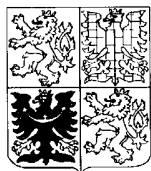


PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **29.01.1998**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **31.01.1997**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1997/9700301**

(33) Země priority: **SE**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **12.01.2000**
(Věstník č. 1/2000)

(86) PCT číslo: **PCT/SE98/00128**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO98/33811**

(21) Číslo dokumentu:

1999 - 2691

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 07 K 7/06
C 07 K 7/08
C 07 K 14/78
A 61 K 38/08
A 61 K 38/10
A 61 K 38/39

(71) Přihlašovatel:

ASTRA AKTIEBOLAG, Södertälje, SE;

(72) Původce:

Bayrak Sinasi, Palo Alto, CA, US;

Holmdahl Rikard, Lund, SE;

Mitchison Avrion, London, GB;

(74) Zástupce:

Hakr Eduard ing., Přístavní 24, Praha 7,
170 00;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Peptidy obsahující T-buněčný epitop
specifický pro kolagen, jejich použití a
farmaceutické přípravky obsahující takové
peptidy**

(57) Anotace:

Peptid, který má aminokyselinovou sekvenci podle vzorce I : A₁-Xaa-Gly-4₄-A₅-Gly-A₇-Xaa-Gly, kde A₁ je aminokyselinový zbytek s aromatickým nebo alifatickým postranním řetězcem, A₄ je asparaginový nebo argininový zbytek nebo aminokyselinový zbytek s aromatickým nebo alifatickým postranním řetězcem, A₅ je jakákoliv přirozeně se vyskytující aminokyselina, A₇ je aminokyselina s negativně nabitým zbytkem, Xaa je jakýkoliv aminokyselinový zbytek a Gly je glycinový zbytek. Použití takových peptidů k léčení, zvláště k léčení autoimunitních nemocí jako je revmatoidní artritida.

Peptidy obsahující T-buněčný epitop specifický pro kolagen, jejich použití a farmaceutické přípravky obsahující takové peptidy

Oblast techniky

Předkládaný vynález poskytuje nové peptidy odvozené z kolagenu CII, způsoby jejich přípravy a jejich použití v terapii, zvláště pro léčení revmatoidní artritidy a příbuzných autoimunitních nemocí.

Dosavadní stav techniky

Molekuly kolagenu patří k hlavním strukturním proteinům pojivové tkáně. Skládají se ze tří polypeptidových řetězců, které vytvářejí rozsáhlou trojšroubovicovou strukturu s jedinečnou repetitivní aminokyselinovou sekvencí X-Y-Gly. Extracelulární matrix chrupavky je jedinečná tím, že obsahuje hlavně kolagen typu II, ale obsahuje i typy IX a XI. CII byl nedávno klonován z myši a byla stanovena celá jeho aminokyselinová sekvence v délce 1419 aminokyselin (Metsarantam et al., 1991, J.Biol. Chem. 266: 16862-9).

Má se zato, že kolagen typu II je "skrytý" před buňkami imunitního systému, neboť se vyskytuje pouze v avaskulárních (neprokrvených) tkáních jako je chrupavka a hmota sklivce oka. Jakožto takto izolovaný protein má CII schopnost, když je injikován s Freundovým kompletním adjuvans, vyvolat tkáňově specifickou autoimunitní nemoc. Tato indukovaná nemoc se nazývá kolagenem indukovaná artritida (CIA). CIA je normálně indukována injekcí cizího CII, který vyvolá produkci

T-buněk a protilátek schopných rozpoznat odpovídající vlastní protein ("self-protein").

Citlivost k CIA u myši je omezena na myši s MHC typu I-A^d a I-A^e. Vazebné motivy těchto molekul jsou podobné motivům lidských DR4 a DR1. proto se věří, že CII je autoantigen v případě revmatoidní artritidy (RA).

Pro léčení RA není dosud k dispozici žádná kauzální terapie. Dosavadní způsoby léčení, jako je např. použití kortikosteroidů, jsou nespecifické, neboť obecně celkově potlačují imunitní odpověď. Současný výzkum naznačil, že důležitou roli v patogenezi RA hrají autoreaktivní T-buňky, což vedlo k představě, že tolerizace těchto patogenních T-buněk nasádním/perorálním podáním imunogenních peptidů by mohla mít léčebný potenciál.

Miyahara, H. et al. (Immunology, 1995, 86: 110-115) popsali použití fragmentu kolagenu typu II pro potlačení artritidy u myši. Avšak použitý fragment (CII 607-621) neobsahoval vazebný motiv pro žádnou z HLA-DR molekul souvisejících s RA u člověka a nemůže být proto použit jako toleragen pro léčení člověka.

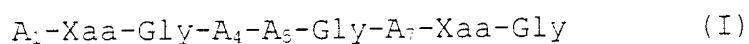
Dokument WO 96/20950 chtěl popsat peptidy z kolagenu typu II schopné vázat se na HLA DRB1 lidského proteinu MHC, což, jak se navrhuje, by mělo být užitečné pro léčení RA. Avšak tyto peptidy, které jsou přítomny v úseku 273 až 404 proteinu kolagenu CII, vykazují pouze slabou účinnost v relevantních testech předpokládané tolerance pro RA. Peptidy podle předkládaného vynálezu mají významně vyšší terapeutickou účinnost.

Předkládaný vynález poskytuje peptidy, o kterých se zjistilo, že byly zvláště účinné v indukci imunitní tolerance k epitopům T-buněk odvozeným z kolagenu CII. Tyto peptidy se

28.07.99

mohou využít pro léčení autoimunitních nemocí jako je revmatoidní artritida.

Předkládaný vynález proto poskytuje izolovaný peptid, který má nebo obsahuje sekvenci aminokyselin podle vzorce (I):



kde

A₁ je aminokyselinový zbytek s aromatickým nebo alifatickým postranním řetězcem,

A₄ je asparaginový nebo argininový zbytek nebo aminokyselinový zbytek s aromatickým nebo alifatickým postranním řetězcem,

A₅ je jakákoliv přirozeně se vyskytující aminokyselina,

A₇ je aminokyselina s negativně nabitým zbytkem,

Xaa je jakýkoliv aminokyselinový zbytek a

Gly je glycinový zbytek.

Peptidy podle předkládaného vynálezu jsou výhodně peptidy, které obsahují 9, 10, 11, 12, 13, 14 nebo 15 aminokyselin, výhodněji jsou to peptidy s 9 aminokyselinami.

Pro peptidy podle předkládaného vynálezu platí následující navzájem nezávislé výhodné znaky:

A₁ je F, I, L, A nebo P a nejvýhodněji F,

A₄ je F, I, L, A, N nebo P a nejvýhodněji F,

A₅ je K nebo R,

A₇ je E, D, Q, P nebo N a nejvýhodněji Q.

K výhodným peptidům podle předkládaného vynálezu patří peptidy buďto obsahující, nebo samy mající, jednu z následujících aminokyselinových sekvencí:

ESG SPG ENG, PPG ADG QPG, ARG NDG QPG, QPG AKG DQG, APG AKG
EAG, PTG VTG PKG, AQG SRG EPG, RVG PPG ANG, PAG ASG NPG, ANG

NPG PAG, TDG IPG AKG, DPG LQG PAG, SAG APG IAG, APG EKG EPG, IAG APG FPG, PQG LAG QRG, FPG PRG PPG, PKG ANG DPG, APG ASG DRG, LPG ARG LTG, DAG PQG KVG, ALG APG APG, PAG ANG EKG, KQG DRG EAG, nebo ARG APG EPG (sekvence identifik. č. 1 až 25); a výhodněji buďto RVG PPG ANG (sekvence id. č. 8) nebo ANG NPG PAG (sekvence id. č. 10).

K příkladům výhodných peptidů podle předkládaného vynálezu patří také peptidy buďto obsahující, nebo samy mající, jednu z následujících aminokyselinových sekvencí:

VKG ESG SPG ENG SPG; FAG PPG ADG QPG AKG; AAG ARG NDG QPG PAG; ADG QPG AKG DQG EAG; APG AKG EAG PTG ARG; PQG PTG VTG PKG ARG; PEG AQG SRG EPG NPG; AAG RVG PPG ANG NPG; PAG ASG NPG TDG IPG; PPG ANG NPG PAG PPG; NPG TDG IPG AKG SAG; RAG DPG LQG PAG APG; AKG SAG APG IAG APG; PAG APG EKG EPG DDG, APG IAG APG FPG PRG; PPG PQG LAG QRG IVG; APG FPG PRG PPG PQG; LAG PKG ANG DPG RPG; KQG APG ASG DRG PPG; EPG LPG ARG LTG RPG; RPG DAG PQG KVG PSG; ETG ALG APG APG PPG; PPG PAG ANG EKG EVG, PTG KQG DRG EAG AQG; nebo STG ARG APG EPG ETG (sekvence identifik. č. 26 až 52); výhodněji AAG RVG PPG ANG NPG (sekvence id. č. 33), a nejvýhodněji PPG ANG NPG PAG PPG (sekvence id. č. 35).

Výhodně peptidy podle předkládaného vynálezu obsahují sekvenci 9 až 15 aminokyselin přítomnou v nepřerušném sledu v úseku 701 až 721 kolagenu II.

Předkládaný vynález se také týká peptidu, který obsahuje epitop T-buňky specifický pro kolagen II, kterýžto peptid obsahuje alespoň 9 aminokyselin v nepřerušené souvislé sekvenci shodné se sekvencí vybranou z úseků 110 až 239, 338 až 379 a 587 až 895 sekvence kolagenu II, kde každá

aminokyselin je volitelně nahrazena funkčně ekvivalentní aminokyselinou, přičemž peptid má vzorec (I) definovaný výše.

Vynález dále poskytuje farmaceutický přípravek obsahující peptid podle předkládaného vynálezu ve spojení s farmaceuticky přijatelným nosičem nebo ředidlem. Přípravek se výhodně použije k tomu, že poskytne toleranci k autoimunitní nemoci jako je např. revmatoidní artritida nebo relapsující polychondritida.

Vynález dále poskytuje použití peptidu podle předkládaného vynálezu nebo přípravku podle předkládaného vynálezu pro výrobu léku pro použití při léčení autoimunitních nemocí.

Vynález se dále týká způsobu léčení člověka nebo zvířete trpícího autoimunitní nemocí jako je např. revmatoidní artritida nebo relapsující polychondritida, kterýžto způsob obsahuje podávání člověku nebo zvířeti terapeuticky účinného množství peptidu nebo přípravku podle vynálezu.

Peptidy podle předkládaného vynálezu se mohou připravit způsoby, které jsou odborníkovi známy. Např. to může být pomocí standardní techniky postupné kondenzace (vytváření peptidové vazby) na pevné fázi pomocí automatického syntetizátoru peptidů (viz např. Jones, J. The Chemical Synthesis of Peptides, pp 132-156, First edition, Oxford University Press, 1991, a R. Epton (ed) Innovation and Perspectives in Solid Phase Peptide Synthesis, SPCC (UK), Ltd, 1990). Příprava začíná od C-koncové aminokyseliny, kterou je možné získat již naroubovanou na metylbenzhydrylamin, benzhydrylamin nebo chlormetylovanou pryskyřici, nebo na jiný vhodný pevný nosič. Další aminokyseliny se přidávají postupně krok za krokem po té, co byly ochráněny jejich postranní řetězce. Při této kondenzační metodě jsou alfa-aminoskupiny aminokyselin chráněny pomocí

F-moc nebo t-Boc. Ochranné skupiny pro postranní řetězce aminokyselin jsou v oboru dobře známy. Celý chráněný peptid se uvolní z chlormetylované pryskyřice amoniolýzou, čímž se získá chráněný amid, nebo z metylbenzhydrylaminové nebo benzhydrolaminové pryskyřice acidolýzou.

Peptidy podle předkládaného vynálezu mohou být také připraveny metodou v roztoku, buďto postupnou kondenzací nebo kondenzací fragmentů (viz např.: Jones, 1. The Chemical Synthesis of Peptides, pp 1 15-131, First edition, Oxford University Press, 1991). Aminokyselina s vhodně chráněnou alfa-aminoskupinou se naváže na aminokyselinu s vhodně chráněnou alfa-karboxylovou skupinou (v závislosti na vybrané metodě syntézy tato ochrana nemusí být nutně potřeba) pomocí diimidů, symetrických nebo nesymetrických anhydridů nebo pomocí jiných kondenzačních činidel nebo způsobů odborníkovi známých. Tyto způsoby mohou být buďto chemické nebo enzymatické. Skupiny chránící alfa-aminoskupinu a/nebo alfa-karboxylovou skupinu se odstraní a další vhodně chráněná aminokyselina nebo blok aminokyselin se připojí, čímž se prodlouží rostoucí peptid. V každé syntéze je možné použít různé kombinace ochranných skupin a chemických/enzymatických způsobů a strategie kondenzace/syntézy peptidu.

Peptidy podle předkládaného vynálezu jsou definovány tím, že obsahují T-buněčný epitop. Jinými slovy tedy jsou schopné aktivovat T-buňky. Existuje několik známých způsobů, jak stanovit sílu vazby. Výhodně je peptid podle předkládaného vynálezu schopen aktivovat T-buňku s vazebnou silou nejméně 2 podle uvolňovacího IFN- γ testu a/nebo s hodnotou stimulačního indexu nejméně 3. Test uvolňování IFN- γ lze provádět způsoby v oboru známými nebo způsobem, který je dále popsán v příkladech. Podobně stimulační index může být stanoven pomocí v oboru známých proliferčních

testů, např. testem popsaným v "Analysis of type II collagen reactive T cells in mouse", Andersson a Holmdahl, Eur. J. Immunol. 20: 1061 -1066, 1990. Výhodně se test provádí způsobem popsaným v příkladech této přihlášky.

Peptidy podle vynálezu jsou využitelné v léčení aniž by byly modifikovány, ale alternativně je možné peptidy modifikovat, např. mohou být konjugovány, tj. kovalentně navázány, na nosičový systém, např. na mukózní vazebné struktury jako je např. cholerový β -toxin, což napomáhá absorpci ve střevu.

Peptidy podle předkládaného vynálezu se mohou užít pro léčení, profylaxi nebo stanovení diagnózy autoimunitních nemocí a termíny "terapie" nebo "léčení" užívané v tomto textu je třeba chápat tak, že zahrnují současně i profylaxi a diagnostiku.

Peptid podle předkládaného vynálezu je izolovaný peptid, to znamená, že k peptidům podle předkládaného vynálezu nepatří peptidy přítomné v organismu. Peptidy podle vynálezu mohou být buďto z přirozených nebo rekombinantně připravených peptidů nebo proteinů nebo mohou být syntetizovány chemicky, jak se popisuje v této přihlášce.

Sloučeniny podle vynálezu se mohou podávat v dávkách od 10 μ g do 10 mg na den buď jako jediná dávka nebo rozdělené do 2 až 4 dávek na den. Jednotková léková forma obsahuje dávku 2,5 μ g až 10 mg sloučeniny podle předkládaného vynálezu. Sloučenina podle vynálezu se může podávat intranasálním způsobem ve formě roztoku, suspenze, HFA aerosolu nebo ve formě přípravku obsahujícího suchý prášek, např. pomocí aplikátoru Turbuhaler®, nebo systémovým způsobem, např. perorálně ve formě tablet, pilulek, tobolek, sirupů, prášku, granulátu, a nebo také parenterálně ve formě sterilních

parenterálních roztoků nebo suspenzí, nebo také rektálně ve formě čípků.

Sloučeniny podle předkládaného vynálezu se mohou podávat samy o sobě nebo ve formě farmaceutického přípravku, který obsahuje sloučeninu podle vynálezu v kombinaci s farmaceuticky přijatelným ředidlem, adjuvans nebo nosičem. Zvláště výhodné jsou takové sloučeniny, které neobsahují látky schopné vyvolat nepříznivou, např. alergickou, reakci.

Práškové přípravky a tlakově balené HFA aerosoly sloučenin podle vynálezu se mohou podávat nasální inhalací. Pro inhalaci je sloučenina podle vynálezu jemně rozdrobněna. Rozdrobněná sloučenina má výhodně částice se statistickým středním průměrem (dle hmotnosti) 10 μm a je suspendována ve směsi propelentů za pomoci dispergačního činidla, jako je např. mastná kyselina obsahující 8 až 20 atomů uhlíku (např. kyselina olejová) nebo její sůl, žlučová sůl, fosfolipid, alkylsacharid, perfluorovaný nebo polyetoxylovaný surfaktant nebo jiné farmaceuticky přijatelné dispergační činidlo.

Sloučeniny podle předkládaného vynálezu se také mohou podávat prostřednictvím inhalátoru pro suchý prášek. Takový inhalátor může být buď jednodávkový nebo vícedávkový inhalátor a může to být dechově ovládaný inhalátor suchého prášku.

Jednou možností přípravy je smíchat jemně rozdrobněnou sloučeninu podle vynálezu s nosičovou látkou, např. mono-, di- nebo polysacharidem, cukerným alkoholem nebo jinými polyoly. Vhodnými nosiči jsou cukry, např. laktóza, glukóza, rafinóza, malezitóza, laktitol, maltitol, trehalóza, sacharóza, manitol a škrob. Alternativně se jemně rozdrobněná sloučenina může obalit (potáhnout) jinou látkou. Prášková směs se také může plnit do tvrdých želatinových tobolek, z nichž každá obsahuje požadovanou dávku účinné látky.

Farmaceutický přípravek obsahující sloučeninu podle předkládaného vynálezu je výhodně ve formě tablet, pilulek, tobolek, sirupů, prášku nebo granulátu pro perorální podávání nebo ve formě sterilních roztoků nebo suspenzí pro parenterální podávání nebo ve formě čípků pro rektální podávání.

Pro perorální podávání se může účinná látka smíchat s adjuvans nebo nosičem, jakým je např. laktóza, sacharóza, sorbitol, manitol, nebo škroby, jako bramborový, kukuřičný škrob nebo amylopektin, deriváty celulózy, pojídlem jako je např. želatina nebo polyvinylpyrolidon, a lubrikantem, jako je např. stearan hořečnatý, stearan vápenatý, polyetylglykol, vosky, parafin apod., a pak lisovat do tablet.

Pokud jsou požadovány potahované tablety, jádro připravené způsobem popsaným výše, se může potáhnout koncentrovaným cukerným roztokem, který může obsahovat arabskou gumu, želatinu, mastek, oxid titaničitý apod. Alternativně může být tableta potažena vhodným polymerem rozpuštěným v těkavém organickém rozpouštědle.

Pro přípravu měkkých želatinových tobolek se může sloučenina podle předkládaného vynálezu smíchat např. s rostlinným olejem nebo polyetylglykolem. Tvrdé želatinové tobolky mohou obsahovat granulát sloučeniny buďto s výše popsanými pomocnými látkami pro tablety, např. laktózou, sacharózou, sorbitolem, manitolem, škroby, deriváty celulózy nebo želatinou. Do tvrdých želatinových tobolek se také mohou plnit kapalně nebo polotuhé formy léčiva.

Kapalné přípravky pro perorální podávání mohou být ve formě sirupů nebo suspenzí, např. ve formě roztoků obsahujících sloučeninu podle vynálezu a cukr, a dále směs etanolu, vody, glycerolu a propylenglykolu. Volitelně mohou

takové kapalně připravky obsahovat barviva, chuťová a vonná korigencia, sacharin a karboxymethylcelulózu jako zahušťovadlo, případně další pomocné látky odborníkovi známé.

Předkládaný vynález je dále ilustrován pomocí příkladu, které ho v žádném případě nijak neomezuji.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Řetězce peptidů CII, uvedené v tabulce 1, z nichž každý se skládá z 15 aminokyselin, byly syntetizovány pomocí automatického syntetizátoru SMPS 350 (Zinsser, Frankfurt/Main, Německo) chemickou cestou s Fmoc (Atherton, Sheppard, Solid Phase Peptide Synthesis - A Practical Approach. IRL Press, Oxford). Každý peptid byl acetylován na svém N-konci a amidován na C-konci. Kvalita peptidu byla hodnocena pomocí HPLC a hmotnostní spektroskopii vzorku peptidu byla potvrzena očekávaná molekulová hmotnost.

Úsek aminokyselin, který je zobrazen tučným písmem, je tzv. sekvence jádra, tj. úseku aminokyselin, který se váže nejsilněji, ve srovnání s vazebnou silou strukturně blízce příbuzných peptidů.

Tabulka 1

Peptid	aminokyselinové zbytky	Peptid	aminokyselinové zbytky
110-124	VKG ESG SPG ENG SPG	635-649	FAG PPG ADG QPG AKG
140-154	AAG ARG NDG QPG PAG	641-655	ADG QPG AKG DQG EAG
161-175	GPG FPG APG AKG EAG	665-679	PSG APG P G PTG VTG
170-184	APG AKG EAG PTG ARG	677-691	PQG PTG VTG PKG ARG
185-199	PEG AQG SRG EPG NPG	701-715	AAG RVG PPG ANG NPG
203-217	PAG ASG NPG TDG IPG	707-721	PPG ANG NPG PAG PPG
209-223	NPG TDG IPG AKG SAG	740-754	RAG DPG LQG PAG APG
218-232	AKG SAG APG IAG APG	749-763	PAG APG EKG EPG DDG
224-238	APG IAG APG FPG PRG	770-784	PPG PQG LAG QRG IVG
230-244	APG FPG PRG PPG PQG	779-793	QPG IVG LPG QPG ERG
338-352	LAG PKG ANG DPG RPG	806-820	KQG APG ASG DRG PPG
353-367	EPG LPG ARG LTG RPG	821-835	PVG PPG LTG PAG EPG
365-379	RPG DAG PQG KVG PSG	857-871	ETG ALG APG APG PPG
593-607	PPG PAG ANG EKG EVG	881-895	PTG KQG DRG EAG AQG
614-628	STG ARG APG EPG ETG		

Příklad 2

Myši CII byl extrahován z mečovitého výběžku kosti hrudní známým způsobem pepsinového štěpení a pak dále purifikován vysolením. Krysí CII byl purifikován ze Swarmova chondrosarkomu opět známým způsobem. Kolageny byly rozpuštěny v 0,1M kyselině octové. Kolagen, který se užil pro restimulaci buněk primárních lymfatických uzlin byl denaturován inkubováním 30 minut v 56 °C.

Příklad 3

Aby mohla být testována proliferační odpověď a uvolňování cytokinů odebranými buňkami lymfatických uzlin, byly samci myši (B10.Q X DBA/1)F1 ve stáří 7 až 10 týdnů imunizováni do chodidla zadních končetin 50 µg myšího CII nebo syntetického peptidu emulgovaného v CFA (obsahující H37Ra, Difco, Detroit, MI). Artritida byla indukována u stejných myši ve stáří 7 až 10 týdnů tím, že se myši imunizovaly do kořene ocasu dávkou 100 µg krysího CII emulgovaného CFA připraveného podle příkladu 2.

Po 5 týdnech byla imunitní reakce myši zesílena dávkou 50 µg CII emulgovaného v hmotnostním poměru 1:1 IFA (Difco, Detroit, MI). Ze silně artritických kloubů byly odsátím odebrány buňky lymfatických uzlin, sloučeny a dále popsaným způsobem testovány v proliferačním testu na reaktivitu s panelem myších peptidů CII připravených podle příkladu 1.

Uvolňování cytokinů bylo testováno v 50 µl supernatantu z indukovaných kultur buněk primárních lymfatických uzlin, které byly restimulovány *in vitro* panelem peptidů CII připravených podle příkladu 1 pomocí minisouprav IFN-γ a IL-4 (Endogen, Cambridge, MA). Výsledky jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2

Peptid	SI	výdej IFN- γ (ng/ml)	Peptid	SI	výdej IFN- γ (ng/ml)
110-124	2,2	2,2	635-649	2,7	0,4
140-154	2,1	1,5	641-655	2,0	0,9
161-175	3,1	4,2	665-679	3,5	1,5
170-184		1,5	677-691	2,2	2,9
185-199	4,1	1,9	701-715	18,0	2,5
203-217	3,6	6,5	707-721	19,4	5,8
209-223	5,2		740-754	2,8	2,4
218-232	3,9	2,3	749-763	4,8	1,0
224-238	5,0	4,4	770-784	2,7	1,4
230-244	3,9	5,8	779-793	3,9	
338-352	4,4	2,0	806-820	2,3	
353-367	3,1	1,5	821-835		1,8
365-379	2,8		857-871	2,4	0,3
593-607	2,9	0,7	881-895	2,6	0,6
614-628	2,7	2,3			

Příklad 4

Z buněk lymfatických uzlin myši indukovaných myším CII byly odebrány buďto T nebo B buňky pomocí magneticky aktivovaného třídíče buněk (MACS) se superparamagnetickými mikroperličkami konjugovanými s krysí monoklonální anti-myší protilátkou L3T4 (CD4) nebo krysí anti-myší protilátkou B220 CD45R) (obě protilátky od Miltenyi Biotec GmbH, Bergish Gladbach, Německo) v podstatě podle doporučení výrobce, kromě toho, že PBS/BSA pufr byla nahrazen PBS obsahujícím 2% FCS, 5mM EDTA, 50 μ M 2-ME a 10mM HEPES. Frakce byly analyzovány

průtokovým cytometrem FACScan (Becton Dickinson) pomocí konjugátu (FITC-anti-myši CD3-ε) pro označení (obarvení) T-buněk a konjugátu (FITC-anti-myši lehký řetězec κ) pro označení B-buněk (Pharmigen, San Diego, CA). Buňky byly po separaci třikrát propláchnuty médiem DMEM bez séra a pak použity v proliferačním testu podle příkladu 3. Obohacené T-buňky CD4+ jakožto buňky prezentující antigen byly smíchány s buňkami sleziny ze syngenních myši v hmotnostním poměru 1:2. Buňky AP byly použity ve formě suspenze jednotlivých buněk ze slezin ošetřených 0,84% NH_4Cl při pH 7,4, aby došlo k lýze červených krvinek.

Tabulka 3

Buněčný typ	CPM x 10 ⁻³
nefrakcionované	13,6
CD4+ obohacené	21,4
CD4+ ochuzené	0,3
CD45R obohacené	12,5
CD45R ochuzené	0,4

SEZNAM SEKVENCÍ

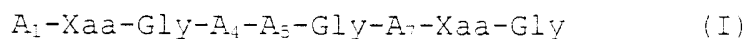
Sekvence id. č. 1: ESG SPG ENG
Sekvence id. č. 2: PPG ADG QPG
Sekvence id. č. 3: ARG NDG QPG
Sekvence id. č. 4: QPG AKG DQG
Sekvence id. č. 5: APG AKG EAG
Sekvence id. č. 6: PTG VTG PKG
Sekvence id. č. 7: AQG SRG EPG
Sekvence id. č. 8: RVG PPG ANG
Sekvence id. č. 9: PAG ASG NPG
Sekvence id. č. 10: ANG NPG PAG
Sekvence id. č. 11: TDG IPG AKG
Sekvence id. č. 12: DPG LQG PAG
Sekvence id. č. 13: SAG APG IAG
Sekvence id. č. 14: APG EKG EPG
Sekvence id. č. 15: IAG APG FPG
Sekvence id. č. 16: PQG LAG QRG
Sekvence id. č. 17: FPG PRG PPG
Sekvence id. č. 18: PKG ANG DPG
Sekvence id. č. 19: APG ASG DRG
Sekvence id. č. 20: LPG ARG LTG
Sekvence id. č. 21: DAG PQG KVG
Sekvence id. č. 22: ALG APG APG
Sekvence id. č. 23: PAG ANG EKG
Sekvence id. č. 24: KQG DRG EAG
Sekvence id. č. 25: ARG APG EPG
Sekvence id. č. 26: VKG ESG SPG ENG SPG
Sekvence id. č. 27: FAG PPG ADG QPG AKG
Sekvence id. č. 28: AAG ARG NDG QPG PAG
Sekvence id. č. 29: ADG QPG AKG DQG EAG
Sekvence id. č. 30: APG AKG EAG PTG ARG

Sekvence id. č. 31: PQG PTG VTG PKG ARG
Sekvence id. č. 32: PEG AQG SRG EPG NPG
Sekvence id. č. 33: AAG RVG PPG ANG NPG
Sekvence id. č. 34: PAG ASG NPG TDG IPG
Sekvence id. č. 35: PPG ANG NPG PAG PPG
Sekvence id. č. 36: NPG TDG IPG AKG SAG
Sekvence id. č. 37: RAG DPG LQG PAG APG
Sekvence id. č. 38: AKG SAG APG IAG APG
Sekvence id. č. 39: PAG APG EKG EPG DDG
Sekvence id. č. 40: APG IAG APG FPG PRG
Sekvence id. č. 41: PPG PQG LAG QRG IVG
Sekvence id. č. 42: APG FPG PRG PPG PQG
Sekvence id. č. 43: LAG PKG ANG DPG RPG
Sekvence id. č. 44: KQG APG ASG DRG PPG
Sekvence id. č. 45: EPG LPG ARG LTG RPG
Sekvence id. č. 46: RPG DAG PQG KVG PSG
Sekvence id. č. 47: EXG ALG APG APG PPG
Sekvence id. č. 48: PPG PAG ANG EKG EVG
Sekvence id. č. 49: PTG KQG DRG EAG AQG
Sekvence id. č. 50: STG ARG APG EPG ETG
Sekvence id. č. 51: AAG RVG PPG ANG NPG
Sekvence id. č. 52: PPG ANG NPG PAG PPG

28.07.99

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Izolovaný peptid, který má aminokyselinovou sekvenci podle vzorce (I):



kde

A₁ je aminokyselinový zbytek s aromatickým nebo alifatickým postranním řetězcem,

A₄ je asparaginový nebo argininový zbytek nebo aminokyselinový zbytek s aromatickým nebo alifatickým postranním řetězcem,

A₅ je jakákoliv přirozeně se vyskytující aminokyselina,

A₇ je aminokyselina s negativně nabitým zbytkem,

Xaa je jakýkoliv aminokyselinový zbytek a

Gly je glycinový zbytek.

2. Izolovaný peptid, obsahující aminokyselinovou sekvenci kteréhokoliv z peptidů podle nároku 1.
3. Peptid podle nároku 2, který obsahuje 10 až 15 aminokyselin.
4. Peptid podle nároku 1, kde A₅ je lysinový nebo argininový zbytek a A₇ je zbytek kyseliny glutamové.
5. Izolovaný peptid, který má kteroukoliv z následujících sekvencí:
ESG SPG ENG,
PPG ADG QPG,
ARG NDG QPG,
QPG AKG DQG,

APG AKG EAG,
PTG VTG PKG,
AQG SRG EPG,
RVG PPG ANG,
PAG ASG NPG,
ANG NPG PAG,
TDG IPG AKG,
DPG LQG PAG,
SAG APG IAG,
APG EKG EPG,
IAG APG FPG,
PQG LAG QRG,
FPG PRG PPG,
PKG ANG DPG,
APG ASG DRG,
LPG ARG LTG,
DAG PQG KVG,
ALG APG APG,
PAG ANG EKG,
KQG DRG EAG, nebo
ARG APG EPG (sekvence id. č. 1 až 25).

6. Izolovaný peptid, který obsahuje aminokyselinovou sekvenci
kteréhokoliv peptidu podle nároku 3.

7. Izolovaný peptid, který má kteroukoliv z následujících
sekvencí:

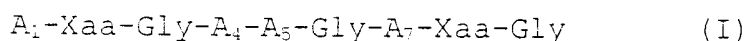
VKG ESG SPG ENG SPG;
FAG PPG ADG QPG AKG;
AAG ARG NDG QPG PAG;
ADG QPG AKG DQG EAG;
APG AKG EAG PTG ARG;

PQG PTG VTG PKG ARG;
PEG AQG SRG EPG NPG;
AAG RVG PPG ANG NPG;
PAG ASG NPG TDG IPG;
PPG ANG NPG PAG PPG;
NPG TDG IPG AKG SAG;
RAG DPG LQG PAG APG;
AKG SAG APG IAG APG;
PAG APG EKG EPG DDG;
APG IAG APG FPG PRG;
PPG PQG LAG QRG IVG;
APG FPG PRG PPG PQG;
LAG PKG ANG DPG RPG;
KQG APG ASG DRG PPG;
EPG LPG ARG LTG RPG;
RPG DAG PQG KVG PSG;
ETG ALG APG APG PPG;
PPG PAG ANG EKG EVG;
PTG KQG DRG EAG AQG; nebo
STG ARG APG EPG ETG (sekvence id. č. 26 až 52).

8. Izolovaný peptid, který je fragmentem 10 až 14 aminokyselin z kteréhokoliv peptidu podle nároku 7.
9. Peptid podle kteréhokoliv z předchozích nároků, který se váže na T-buňky s vazebnou silou alespoň 2 podle testu uvolňování IFN- γ .
10. Peptid podle kteréhokoliv z předchozích nároků, který se váže na T-buňky se stimulačním indexem alespoň 3.

11. Peptid podle kteréhokoliv z předchozích nároků, přičemž sekvence peptidu se vyskytuje v sekvenci kolagenu II v úsecích 110 až 239, 338 až 379 nebo 587 až 895.
12. Peptid podle nároku 11, přičemž sekvence peptidu se vyskytuje v sekvenci kolagenu II v úseku 701 až 721.
13. Izolovaný peptid podle kteréhokoliv z předchozích nároků pro použití k léčení.
14. Peptid podle nároku 13, kde léčení obsahuje indukci tolerance.
15. Použití izolovaného peptidu podle kteréhokoliv z předchozích nároků pro výrobu léku pro použití k léčení autoimunitních nemocí.
16. Použití podle nároku 15, kde autoimunitní nemoc je revmatoidní artritida.
17. Farmaceutický přípravek v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje peptid podle kteréhokoliv z nároků 1 až 12 ve spojení s farmaceuticky přijatelným nosičem nebo ředidlem.
18. Způsob léčení člověka nebo zvířete, trpícího autoimunitní nemocí nebo náchylného k autoimunitní nemoci, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje podání člověku nebo zvířeti terapeuticky účinného množství peptidu podle kteréhokoliv z nároků 1 až 12 nebo přípravku podle nároku 17.

19. Peptid, který obsahuje T-buněčný epitop specifický pro kolagen II, a který obsahuje alespoň devět aminokyselin se stejnou sekvencí a v nepřetržitém sledu za sebou z úseků 110 až 239, 338 až 379 a 587 až 895 sekvence kolagenu II, přičemž každá aminokyselina je volitelně nahrazena funkčně ekvivalentní aminokyselinou, a přičemž peptid má vzorec



kde

A_1 je aminokyselinový zbytek s aromatickým nebo alifatickým postranním řetězcem,

A_4 je asparaginový nebo argininový zbytek nebo aminokyselinový zbytek s aromatickým nebo alifatickým postranním řetězcem,

A_5 je jakákoliv přirozeně se vyskytující aminokyselina,

A_7 je aminokyselina s negativně nabitým zbytkem,

Xaa je jakýkoliv aminokyselinový zbytek a

Gly je glycinový zbytek.