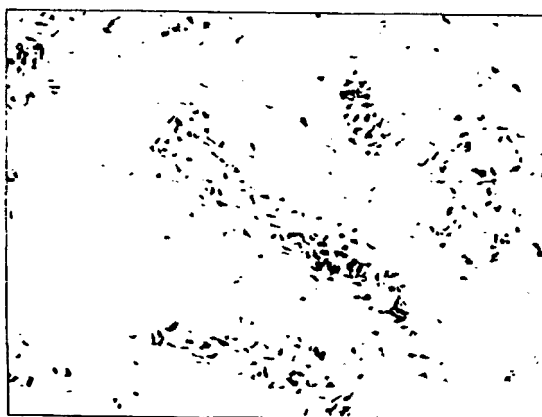
Rheumatoid Arthritis
Az 5.a ábra sorozatmetszete:
a CD62P lokalizálódása azonos
vérerek endotélsejtjeiben



AM

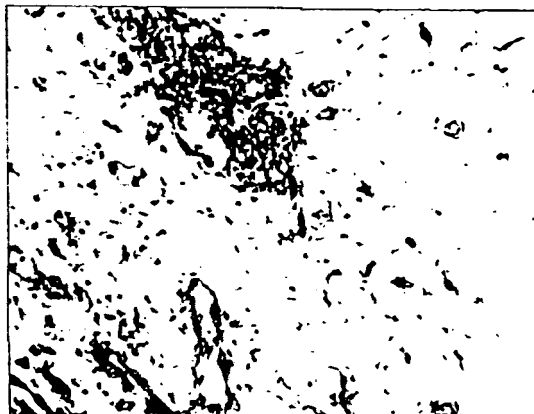
5.c ábra

Rheumatoid Arthritis
A negatív kontroll (kisé nagyobb
nagyítás) nem mutat pozitivitást



5.d ábra

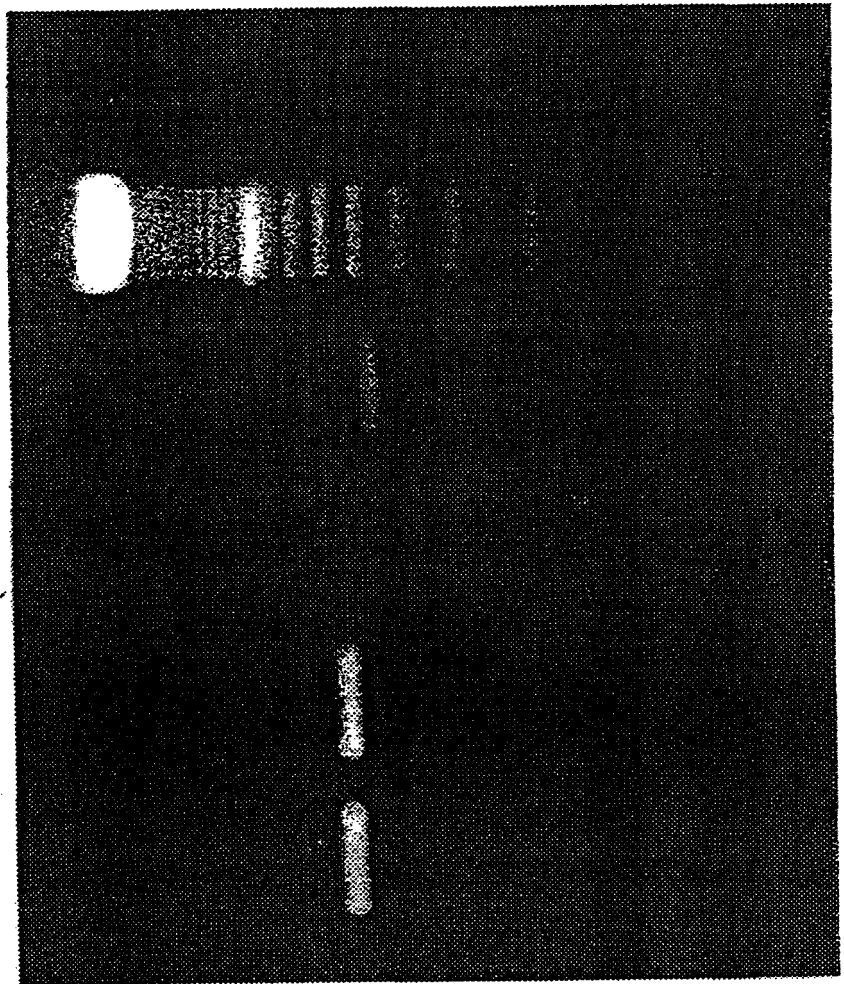
Rheumatoid Arthritis
A CD62 lokalizálódása az endotél-
sejtekben. Kicsi, pozitív vérerek
láthatóak a limfoid aggregátumban
a kép tetején.



fn

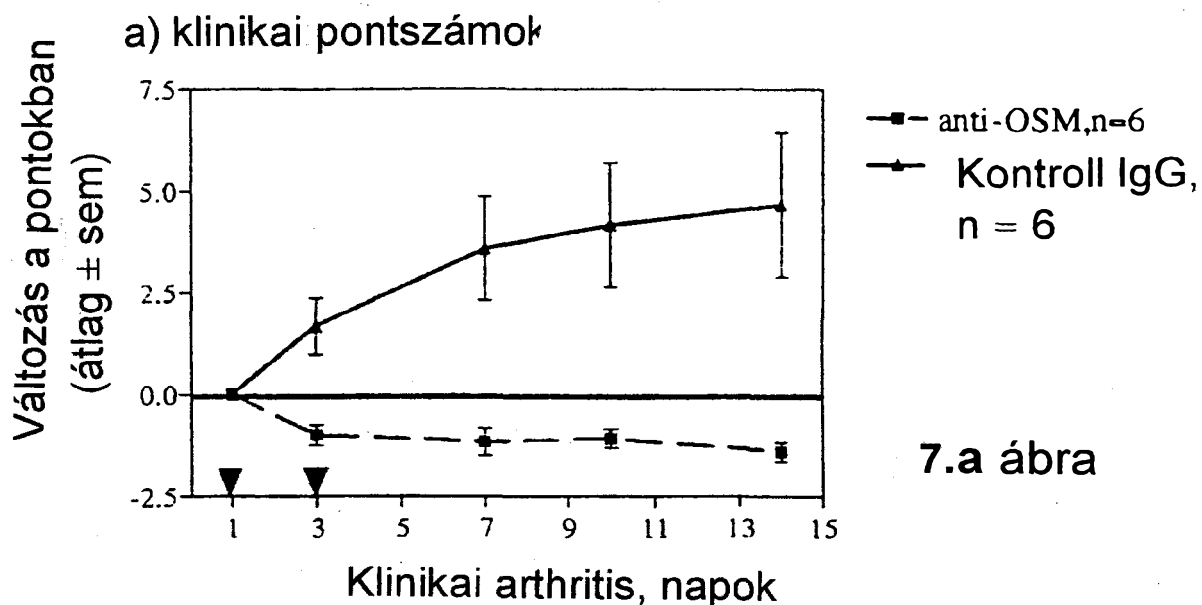
ARTHRITIS - + - + OSM

6. ábra

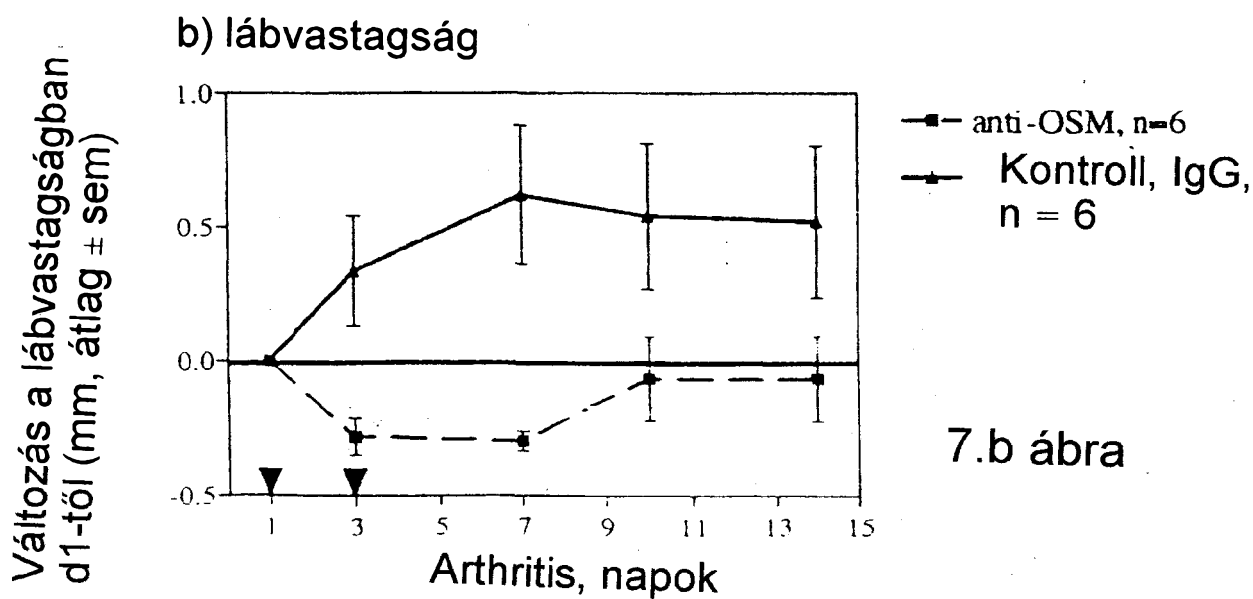


fn

A klinikai tünetek megjelenése utáni 1. és 5. napon kecske eredetű anti-OSM-antitesttel vagy kontroll kecske eredetű IgG-vel kezelt (100 µg/injekció) arthritis-es DBA/1 -egerek



7.a ábra



7.b ábra

Handwritten signature or mark.

8. a ábra



97

8.b ábra



SM

8.c ábra



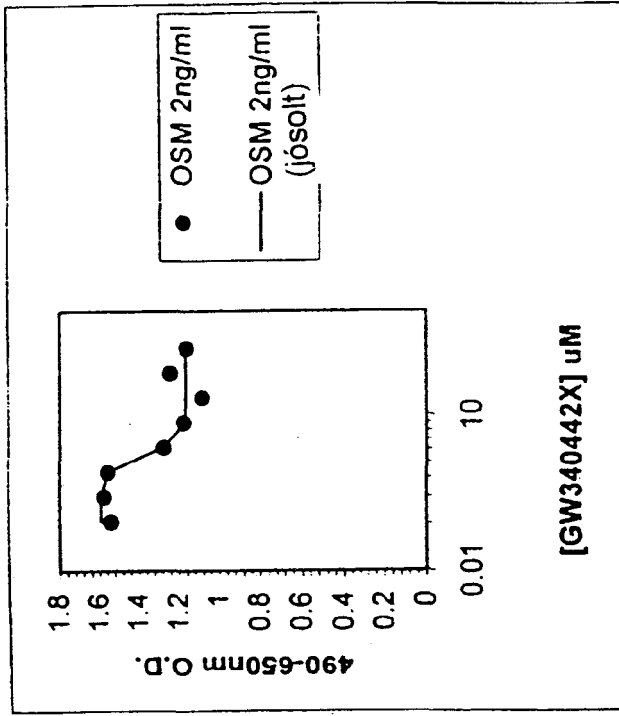
Handwritten mark or signature.

8.d ábra

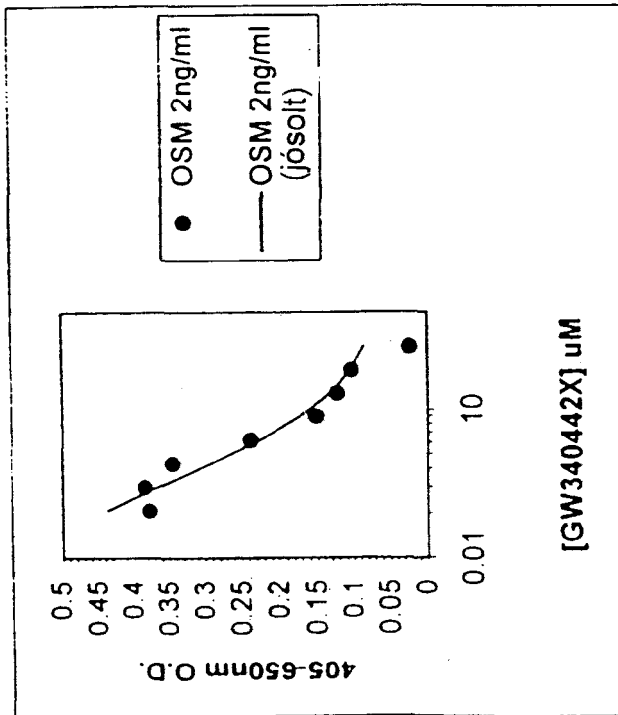


FN

9. ábra



Paraméter	Érték	SE	Alsó CL	Felső CL
a (OSM 2n	1.164684	0.033123	1.07954	1.249829
c (OSM 2ng	1.752591	0.516752	0.821322	3.739794
d (OSM 2n	1.59442	0.038108	1.496461	1.692379
b (OSM 2n	-3.003396	1.935519	-7.978799	1.972006

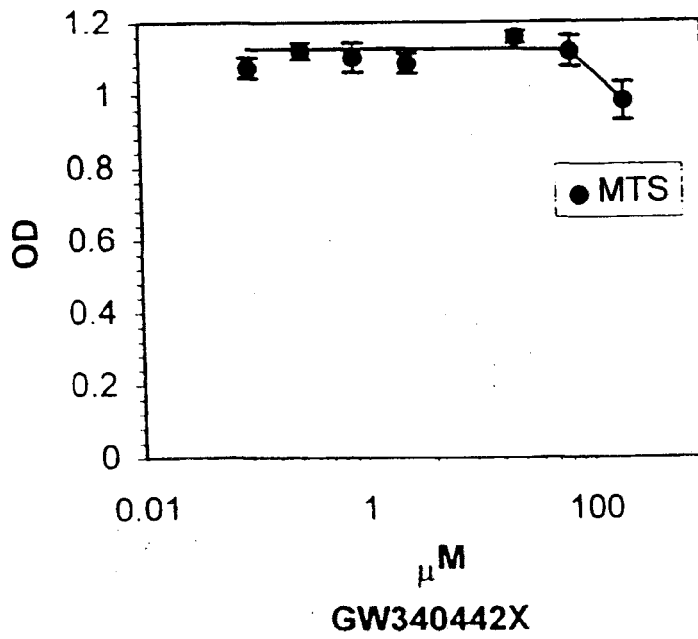
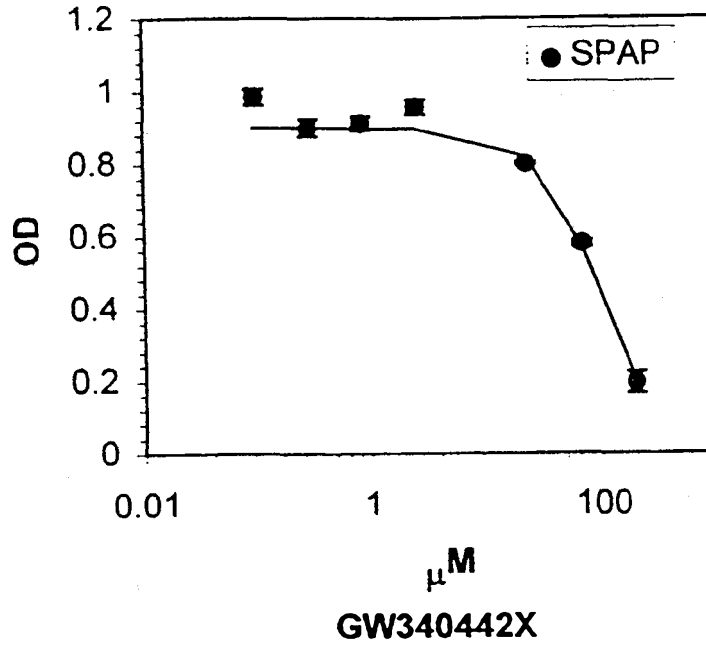


Paraméter	Érték	SE	Alsó CL	Felső CL
a (OSM 2n	0.055	0	0.055	0.055
c (OSM 2ng	0.315071	0.155605	0.094098	1.05496
d (OSM 2n	0.654037	0.043523	0.54754	0.760534
b (OSM 2n	-0.452621	0.08358	-0.657134	-0.248109

MTS Mérési eljárás

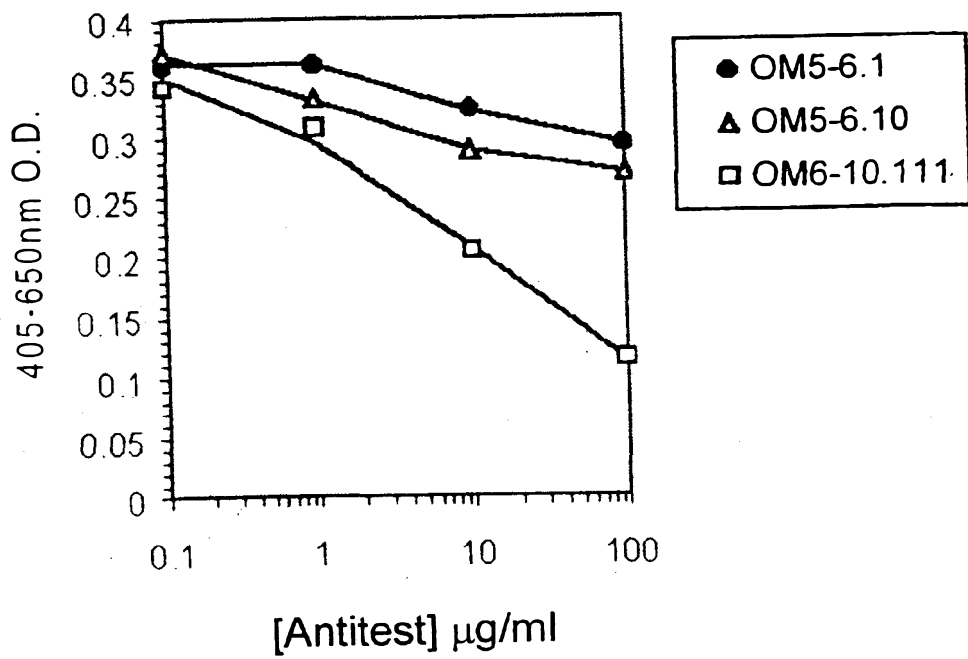
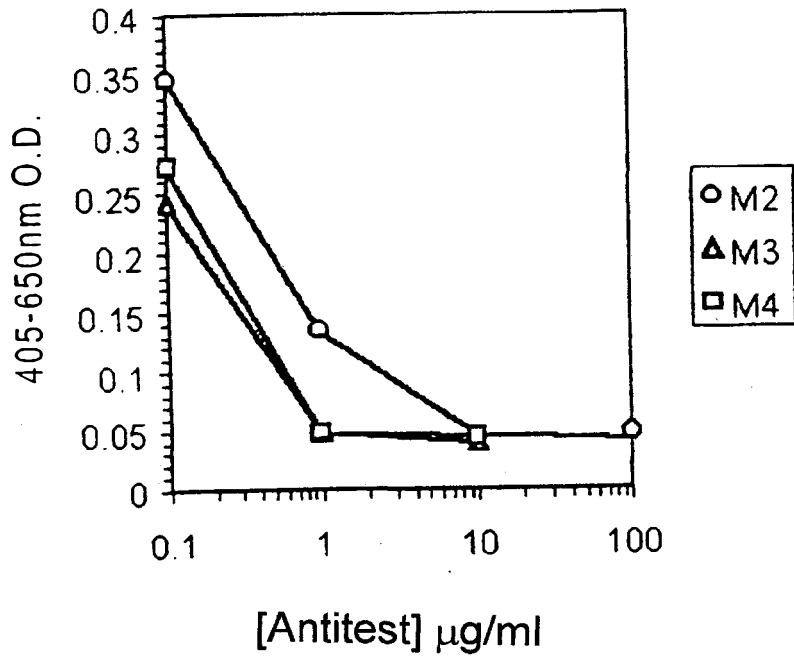
sPAP Mérési eljárás

10. ábra



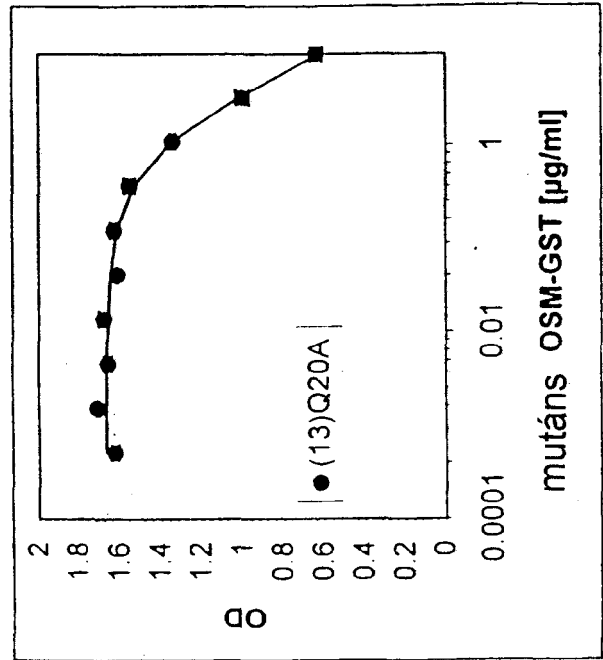
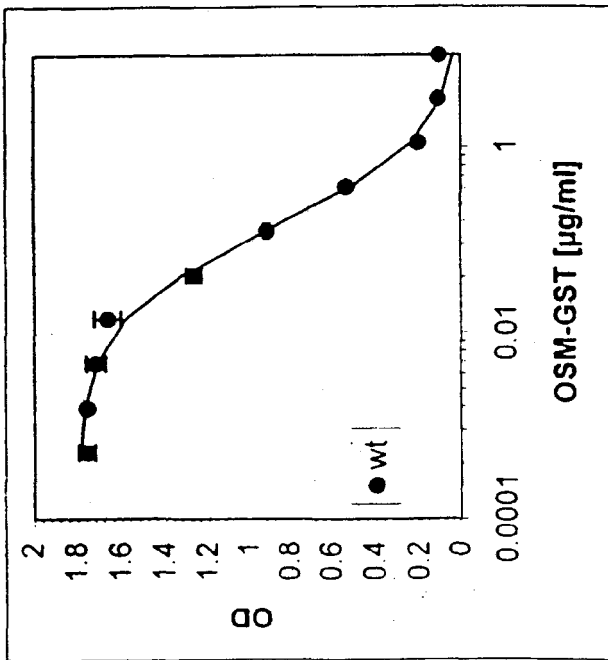
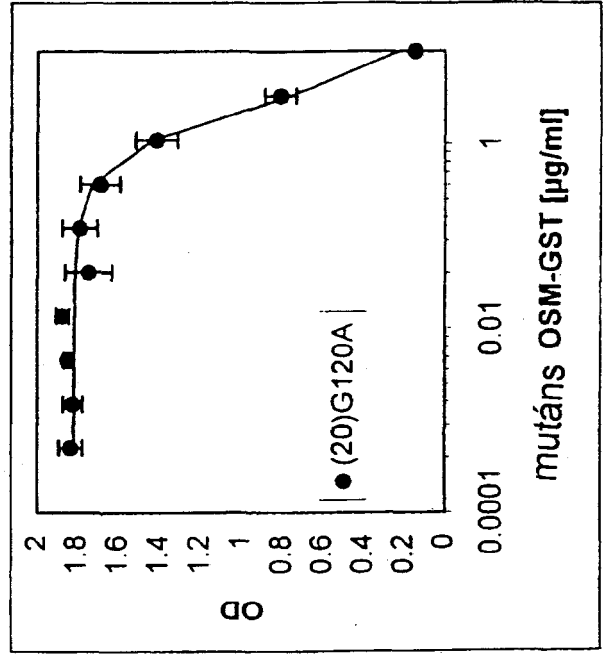
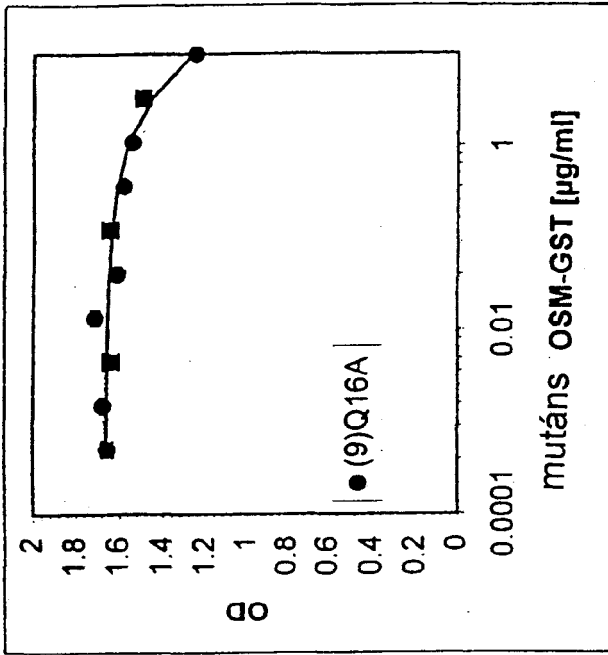
FR

11. ábra



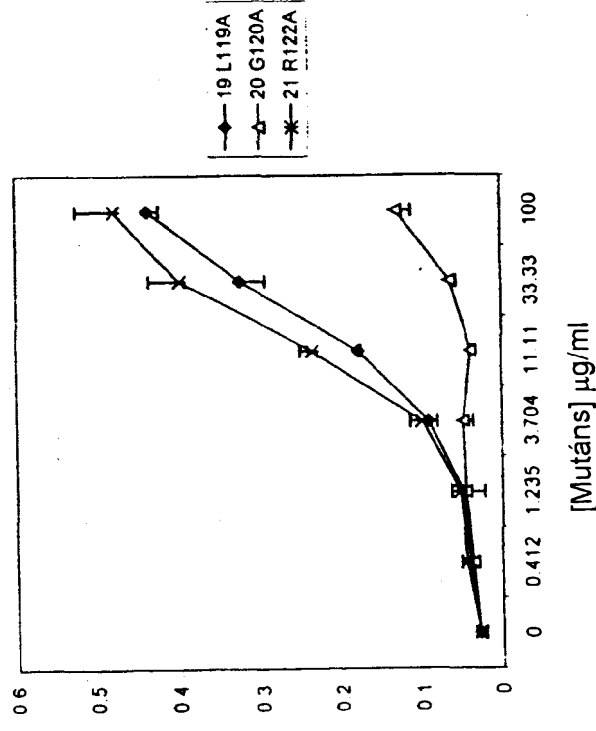
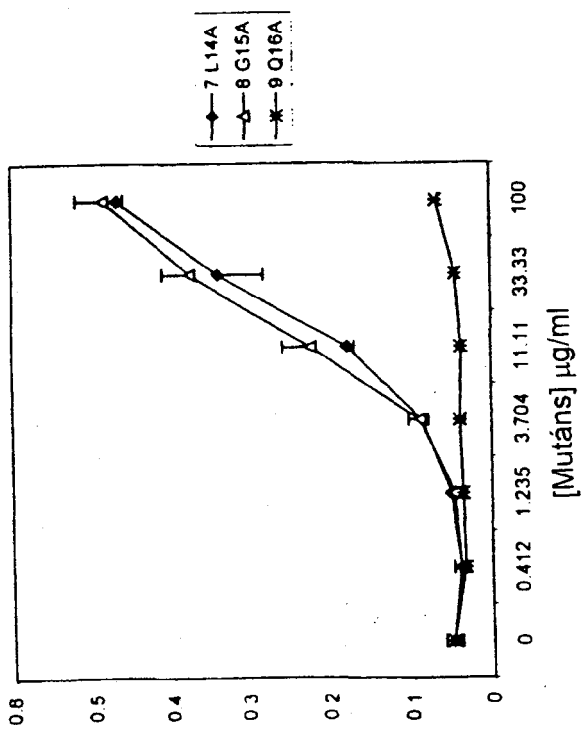
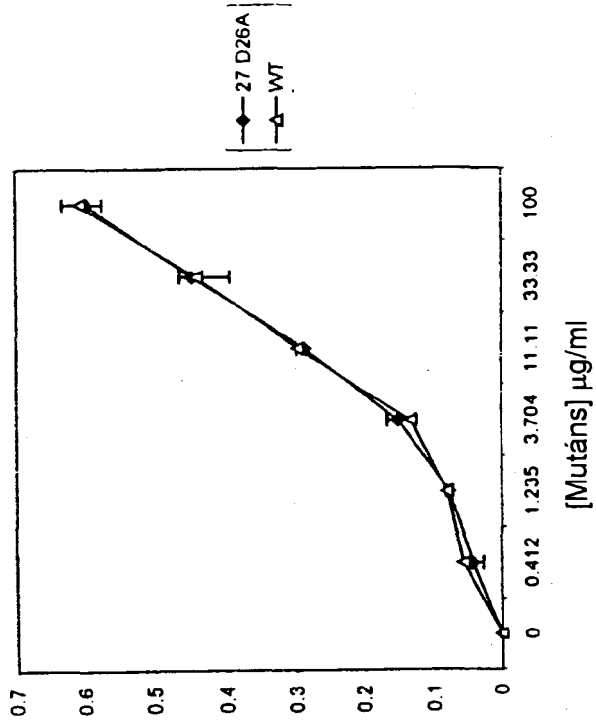
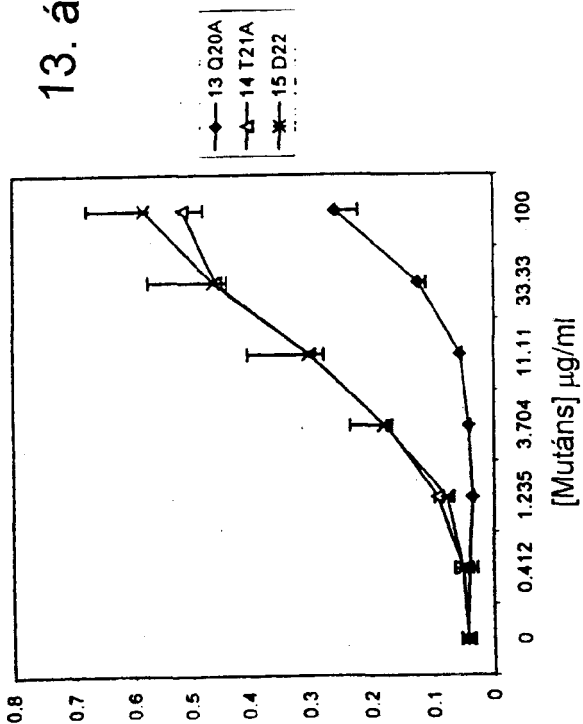
PA

12. ábra



TR

13. ábra



TR