(19) Országkód:

HU

MAGYAR KÖZTÁRSASÁG

MAGYAR SZABADALMI HIVATAL

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

214 247 B

(21) A bejelentés ügyszáma: 1367/90
(22) A bejelentés napja: 1990. 03. 08.
(30) Elsőbbségi adatok:
321 238 1989. 03. 09. US

(51) Int. Cl.[6]

C 12 N 15/12
C 12 P 21/08
C 12 Q 1/68

(40) A közzététel napja: 1991. 07. 29.
(45) A megadás meghirdetésének a dátuma a Szabadalmi Közlönyben: 1998. 03. 02.

(72) Feltalálók:
Dustin, Michael Loran, Boston, Massachusetts (US)
Springer, Timothy Alan, Newton, Massachusetts (US)
Staunton, Donald E., Boston, Massachusetts (US)

(73) Szabadalmas:
Center for Blood Research, Inc., Boston, Massachusetts (US)

(74) Képviselő:
S.B.G. & K. Budapesti Nemzetközi Szabadalmi Iroda, Budapest

(54) Eljárás sejtközi adhéziós molekula ICAM-2 és kötőligandjai előállítására

(57) KIVONAT

A találmány tárgyát sejtközi adhéziós molekula (ICAM—2) és legalább 95%-ban homológ fragmentumai és variánsai, valamint ezeket kódoló DNS előállítására szolgáló eljárás, valamint ilyen molekulákat termelő sejtek jelenlétének kimutatására szolgáló eljárás képezi.

HU 214 247 B

A leírás terjedelme: 25 oldal (ezen belül 6 lap ábra)

A jelen találmány az intercelluláris adhéziós molekula-2 („ICAM-2")-vel foglalkozik, amely részt vesz abban a folyamatban, amelyben a limfocita populációk felismerik a celluláris anyagokat és azokhoz tapadnak oly módon, hogy azok a gyulladás helyére vándorolnak, és a gyulladásos reakciók során a sejtekkel kölcsönhatásba lépnek. A jelen találmány ezenkívül olyan ligandum molekulákra is vonatkozik, amelyek képesek kapcsolódni az ICAM-2 intercelluláris adhéziós molekulákhoz, valamint vonatkozik az intercelluláris adhéziós molekula és a ligandum molekulák felhasználásaira is.

A leukocitáknak képesnek kell lennie arra, hogy a celluláris anyagokhoz kapcsolódjanak, és ezáltal megfelelően meg tudják védeni a gazdaszervezetet a külső támadásokkal, így baktériumokkal és vírusokkal szemben. A védekező rendszerrel kapcsolatos ismereteket H.W. Eisen foglalja össze részletesen /Microbiology, 3rd Ed., Harper et Row, Philadelphia, PA (1980) 290–295 és 381–418. oldalak/. A leukocitáknak képesnek kell lennie arra, hogy az endotéliális sejtekhez kapcsolódjanak oly módon, hogy azok a keringésből a gyulladásos folyamat helyére tudjanak vándorolni. Továbbá kötődniük kell az antigént tartalmazó sejtekhez úgy, hogy a normál specifikus immunválasz végbemehessen, és végül a megfelelő célsejtekhez is kötődniük kell oly módon, hogy a vírus által megtámadott sejtek vagy a daganatsejtek lízise megtörténhessen.

Az utóbbi időben hibridoma technológiával azonosították a leukociták felületén lévő molekulákat, amelyek résztvesznek ennek a kapcsolódásnak a közvetítésében. Röviden, humán T-sejtekkel szembeni /D.Davignon és mtsai, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *78*, 4535–4539 (1981)/ és egér lépsejtekkel szembeni /T. Springer és mtsai, Tur. J. Immunol., *9*, 301–306 (1979)/ monoklonália antitesteket azonosítottak, amelyek a leukociták felületéhez kötődnek, és gátolják a fent leírt kapcsolódással összefüggő funkciókat /T.Springer és mtsai., Fed. Proc., *44*, 2660–2663 (1985)/. Ezen antitestek segítségével azonosított molekulákat Mac-1-nek és limfocita funkcióhoz kapcsolt antigén-1-nek (Lymphocyte Function-associated Antigen-l, továbbiakban LFA-1) nevezték el. A Mac-l heterodimer, amely markofágokon, granulocitákon és nagy granuláris limfocitákon található. Az LFA-1 is heterodimer, és megtalálható a legtöbb limfocitán /T.A. Springer és mtsai., Immunol. Rev. *68*, 111–135 (1982)/. Ez a két molekula, valamint egy harmadik molekula, a p150,95 (amelynek a szöveti megoszlása hasonló a Mac-1-éhez) játszik szerepet a celluláris adhézióban /G.Keizer és mtsai, Eur. J. Immunol., *15*, 1142–1147 (1985)/.

A fent leírt, a leukocitákban jelenlévő molekulákról megállapították, hogy egy a glikoproteinekkel rokon családtagjai /F. Sanchez-Madrid és mtsai, J. Exper. Med., *158*, 1785–1803 (1983); G.D. Keizer és mtsai, Eus. J. Immunol, *15*, 1142–1147, (1985)/, amelyet a glikoproteinek „CD-18 család"-jának neveznek. Ez a glikoprotein család heterodimerekből áll, amelyeknek egy alfa- és egy béta-láncuk van. Bár minden egyes antigén alfa-lánca eltér egymástól, a béta-lánc nagymértékben állandó /F. Sanchez-Madrid és mtsai, J. Exper. Med., *158*, 1785–1803, (1983)/. A glikoprotein család béta-láncának (ezt időnként „CD-18"-al jelölik) a molekulatömegét 95 kD-nak (kilo-Dalton), találták, míg az alfa-lánc molekulatömege 150 és 180 kD között változik /T.Springer Fed. Proc., *44*, 2660–2663 (1985)/. Bár a membrán fehérjék alfa alegységei nem olyan nagy mértékben homológok, mint a béta alegységek, a glikoproteinek alfa alegységeinek az alapos analízise szerint alapvető hasonlóság van közöttük. Az LFA-1 rokon glikoproteinek alfa és béta alegységei között lévő hasonlóságokat F. Sanchez-Madrid és mtsai írták le /J. Exper. Med. *158*, 586–602 (1983); J. Exper. Med. *158*, 1785–1803 (1983)/.

Találtak olyan egyéneket, akik ezen adhéziós fehérje család egyik tagját sem voltak képesek normál mennyiségben képezni a leukociták falszínén /D.C. Anderson és mtsai, Fed. Proc. *44*, 2671–2677 (1985); D.C. Anderson és mtsai, J. Infect. Dis., *152*, 668–689, (1985)/. Ezen egyének limfocitái in vitro hasonló hiányosságot mutatnak, mint azon normál egyének limfocitái, akiknél a CD-18 molekulacsaládot antitestekkel antagonizálták. Továbbá ezen egyének nem voltak képesek normál immunválasszal reagálni annak következtében, hogy sejtjeik nem voltak képesek kapcsolódni a celluláris anyagokhoz /D.C. Anderson és mtsai, Fed. Proc. *44*, 2671–2677, (1985); D.C. Anderson és mtsai, J. Infect., Dis., *152*, 668–689, (1985)/. Ezek az adatok azt mutatják, hogy az immunreakciók csökkennek, ha a limfociták nem képesek normál mértékben kapcsolódni annak következtében, hogy hiányoznak a CD-18 családba tartozó adhéziós funkciójú molekuláik.

Összegezve tehát, ahhoz hogy a leukociták képesek legyenek funkciójukat ellátni, szükséges, hogy képesek legyenek más sejtekhez (így endotéliális sejtekhez) kapcsolódni. Ez a kapcsolódás sejtsejt kapcsolatot igényel, amelyben a leukociták sejt-felszínén lévő specifikus receptor molekulák vesznek részt. Ezen receptorok lehetővé teszik, hogy egy leukocita más leukocitákhoz vagy endotéliális és más, nem vaszkuláris sejtekhez kapcsolódjon. Megállapították, hogy a sejtfelszíni receptor molekulák egymással nagyfokú rokonságban vannak. Azon egyének, akikben hiányoznak ezek a sejtfelszíni receptor molekulák, krónikus és visszatérő infekciókban szenvednek, és más klinikai tüneteik is vannak, így például hiányos antitest válaszreakciók tapasztalhatóak náluk.

Minthogy a leukocita adhézió fontos szerepet játszik az idegen szöveteket azonosító és az azok kilökődését előidéző folyamatban, ennek a folyamatnak a megismerése nagy jelentőséggel bír a szervátültetések, a szövetbeültetések, az allergia és az onkológia területén.

A jelen találmány tárgyát az intercelluláris adhéziós molekula-2 (ICAM-2), valamint ennek funkcionális származékainak előállítása képezi.

A találmány ezenkívül magában foglalja a fent leírt molekulák diagnosztikai felhasználásait is.

Részletezve: A találmány magában foglalja az ICAM-2 molekulát vagy annak funkcionális származékát, amelyek lényegében mentesek természetes eredetű szennyező anyagoktól.

A találmány vonatkozik továbbá az ICAM-2-re amely legalább egy, az alábbi csoportban lévő polipeptidet tartalmaz:

(a) -S-S-F-G-Y-R-T-L-T-V-A-L-;
(b) -D-E-K-V-F-E-V-H-V-R-P-K-;
(c) -G-S-L-E-V-N-C-S-T-T-C-N-;
(d) -H-Y-L-V-S-N-I-S-H-T-D-V-;
(e) -S-M-N-S-N-V-S-V-Y-Q-P-P-;
(f) -F-T-I-E-C-R-V-P-T-V-E-P-;
(g) -G-N-E-T-L-H-Y-E-T-F-G-K-;
(h) -T-A-T-F-N-S-T-A-D-R-E-D-;
(i) -H-R-N-F-S-C-L-A-V-L-D-L-;
(j) -M-V-I-I-V-T-V-V-S-V-L-L-;
(k) -S-L-F-V-T-S-V-L-L-C-F-I-; és
(l) -M-G-T-Y-G-V-R-A-A-W-R-R-.

A találmány vonatkozik továbbá egy rekombináns vagy szintetikus DNS-molekulára, amely képes kódolni vagy kifejezni az ICAM-2-t vagy annak egy funkcionális származékát.

A találmány ezenkívül kiterjed még egy antitestre, különösen egy monoklonális antitestre, amely kötődni képes a következő csoportba tartozó molekulákhoz: ICAM-2 és az ICAM-2-nek egy funkcionális származéka.

A találmány vonatkozik még olyan hibridoma sejtre, amely képes termelni a fent leírt monoklonális antitestet.

A találmány magában foglal egy eljárást egy olyan kívánt hibridoma sejt termelésére, amely az ICAM-2-höz vagy funkcionális származékához kötődni képes antitestet képez, és amely eljárás a következő lépésekből áll:

(a) Egy állat immunizálása egy olyan immunogénnel, amelyet a következőkből álló csoportból választunk ki: egy ICAM-2-t kifejező sejt; egy ICAM-2-t kifejező sejt mambránja; ICAM-2 vivőanyaghoz kötött ICAM-2; az ICAM-2-nek egy peptid fragmentuma és az ICAM-2-nek egy vivőanyaghoz kötött peptid fragmentum.

(b) Az állat lépsejtjeinek a fúziója egy mileoma sejtvonallal.

(c) Annak lehetővé tétele, hogy a fuzionált lép és mieloma sejtek antitestet kiválasztó hibridoma sejteket képezzenek.

(d) A hibridoma sejtek szűrővizsgálata azon hibridoma sejtek kiválasztására, amelyek az ICAM-2-höz kötődni képes antitestet termelnek.

A találmány magában foglal továbbá egy eljárást az olyan gyulladások kezelésére, amelyek az emlősökben a specifikus védekező rendszer válaszaként lépnek fel, amely módszer abból áll, hogy az ezen kezelést igénylő egyénnek a gyulladás visszaszorításához elegendő mennyiségű gyulladásgátló szert adunk, amely gyulladásgátló szert az alábbi csoportból választjuk ki: egy, az ICAM-2- höz kötődni képes antitest; egy antitest fragmentuma, amely fragmentum képes kötődni az ICAM–2-höz; ICAM-2; az ICAM-2 egy funkcionális származéka; az ICAM-2-nek egy nem-immunglobulin antagonistája, amely nem azonos az ICAM-1 -el vagy a CD-18 molekulacsalád egy tagjával.

A találmány még magában foglal egy eljárást a hematopoietikus eredetű tumorsejtek metasztázisának a visszaszorítására, amely sejtek rendelkeznek a vándorlásukhoz szükséges a CD-18 molekulák egyikével (különösen az LFA-1-el), amely szerint a kezelésre szoruló betegeknek a metasztázis visszaszorításához elegendő mennyiségű szert adunk. A szert a következő csoportból választjuk ki: egy, az ICAM-2-höz kötődni képes antitest; egy toxin-származék antitest, amely képes kötődni az ICAM-2-höz; egy antitest fragmentum, amely képes kötődni az ICAM-2-höz; egy antitest toxin-származék fragmentuma, amely fragmentum képes kötődni az ICAM-2-höz; ICAM-2; az ICAM-2-nek egy funkcionális származéka; az ICAM-2-nek egy toxin származéka; az ICAM-2 egy funkcionális származékának egy toxin származéka és az ICAM-2-nek egy nem-immunglobulin antagonistája, amely eltérő az ICAM-1-től vagy a CD-18 molekula család egy tagjától.

A találmány ezeken kívül magában foglal egy eljárást az ICAM-2-t kifejező tumorsejtek szaporodásának a visszaszorítására, amely eljárás szerint az ezen kezelést igénylő betegeknek a tumorsejtek szaporodásának visszaszorítására, elegendő mennyiségű szert aduk, amely szert a következő csoportból választjuk ki: egy, az ICAM-2-höz kötődni képes antitest; egy antitestoxin-származéka, amely képes kötődni az ICAM-2-höz; egy antitest fragmentum, amely fragmentum képes kötődni az ICAM-2-höz; egy antitest fragmentum toxin származéka, amely fragmentum képes kötődni az ICAM-2-höz; ICAM-2; az ICAM-2 egy funkcionális származéka; az ICAM-2-nek egy nem-immunglobulin antagonistája, amely nem az ICAM-1 vagy a CD-18 molekulacsalád egy tagja; a CD-18 molekulacsalád egy tagjának egy toxin-származék funkcionális származéka.

A találmány egy olyan eljárást ad, amely alkalmas az ICAM-2-t kifejező sejt jelenlétének detektálására. Az eljárás a következőket foglalja magában:

a) egy vizsgálandó sejt vagy a sejt kivonatának az inkubálása egy nukleinsav molekula jelenlétében, amely nukleinsav molekula képes hibridizálni az ICAM-2 mRNS-el, és

b) annak a meghatározása, hogy a nukleinsav hibridizálódott-e az adott sejtben vagy a sejt kivonatában jelenlévő komplamenter nukleinsavval.

A találmány megad továbbá egy gyógyszerkészítmény összetételt, amely a következőkből áll:

(a) egy gyulladásgátló szer, amelyet a következőket tartalmazó csoportból választunk ki: egy ICAM-2-höz kötődni képes antitest; egy antitest fragmentum, amely fragmentum képes kötődni az ICAM-2-höz; ICAM-2 egy funkcionális származékai az ICAM-2-nek egy nem-immunglobulin antagonistája, amely nem ICAM-1 vagy a CD-18 molekulacsalád egy tagja, mindezek külön-külön vagy (b) egy immunszuppresszív hatású szerrel kombinálva.

Az ábrák leírása

1. ábra: Bemutatja az ICAM-1-et és az ICAM-2-t kifejező transzfektált COS sejtek kötődését az LFA-1-el bevont műanyaghoz.

A/ az ICAM-1 cDNS-el transzfektált COS sejteket LFA-1-el bevont lemezekre vittük, és az ICAM-1

expressziót indirekt immunfluoreszcenciás átfolyásos citometriával analizáljuk anti-ICAM-1 RR/1 monoklonális antitesttel (MAb), mint primer MAb-vel. A lemezre fel nem vitt sejtek (pontozott vonal): nem kötődött sejtek (szaggatott vonal); kötődött sejtek (összefüggő vonal).

B/ ICAM-1-et vagy ICAM-2-t kifejező ^{51}Cr-el jelzett transzfektált COS sejtek, amelyeket MAb jelenlétében kötöttük az LFA-1-el bevont műanyaghoz.

2. ábra: az ICAM-2 nukleotid és aminosav szekvenciáját mutatja be. Az aminosav szekvencia számozását a szignál peptid előre várható hasítási helye utáni első aminosavnál kezdtük. A vélt hidrofób szignál-peptidet és a transzmembrán szekvenciákat (TM) aláhúztuk. A potenciális N-hez kapcsolódó glikozilációs helyet bekereteztük. A vélt poliadentilációs AATACA szignál fölé vonalat húztunk. Az ICAM-2 cDNS CDM8-on belüli mindkét szálát szekvenáltuk a komplementer oligonukleotid indítóanyagok szekvenciális szintézisével és a didezoxinukleotid lánc vég-szekvenálásával [F. Sanger és mtsai, Proc, Natl. Acad. Sci, USA, *74*, 5463–5467 (1977)] a gyártó cég javaslata szerint (Sequenase, U.S. Biochemical).

3. ábra: az RNS és DNS hibridizációs analízis eredményeit mutatja be. Nothern (A és B) és Southern (C) lenyomatokat hibridizáltunk ^{32}P-vel jelzett 1,1 kb méretű ICAM-2 cDNS-el (A és B) és rehibridizáltuk a ^{32}P-vel jelzett ICAM-1 3 kb méretű cDNS-hez (B). (A és B) 6 μg poli(A)$^+$ RNS, amely Burkitt limfoma sejtvonalból származik, Ramos (1. sáv), endotéliális sejtek (2. sáv), LPS-el 3 órán át stimulált endotéliális sejtek (3. sáv), egy EBV-vel életképessé tett B-limfoblasztoid sejtvonal, BBN (4. sáv), epitéliális kercinoma sejtvonal, HeLa (5. sáv), Jurkat T-limfoma sejtvonalak (6. sáv) és SKW-3 (7. sáv) és egy promocita sejtvonal, U937 (8. sáv). (C) 6 μg BL-2 B-sejtvonalból származó genomiális DNS (1. és 4. sávok), ER-LCL (2. és 5. sávok) és Raji (3. és 6. sávok) EcoRI-el (1–3, sávok) vagy HindIII-al (4–6 sávok) emésztve. Az ICAM-2 és ICAM-1 mRNS-eket nyilakkal jelöltük.

4. ábra: Az ICAM-2 és ICAM-1 homológiáját mutatja be. Az ICAM-2 extracelluláris szekvenciájának mind a 201 csoportját összevetettük az ICAM-1 1–185 csoportjával az ALIGN program segítségével (M.O. Dayhoff és mtsai, Methods Enzymol. 91, 524–545 (1983)) és annak felülvizsgálatával, Az ICAM-2 csoportjait megszámoztuk. Az azonos helyeket bekereteztük, A D1 és D2 az ICAM-2 és ICAM-1 Ig-szerű doménjeinek a határát jelzik. Az ICAM-2 β-szálának a valószínű helyei fölé vonalat húztunk P.Y. Chou és mtsai, Biochemistry, *13*, 211–245 (1974),] az ICAM-1 hasonló helyeit aláhúztuk.

A találmány egyik tárgya egy, a LFA-1-hez kötődő természetes ligandum felfedezése. Azon molekulákat, mint amilyenek a CD-18 családba tartozóak, amelyek résztvesznek a celluláris adhéziós folyamatban, „adhéziós molekuláknak" nevezzük.

I. LFA-1 és ICAM-1

A leukocita adhéziós molekula (LFA-1) széles körben közvetíti az immunitásban és a gyulladásban a limfociták, monociták, természetes „killer" sejtek és granulociták kölcsönhatásait más sejtekkel [T. A. Springer és mtsai, Ann, Rev, Immunol , *5*, 223–252 (1987).

Az LFA-1 receptora az intercelluláris adhéziós molekula-1-nek (ICAM-1), egy olyan sejtfelszíni molekulának, amelyet egyes szövetek konstitutív módon fejeznek ki vagy gyulladások esetében indukció hatására keletkeznek [S.D.Marlin és mtsai, Cell, *51*, 813–819, (1987) M.L. Dustin és mtsai, J. Immunol. *137*, 245–254 (1986); M.L. Dustin és mtsai, Immunol Today, *9*, 213–215, (1988); WO 88/06592 számon közzétett nemzetközi szabadalmi bejelentés US-P 5,284,931. számú szabadalmi irat (alapja az 1988. szeptember 28-án tett 07/250 446 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentés), mindkét bejelentést itt referenciaként használjuk fel.]

Az LFA-1 kifejti, a hatását mind az antigén specifikus, mind az antigén-független T-citotoxikus, a T „helper", a természetes „killer", a granulocita és a monocita sejtekben más sejt típusokkal való kölcsönhatásában T. A. Springer és mtsai, Ann. Rev. Immunol., *5*, 223–252 (1987); T.K. Kishimoto és mtsai, Adv. Immunol. (1988) mejelenés alatt. Az LFA-1 egy leukocita integrin típusú molekula, amely nem-kovalensen összekapcsolt α- és β-glikoprotein alegységekből áll, amelyek 180, ill. 95 kD méretűek.

Az ICAM-1 egy egyszálú glikoprotein, molekula nagysága sejttípusonként változóan 76–114 kD között van és az Ig főcsalád tagja 5 C-szerű doménnel rendelkezik [M.L. Dustin és mtsai, Immunol. Today, *9*, 213–215 (1988); D.E. Staunton és mtsai, Cell, *52*, 925–933 (1988); D. Simmons és mtsai, Nature, *331*, 62 4–627 (1988)]. Az ICAM-1 könnyen indukálható citokinekkel, így IFN-γ-val, TNF-fel és IL-1-gyel a sejtek széles körében [M.L. Dustin és mtsai, Immunol. Today, *9*, 213–215, (1988)]. Az ICAM-1 indukciója epitéliális sejtekben, endotéliális sejtekben és fibroblasztokban szerepet játszik az LFA-1-től függő limfocita adhézióban M.L. Dustin és mtsai, J. Immunol., *137*, 245–254, (1986) M.L. Dustin és mtsai, J. Cell. Biol., *107*, 321–331, (1988); [M.L. Dustin és mtsai, J.Exp. Med., *167*, 1323–1340, (1988). A limfocitákat LFA-1 MAb-vel előkezelve, vagy más sejteket ICAM-1 MAb-vel előkezelve adhéziót blokkolni lehet M.L. Dustin mtsai, J. Immunol., *137*, 245–254, (1986) M., Dustin és mtsai, J. Cell. Biol., *107*, 321–331 (1988) M.L. Dustin és mtsai, J. Exp. Med., *167*, 1323–1340 (1988)]. A tisztított ICAM-1-el mesterséges membránon vagy Petri-csészében kapott azonos eredmények azt bizonyítják, hogy az LFA-1 és az ICAM-1 egymás receptorai [S.D. Marlin és mtsai, Cell, *51*, 813–819 (1987) M.W. Makgoba és mtsai, Natura, *331*, 86–88 (1988)].

Az egyszerűség kedvéért itt ezeket receptornák, ill, ligandumnak nevezzük, Az ICAM-1 további részletes leírása US-P 5,284,931 számú szabadalmi iratban található amelynek alapját az 07/045,963 07/115,798 07/155,943 07/189,815 vagy 07/250,446 számú ameri-

kai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentések képezik ezek mindegyikét ebben a bejelentésben teljes egészében referenciaként tekintjük.

II. ICAM-2

Egy második LFA-1 ligandumot, amely eltér az ICAM-1-től, szintén feltételeztek [R. Rothlein és mtsai, J. Immunol., *137*, 1270–1274, (1986) M. W. Makoba és mtsai, Eur. J. Immunol. *18*, 637–640 (1988); M.L. Dustin és mtsai, J. Cell. Biol., *107*, 321–331, (1988)]. A jelen találmány ezzel a második, ICAM-2-nek elnevezett ligandummal (Intercellular Adhesion Molecule-2, továbbiakban ICAM-2) foglalkozik.

Az ICAM-2 az ICAM-1-től abban tér el, hogy más a sejtekben való megoszlása, és az előbbit nem indukálja a citokin.

Az ICAM-2 egy integrális membrán fehérje két Ig-szerű doménnel, míg az ICAM-1 öt Ig-szerű doménnel rendelkezik [D.E. Staunton és mtsai, 8911, *52*, 925–933 (1988); D. Simmons és mtsai, Nature, *331*, 624–627 (1988)]. Megjegyzendő, hogy az ICAM-2 sokkal közelebb áll az ICAM-1 két N-terminális doménjéhez (34%-os azonosság), mint akár az ICAM-1 vagy ICAM-2 az Ig-főcsalád más tagjaihoz, bizonyítva, hogy az Ig-szerű ligandumoknak van egy al-családja, amely tagjai ugyanazon integrin család receptorait kötik.

III. Az ICAM-2 cDNS klónozása

Az ICAM-2 gén klónozására bármelyik eljárást lehet alkalmazni. Ezen módszerek egyike a cDNS inszertumok ingázó vektor tárát analizálja (amely egy ICAM-2-t kifejező sejtből származik) egy olyan inszertum jelenlétének a keresése céljából, amely tartalmazza az ICAM-2 gént. Egy ilyen analízis elvégezhető sejteket a vektorral transzfektálva, majd vizsgálva az ICAM-2 expressziót.

Az ICAM-2 cDNS előnyösen azonosítható Aruffo és Seed az adhéziós molekulák ligandumainak az azonosítására szolgáló módszere [B. Seed és mtsai, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *84*, 3365–3369 (1987)] új módosításának az alkalmazásával. Ebben a módszerben ICAM-2-t kifejező sejtekből (igy például endotéliális sejtek vagy Ramos, BBN B-limfoblasztoid, U937 monocita vagy SKW3 limfoblasztoid sejtvonalakból) egy cDNS tárat készítünk. A cDNS tár előnyösen állitható elő endotéliális sejtekből. Ezt a tárat használjuk azon sejtek transzfektálására, amelyek normális körülmények között nem fejeznek ki ICAM-2-t (ilyenek a COS sejtek). A transzfektált sejteket Petri-csészébe visszük, amelyet előzőleg LFA-1-el bevontunk. Az ICAM-1-et vagy ICAM-2-t kódoló szekvenciával transzfektált COS sejtek és amelyek ezen ligandumok valamelyikét sejt felületükön kifejezik, kötődni fognak a Petri-csésze felületén lévő LFA-1-hez. A nem kötődő sejteket lemossuk, majd a kötődött sejteket eltávolítjuk a Petri-csésze felületéről és tovább tenyésztjük. Az ezekben a sejtekben lévő ICAM-1-et vagy ICAM-2-t kifejező rekombináns szekvenciákat elkülönítjük, és meghatározzuk szekvenciájukat annak megállapítása céljából, hogy kódolják-e az ICAM-1-et vagy ICAM-2-t.

A fent leírt eljárás előnyös megvalósítása szerint a Petri-csészébe anti-ICAM-1 antitestet adunk abból a célból, hogy megakadályozzuk az ICAM-1-et kifejező sejtek megtapadását. Az ICAM-2-vel transzfektált COS sejtek LFA-1-hez való kötődését az EDTA és az anti-LFA-1 monoklonális antitest („MAb") meggátolja, de nem gátolja az anti-ICAM-1 MAb. Így ebben az eljárásban az ICAM-1-et kifejező sejtek nem képesek kötődni a Petri-csésze felületéhez az ICAM-1-en keresztül, és ezért nagy részük lemosható a többi nem kötődő sejttel együtt. Ennek eredményeképpen csak az ICAM-2-t kifejező sejtek képesek kötődni a Petri-csésze felületéhez.

Ennek megfelelően a cDNS klónok szűrővizsgálatát COS sejtekben való expresszióval és ligandumot tartalmazó COS sejtek kiválasztásának a segítségével végeztük funkcionálisan aktív, tisztított LFA-1-et használva, amelyet előzőleg műanyag Petri-csésze felületére kötöttünk. A kiválasztás után a meg nem tapadó sejteket ICAM-2^+ sejtekkel kimerítettük, míg a megtapadó sejtek, amelyeket EDTA-vel felszabadítottunk az LFA-1-el bevont műanyagról, majdnem mindegyike ICAM-2^+ volt. Az ICAM-1^+ sejteknek az LFA-1-el bevont műanyaghoz való tapadását meg lehet akadályozni RR1/1 anti-ICAM-1 Mab-val.

Így ennek az eljárásnak az értelmében az ICAM-2 cDNS klónozása céljából egy megfelelő plazmidot, így például a COM8 plazmid vektort alkalmazva egy cDNS génkönyvtárt hoztunk létre endotéliális sejtekből, amelyek tartalmaznak az LFA-1 függő adhézióhoz szükséges ICAM-1 függő és ICAM-1-től független komponenseket is [M.L. Dustin és mtsai, J. Cell. Biol., *107*, 321–331, (1988)]. A transzfektált COS sejteket LFA-1-el bevont Petri-csészékben inkubáltuk anti-ICAM-1MAb jelenlétében, hogy ez utóbbival csökkentsük az ICAM-1 cDNS-ek izolálásának a valószínűségét. A megtapadó sejteket EDTA-val eluáltuk, és a plazmidokat izoláltuk, és E. coliban szaporítottuk azokat. Közelítőleg három transzfekció, megtapadás, plazmid izolálás ciklus és egy méret szerinti frakcionálás után a plazmidokat restrikciós endonukleázos emésztéssel analizáltuk. A plazmidoknak közelítőleg 1/3-a rendelkezett 1,0 kb-nál nagyobb méretű inszertumokkal, ha azokat transzfekcióval COS sejtekbe vittük, amely inszertum LFA-1hez való tapadást eredményez.

Egy ICAM-2 cDNS klón ugy is nyerhető, hogy a genetikus kódot használjuk [J.D. Watson, Molecular Biology of the Gene 3. kiadás, W.A. Benjamin, Inc., Menlo Park, CA (1977), 356–357 oldalak] az ICAM-2 fehérjét kódolni képes polinukleotid szekvenciájának a meghatározására.

Egy ICAM-2 klón úgy is előállítható, hogy az ICAM-2 fehérjéje peptid fragmentumainak az aminosavszekvenciáját meghatározzuk és a genetikus kódot felhasználva az ICAM-2 peptidet kódolni képes oligonukleotid próba molekulákat szerkesztünk. A próba anyagokat ezután (hibridizációval) felhasználjuk a cDNS tár (amely ICAM-2-t kifejező sejtek cDNS-éből készült) azon tagjainak a detektálására, amelyek kódolják az ICAM-2 fehérjét.

A fent leírt és az azokhoz hasonló módszerek lehetővé teszik a humán aldehid-dehidrogenáz gének [L.C. Hsu és

mtsai, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *82*, 3771–3775, (1985)], a fibronektin S. Suzuki és mtsai, Eur. Mol. Biol. Organ, J., *4*, 2519–2524, (1985)], a humán ösztrogén receptor gén [P. Walter és mtsai, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *82*, 7889–7893, (1985)], a szövet típusú plazominogén aktivátor [D. Pennica és mtsai, Natura, *301*, 214–221, (1983)] és a humán érett placentális alkalikus foszfatáz komplementer DNS [W. Kam és mtsai, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *82*, 8715–8719, (1985)] klónozását.

Az ICAM-2 gén klónozása egy másik módja az, hogy az expressziós vektorok génkönyvtárát hozzuk létre ICAM-2-t kifejezni képes sejtből egy expressziós vektorba való DNS klónozással vagy még előnyösebben cDNS klónozással. A tárat ezután szűrővizsgálatnak vetjük alá olyan tagok keresésére, amelyek képesek egy olyan fehérjét kifejezni amely kötődik az anti-ICAM-2 antitesthez, és amelynek nukleotidszekvenciája képes olyan polipeptideket kódolni, amelyeknek azonos az aminosavszekvenciája, mint az ICAM-2-nek vagy az ICAM-2 egy fragmentumának.

A bármelyik fenti módszerrel előállított klónozott ICAM-2 gén kapcsolható egy expressziós vektorhoz, és bevihető baktériumokba vagy eukariota sejtekbe ICAM-2 fehérje termelése céljából. Az ilyen műveleteket Maniatis és mtsai (lásd fent) foglalják össze, és a szakterületen ismertek.

IV. A jelen találmányban szereplő hatóanyagok: ICAM-2 és annak funkcionális származékai: a hatást elősegítő és azt gyengítő szerek.

A jelen találmány tárgya az ICAM-2, ennek „funkcionális származékai", valamint ezek hatását elősegítő és azt gyengítő szerek.

A. Az ICAM-2 funkcionális származékai.

Az ICAM-2 „funkcionális származéka" egy olyan vegyület, amely rendelkezik olyan biológiai aktivitással (akár funkcionális vagy szerkezeti), amely lényegében hasonló az ICAM-2 biológiai aktivitásához. A „funkcionális származék" kifejezés magában foglalja egy molekula „fragmentumait", „variánsait", „analógokat" vagy „kémiai származékokat".

Egy molekulának, így az ICAM-2-nek egy „fragmentuma" azt jelenti, hogy az a molekulának egy polipeptid része. Különösen előnyösek azok az ICAM-2 fragmentumok, amelyek rendelkeznek ICAM-2 aktivitással és oldhatóak (azaz nem membránhoz kötöttek).

Egy molekulának, például az ICAM-2-nek egy „variánsa" olyan molekulát jelent, amely lényegében hasonló szerkezetű és funkciójú, mint akár az egész molekula vagy annal egy fragmentuma.

Egy molekulának, így az ICAM-2-nek az „analógja" olyan molekulát jelent, amelynek a funkciója lényegében hasonló akár a teljes molekulához, akár annak egy fragmentumához.

Egy molekuláról akkor mondjuk, hogy „lényegében hasonló" egy másik molekulához, ha mindkét molekula lényegében hasonló szerkezetű, vagy mindkét molekula hasonló biológiai aktivitással rendelkezik. Így feltételezve, hogy a két molekula hasonló aktivitással rendelkezik, azok abban az esetben tekinthetők, variánsoknak ha az egyik molekula szerkezete nem található meg a másikban, vagy ha az aminosavszekvencia nem azonos.

Egy molekuláról akkor mondjuk, hogy egy másik molekula „kémiai származéka", ha az olyan kémiai csoportokat is tartalmaz, amelyek nem részei az eredeti molekulának. Az ilyen csoportok javíthatják a molekula oldékonyságát, felszívódását, biológiai felezési idejét stb. Ezek a csoportok továbbá csökkenthetik a molekula toxicitását, kiküszöbölhetik vagy gyengíthetik a molekula nem kívánatos mellékhatását stb. Az ilyen hatásokat kifejtő csoportok összefoglalása a Remongton's Pharmaceutical Sciences (1980)-ben található.

A „toxin-származék" molekulák a „kémiai származékok" speciális osztályát képezik. Egy „toxin-származék" molekula egy olyan molekula (ICAM-2, vagy egy antitest), amely egy toxin csoportot is tartalmaz. Egy ilyen molekula kötődése egy sejthez a toxint a sejt közvetlen közelébe viszi, és így elősegíti a sejt elpusztulását. Bármilyen alkalmas toxin csoport alkalmazható, azonban előnyös például olyan toxinokat alkalmazni, mint a ricin toxin, kolera toxin, diftéria toxin, radioizotop toxinok, membrán csatornát képező toxinok stb. Ezeknek a csoportoknak a molekulához való kapcsolására a szakmában jól ismert módszerek állnak rendelkezésre.

Az ICAM-2 funkcionális származékait, amelyek 100 aminosav-maradéknál nem tartalmaznak többet, in vitro szintézissel szokásos módon elő lehet állítani. Ha kívánatos, ezeket a fragmentumokat módosítani lehet a tisztított vagy nyers fehérje célzott aminosavát reagáltatva egy szerves anyaggal, amely képes reagálni a kiválasztott oldalláncokkal vagy végcsoportokkal. A kapott kovalens kötéssel bíró származákokat fel lehet használni a biológiai aktivitásban szerepet játszó csoportok azonosítására.

A ciszteinil csoportokat leginkább α-halogén-acetátokkal (és megfelelő aminokkal), mint például klór-ecetsavval vagy klór-acetamiddal reagáltatják, így karboximetilvagy karboxi-amido-metil-származékokat állítanak elő. A ciszteinil csoportok további származékai állíthatók elő bróm-trifluor-acetonnal, α-bróm-β-(5-imidazolil) propionsavval, (klór-acetil)-foszfáttal, N-alkil-malein-imiddel, 3-nitro-2-piridil-diszulfiddal, metil-2-piridil-diszulfiddal, p-(klór-merkuri)-benzoáttal, 2-(klór-merkuri)-4-nitro-fenollal vagy klór-7-nitro-benzo-2-oxa-1,3-diazollal reagáltatva.

A hisztidil-csoportok származékait dietil-piro-karbonáttal pH=5,5–7,0 között végzett reakcióval állíthatjuk elő, ez a reagens viszonylag specifikus a hisztidil-oldalláncra. A para-bróm-fenacil-bromid szintén alkalmazható, ezt a reakciót előnyösen 0,1 M nátrium-kakodilátban végezzük pH=6-nál.

A lizil- és az amino-terminális csoportok borostyánkősav- vagy más karbonsav-anhidriddel reagálnak. Az ezekkel a szerekkel előállított származékoknak a hatására ellenkezőjére változik a lizil-csoport töltése. Az α-amino-csoportot tartalmazó rész más származékainak az előállítására alkalmas más reagensek például az imidoészterek, így a pikolinimidát; piridoxál-foszfát; piridoxál klór-borohidrid;trinitro-benzolszulfonsav 0-

-metil-izokarbamid, 2,4-pentándion és glioxiláttal végzett transzamináz reakció.

Az arginil-csoport számos ismert reagenssel módosítható: igy például fenil-glioxállal, 2,3-butándionnal, 1,2—ciklohexándionnal és ninhidrinnel. Az arginil-csoportok származékainak az előállításához szükséges, hogy a reakciót alkalikus közegben végezzük, mert a funkcionális guanidino-csoport pK_a értéke magas.

Továbbá ezek a reagensek nemcsak az argininnel reagálhatnak, hanem a lizin epszilon-aminocsoportjával is.

A tirozil-csoportok specifikus módositását kiterjedten tanulmányozták, küiönös tekintettel az aromás diazónium-vegyületekkel vagy tetranitro-metánnal végzett reakcióval a spektrumot megváltoztató jelzést hordozó csoport bevitele céljából. Legáltalánosabban N--acetil-imidazolt és tetranitro-metánt használnak 0-acetil-tirozin, ill. 3-nitro-származékok előállitására. A tirozil-csoportot ^{125}J-dal vagy ^{311}J-dal jódozva jelzett fehérje állítható elő a radio-immunvizsgálatok céljára, ebben az esetben a klóramin-T módszer alkalmazható.

A karboxil-oldalláncokat (aszpartil és glutamil) szelektíven lehet módositani karbodiimidekkel (R'--N=C=N-R'), mint például az 1-ciklohexil-3-(2-morfolinil-4-etil)-karbodiimiddel vagy az 1-etil-3-(4-azónia--4,4-dimetil-pentil)-karbodiimiddel. Továbbá az aszpartil- és glutamil-csoportok aszparaginil- vagy glutaminil-csoporttá alakíthatók ammónium-ionokkal reagáltatva.

Egy ICAM-2 funkcionális származék molekulának vízben nem oldódó vivőanyaghoz (vagy egy felülethez) való kötésére bifunkcionális szerek használatosak a keresztkötés létrehozásához, amely származékokat abból a célból állítunk elő, hogy az ICAM-2 funkcionális származék fuziós polipeptidjét lehasítsuk, és a lehasított polipeptidet kinyerjük. Az általánosan használatos keresztkötést létrehozó szerek egyike például az 1,1--bisz(diazoacetil)-2-fenil-etán, a glutáraldehid, N-hidroxi-szukcinimid észterek, például 4-azido-szalicilsavészterek, homo-bifunkcionális imidoészterek, beleértve az olyan diszukcinimidil-észterekat, mint a 3,3'-di-ditiobisz(szukcinimidil propionát) és bifunkciós maleinimideket, mint a bisz-N-maleimido-1,8-oktán. A metil-3-(p—azido-fenil)-ditio-propioimidáttal végzett reakció foto-aktíválható (fénnyel aktíválható) közbenső terméket eredményez, amely képes fény jelenlétében keresztkötéseket létrehozni. Ezenkívül vízben nem oldódó aktív matrixokat, így cianogén-bromiddal aktivált szénhidrogéneket és a 3 969 287; 3 691 016; 4 195 128; 4 247 642; 4 229 537 és a 4 330 440 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásokban között aktív szubsztrátokat alkalmaznak a fehérjék immobilizálására.

A glutaminil- és aszparaginil-csoportokat gyakran dezaminálják a megfelelő glutamil- és aszpartil-csoportokká. Egy másik módon ezeket a csoportokat enyhén savas közegben dezaminálják. A csoportok mindegyik formája beletartozik a jelen találmány tárgykörébe.

Egyéb módosítások a következők lehetnek: a prolin és a lizin hidroxilezése, a szeril- és treonil-csoportok hidroxilcsoportjainak foszforilálása, a lizin, arginin és hisztidin oldalláncok α-aminocsoportjának metilezése [T.E. Creighton, Proteins: Structure and Molecule Properties,W.H. Freeman & Co., San Francisco, 79–86, oldalak (1983)], az N-terminális aminocsoportok acetilezése és néhány esetben a C-terminális karboxilcsoportok amidálása.

Megváltozott aminosav szekvenciájú ICAM-2 funkcionális származékokat a DNS mutáció segitségével is elő lehet állitani. Az ICAM-2-t kódoló gén nukleotidszekvenciája a 2. ábrán látható. Ilyen variánsok például lehetnek a 2. ábrában látható aminosavszekvenciából deléciókkal, inszerciókkal vagy szubsztitucziókkal előállított származékok. A deléció, inszerció és szubsztitució bármely kombinációjával is előállíthatók variánsok, ha a kapott szerkezetű termék rendelkezik a kívánt biológiai aktivitással. Nyilvánvaló, hogy a variánst kódoló DNS-t létrehozó mutáció nem lehet a leolvasási kereten kívül, és előnyösen nem képez komplementer régiókat, amelyek másodlagos mRNS szerkezeteket lennének képesek létrehozni (lásd EP Patent Application Publication No. 75,44).

Genetikai szinten ezeket a funkcionális származékokat rendszerint az ICAM-2-t kódoló DNS nukleotidjainak az egy helyre irányuló mutagenezisével állítják elő, így a funkcionális származékot kódoló DNS-t állítanak elő, és ezután a DNS-t rekombináns sejttenyészetben kifejezik. A funkcionális származékokra jellemző, hogy ugyanolyan minőségű biológiai aktivitással rendelkeznek, mint a természetes analóg. Néhány tulajdonság tekintetében azonban eltérhetnek a természetes ICAM-2 molekulától.

Minthogy előre meghatározott az aminosavszekvencia megváltoztatásának a helye, a mutáció helyét nem szükséges előre meghatározni. Például, az adott helyen a mutáció végbemenetelének a optimalizálására véletlenszerű mutagenezist lehet végrehajtani a cél-kodonon vagy a cél-régióban, és a kifejezett ICAM-2 funkcionális származékokból szűrővizsgálattal lehet kiválasztani a kívánt aktivitás eléréséhez legelőnyösebb kombinációt. Egy ismert szekvenciájú DNS-ben egy előre meghatározott helyen egy szubsztitucios mutáció létrehozására jól ismert módszerek állnak rendelkezésre, például ilyen a hely-specifikus mutagenezis.

A fentieknek megfelelően egy ICAM-2 funkcionális származék molekula készítése előnyösen keresztülvihető egy olyan DNS hely-specifikus mutagenezisével, amely DNS egy korábban előállított funkcionális származékot vagy a fehérjének egy nem variáns változatát kódolja. A hely-specifikus mutagenézis lehetővé teszi az ICAM-2 funkcionális származékainak az előállítását specifikus oligonukleotid-szekvenciák segítségével, amelyek a kívánt mutáció DNS-szekvenciáját kódolják, valamint a szomszédos nukleotidok megfelelő számával, hogy létrehozhassunk egy megfelelő méretű indítóanyag (primer) szekvenciát és egy komplex szekvenciát stabil duplex képzésére a delécios kapcsolódási helyhez viszonyítva ellentétes irányban. Általában 20–25 nukleotid hosszúságú indítóanyag az előnyös, amely 5–10 csoportot tartalmaz a megváltoztatandó szekvenciával kapcso-

lódó hely mindkét oldalán. A módszer általánosan ismert a szakmában, mint egy-helyre irányuló mutagenézis, amelyet Adelnan és mtsai közlemények összefoglaltak [DNA, *2*, 183, (1983), amelyet itt referenciaként használunk fel.]

Amint az ez alábbiakból érthetővé válik, az egy helyre irányuló mutagenézis technológiájára jellemző, hogy egy olyan fág-vektort alkalmaz, amely egyszálas és kétszálas formában is előfordul. Az egy helyre irányuló mutageneziseknél tipikusan alkalmazott vektor például az M13 fág, amelyet Messing és mtsai írtak le [Third Cleveland Symposium on Macromolecules nad Rcombinant DNA, Editor A. Walton, Elsevier, Amsterdam (1981), amelyet itt referenciaként használunk fel.] A fág a kereskedelemből könnyen beszerezhető, és alkalmazása általánosan jól ismert a szakemberek körében. Egy egyszálú DNS nyerésére másik módon olyan plazmid vektorokat is lehet alkalmazni, amelyek a replikációs hely origójában egyszálas fágot tartalmaznak [Veira és mtsai, Meth. Enzymol., *153*, 3, (1987).]

Általában ezeknek megfelelően egy helyre irányuló mutagenezist úgy hajtunk végre, hogy először egy olyan egyszálas vektort állítunk elő, amelynek szekvenciája tartalmazza a kívánt fehérjét kódoló DNS szekvenciát. Készítünk egy oligonukleotid indítóanyagot, amely tartalmazza a kívánt mutáns szekvenciát, ezt általában szintetikusan állítjuk elő, például Crea és mtsai módszerével Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *75*, 5765 (1978)]. Ezt az indítóanyagot ezután hozzáillesztjük a fehérje szekvencia rész kódszakaszát tartalmazó egyszalú vektorhoz, majd DNS-polimeráz enzimek, így E. coli polimeráz I (Klenow fragmentum) hatásának tesszük kí, így teljessé tesszük a mutációs részt tartalmazó szál szintézisét. Így a mutált szekvencia és a második szál tartalmazza a kívánt mutációt. Ezt a heteroduplex vektort használjuk fel ezután a megfelelő sejtek, így például JM101 sejtek, transzformálására, és kiválasztjuk azokat a klónokat, amelyek tartalmazzák a mutált szekvenciával rendelkező rekombináns vektorokat.

Miután kiválasztottuk ezt a klónt, a mutált fehérjét kódoló régiót eltávolítjuk, és egy megfelelő vektorba helyezzük fehérjetermelés céljából. Általában egy olyan típusú vektort alkalmazunk, amely felhasználható egy megfelelfő gazdaszervezet transzformálására.

Az aminosavszekvencia-deléciók általában 1–30 előnyösen 1–10 aminosav-maradékra vonatkoznak, és jellemzően összefüggőek. A deléciók tartalmazhatnak egy immunglobulin doment, így például az ICAM-2 1-es vagy 2-es doménjét. Az aminosavszekvencia-inszertumok alapvetően nem korlátozott hosszúságú polipeptidek amino- és/vagy karboxi-végéhez történő fuzióval mennek végbe, illetve egy vagy több aminosav intraszekvenciális inszerciójával. Az intraszekvenciális inszertumok (azaz a teljes ICAM-2 molekula szekvencián belül lévő inszertumok) 1–10, előnyösen 1–5 maradék méretűek. A terminális inszerció egyik példája magában foglalja egy, a gazdasejtekkel akár homológ, akár heterolog szignál-szekvenciának a molekula N-végéhez történő fuzióját abból a célból, hogy megkönnyítse az ICAM-2 funkcionális származékának a szekrécióját a rekombináns gazdasejtből.

A funkcionális származékok harmadik csoportját azok alkotják, amelyekben az ICAM-2 molekulában legalább egy, előnyösen csak egy aminosav-maradékot távolítottunk el, és ezt más aminosavval helyettesítjük ezen a helyen. Az ilyen szubsztitúciókat előnyösen a következő táblázatnak megfelelően végezzük, ha az ICAM-2 molekula tulajdonságait kis mértékben kívánjuk megváltoztatni.

1. táblázat

Eredeti csoport	Szubsztitúciós példák
Ala	Gly; Ser
Arg	Lys
Asn	Gln; His
Asp	Glu
Cys	Swr
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Ala; Pro
His	Asn; Gln
Ile	Leu; Val
Leu	Ile; Val
Lys	Arg; Gln; Glu
Met	Leu; Tyr; Ile
Phe	Met; Leu; Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp; Phe
Val	Ile; Leu

A funkcionális vagy immunológiai azonosság lényeges megváltoztatásai úgy történtek, hogy olyan szubsztitúciókat választottunk ki, amelyek nagyobb mértékben térnek el, mint az 1. táblázatban felsoroltak, azaz olyan csoportokat választottunk ki, amelyek sokkal szignifikánsabban eltérő hatásúak a polipeptid váz szerkezetére a szubsztitúció helyén, például egy egyenes vagy helikális konformáció helyén, (b) a célhelyen a molekula töltésére vagy hidrofobitására vagy (c) az oldallánc tömegére. A szubsztitúciók általában olyanok, amelyekben (a) glicint és/vagy prolint helyettesítünk más aminosavval, vagy deletáljuk vagy inszertáljuk azokat; (b) hidrofil csoportokat, így szeril- vagy treonil-csoportot helyettesítünk egy hidrofob csoporttal, például leucil-, izoleucil-, fenilalanil- valil- vagy alanil-csoporttal; (c) egy ciszteinmaradékot helyettesítűnk egy bármilyen más csoporttal; (d) egy elektropozitív oldalláncot tartalmazó csoportot, így lizil-, arginil- vagy hisztidil-csoportot helyettesítünk egy elektronegatív töltésű csoporttal, így glutamil- vagy aszpartil- csoporttal vagy (e) egy nagy térkitöltésű oldallánccal rendelkező aminosavat, így fenilalanint helyettesítünk egy olyan aminosavval, amely nem rendelkezik ilyen oldallánccal, pl. glicínnel.

A legtöbb deléciótól és inszerciótól, valamint szubsztitúciótól nem várható, hogy radikálisan megváltoztassa az ICAM-2 molekula tulajdonságait. Minthogy azonban nehéz előre megmondani ezen szubsztitúciók, deléciók és inszerciók pontos hatását, mielőtt ezeket elvégeznénk, egy szakember csak a rutin szűrővizsgálatok elvégzése

után tudja azokat megítélni. Például, egy tipikus funkcionális származékot állítunk alá a natív ICAM-2 molekulát kódoló nukleinsav egy helyre irányuló mutagenezisével, a variáns nukleinsav rekombináns sejttenyészetben való expressziójával és esetleg azt a sejttenyészetből tisztítva, például egy anti-ICAM-2 molekula antitest oszlopon immunaffinitás adszorbcióval (abból a célból, hogy adszorbeáljuk a funkcionólis származékot a legalább egy visszamaradó immun-epitophoz).

Az ICAM-2 affinitásának a fokozását célzó mutációkat olyan aminosavak bevitelével lehet segíteni, amelyek az ICAM-1-ben homológ helyen találhatóak. Hasonló módon elő lehet állítani olyan ICAM-2 molekulákat, amelyekben az ICAM-1 homológ helyén lévő N-hez kapcsolódó CHO hiányzik.

A sejt-lizátumból vagy a tisztított ICAM-1 molekula funkcionális származékai közül a kívánt aktivitású molekulák megfelelő szűrővizsgálattal kiválaszthatóak. Például a funkcionális származék immunológiai tulajdonságának a változását, így például egy adott antitesthez való affinitását kompetitív típusú immunvizsgálattal állapítjuk meg. Az immunmoduláció változását megfelelő módszerrel mérjük. A fehérje tulajdonságainak a vizsgálata, így a redox- vagy hőstabilitás, a biológiai felezési idő, hidrofobicitás, a proteolitikus lebontással szembeni érzékenység vagy vivőanyagokkal való aggragációs vagy multimer képzési hajlam, a szakemberek által jól ismert módszerekkel történhet.

B. Az ICAM-2 hatását segítő és csökkentő szerek

Az ICAM-2 hatását segítő anyag („agonist") egy olyan vegyület, amely emeli vagy fokozza az ICAM-2 képességét biológiai funkciójának a kifejtésében. Ilyen hatást segítő anyagra példa egy olyan szer, amely növeli az ICAM-2 azon képességét, hogy kötődjék a celluláris receptorhoz vagy vírus-fehérjéhez.

Az ICAM-2-nek a hatását csökkentő vegyület („antagonist"), amely csökkenti vagy megakadélyozza az ICAM-2 képességét, hogy kifejtse bármelyik biológiai funkcióját, Ilyen hatást csökkentő anyag például az ICAM-1, az ICAM-1 funkcionális származékai, anti-ICAM-2 antitest, anti-LFA-1 antitest stb. A celluláris aggregációs vizsgálatot az US-P 5284931 számú szabadalmi iratban írják le, amelyet itt teljes egészében referenciaként tekintünk. Ezek az eljárások alkalmazhatóak az LFA-1-től függő aggregáció mérésére és azon szerek azonosítására, amelyek befolyásolják az ICAM-2/LFA-1 aggregáció mértékét. Így ezek a vizsgálatok felhasználhatóak az ICAM-2 hatását segítő és csökkentő szerek azonosítására. A hatást csökkentő szerek oly módon hatnak, hogy csökkentik az LFA-1 vagy az ICAM-2 aggregációt befolyásoló képességét. Ezenkívül nemimmunglobulin szerekről (azaz kémiai anyagokról) is megállapítható a fent leírt vizsgálatokkal, hogy azok a hatást fokozó vagy csökkentő hatást fejtenek-e ki az ICAM-2/LFA-1 aggregációra.

C. Anti-ICAM-2 antitest

A jelen találmány szerinti előnyös hatást csökkentő anyag az ICAM-2 egy antiteste. Számos különböző módon lehet előállítani megfelelő antitestet.

Egy antigén molekula, mint az ICAM-2, természetes módon a limfociták felületén fejeződik ki. Így egy ilyen sejtet egy állatba például intraperitoneálisan beinjektálva olyan antitestek termelését eredményezheti, amelyek képesek kötődni az ICAM-2-höz vagy a CD-18 molekula család tagjaihoz. Ha szükséges, ezen állatok szérumát el lehet távolítani, és fel lehet használni a fenti molekulákat kötni képes poliklonális antitestek forrásaként.

Egy másik módon anti-ICAM-2 antitesteket Delden, R.F. (Európai Szabadalmi Bejelentés, közzétételi szám: 289 043) vagy R.F. Selden és mtsai [Science, *236*, 714–718 (1987)] módszerének az adaptálásával is elő lehet állítani. Ezen módszer alkalmazása szerint egy megfelelő állat (például egér stb.) sejtjeit transzfektálunk egy vektorral, amely képes kifejezni akár az intakt ICAM-2 molekulát, vagy az ICAM-2 egy fragmentumát. Az állat transzfektált sejtjeiben az ICAM-2 termelése az állatban immunválaszt vált ki, és anti-ICAM-2 antitestek termelését eredményezi.

Egy másik módon, anti-ICAM-2 antitesteket úgy is elő lehet állítani, hogy ICAM-2-t, vagy annak egy peptid fragmentumát egy megfelelő állatba bevisszük. Az immunizált állat ennek hatására poliklonális antitestet fog termelni. Az ICAM-2 peptid fragmentumainak az alkalmazása lehetővé teszi régió-specifikus antitestek előállítását, amelyek csak az állat immunizálására alkalmazott peptid fragmentumokat tartalmazó epitop(ok)kal szemben aktívak.

Azonban előnyösebb az állatból eltávolítani a splenocitákat (az állatokat előzőleg bármelyik fent leírt módon immunizálva), ezeket a lépsejteket mieloma sejtvonallal fuzionálni, és lehetővé tenni, hogy ezek a fuziós sejtek olyan hibridoma sejteket képezzenek, amelyek ICAM-2-t kötni képes monoklonális antitesteket szekretálnak.

A fent leírt módon előállított hibridoma sejteknek az ICAM-2-höz kötődni képes antitesteket kiválasztó kívánt hibridoma sejtek kiválasztására irányuló szűrővizsgálatát különböző módokon lehet elvégezni. Egy előnyös szűrővizsgálati módszer szerint az ilyen molekulákat azon képességük alapján azonosítjuk, hogy gátolják az ICAM-2-t kifejező és az ICAM-1-et nem kifejező sejtek aggregációját. Ezt az aggregációt gátolni képes antitesteket ezután további szűrővizsgálatnak vetjük alá annak a meghatározására, hogy az aggregáció gátlást az ICAM-2-höz, illetve a CD-18 molekulacsalád egy tagjához való kötődésen keresztül fejtik-e ki. Bármelyik módszer, amelyik képes megkülönböztetni az ICAM-2-t a CD-18 molekulacsaládtól, alkalmazható ebben a szürővizsgálatban. Így például az antitesthez kötődött antigén analizálható immunprecipitációval és poliakrilamid-gél elektroforézissel. A CD-18 molekulacsalád tagjait és az ICAM-2-t kötő antitestek megkülönböztetése lehetséges olyan szűrővizsgálattal, amely segítségével azt állapítjuk meg, hogy az antitest kötődik-e az LFA-1-et kifejező sejtekhez, de nem kötődik az ICAM-2-t kifejező sejtekhez (vagy fordítva). Egy antitest azon képességét, hogy az kötődik az LFA-1-et kifejező sejthez, de

nem kötődik az ICAM-2-t kifejezőhöz, általánosan ismert módon meg lehet állapítani. Ez azt jelenti, hogy immunvizsgálattal (különösen immunfluoreszcencia alkalmazásával), sejt agglutinációval, szűrőhöz való kötődés vizsgálatával, antitest precipitációval, stb.

Az ICAM-2 fent leírt funkcionális származékain kívül más szerek is alkalmazhatóak a jelen találmány szerint a vírusfertőzések vagy gyulladások kezelésére, amely szerek lehetnek ICAM-2-vel szembeni antitestek, az anti-ICAM-2 antitestekkel szembeni anti-idiotipikus antitestek és receptor molekulák vagy ilyen molekulák fragmentumai, amelyek képesek kötődni az ICAM-2-höz.

Az alkalmazható ICAM-2-vel (vagy az ICAM-2 funkcionális származékaival) szembeni antitestek lehetnek poliklonálisak vagy monoklonálisak.

A jelen találmány szerint érdekességgel bíró anti-idiotipikus antitestek képesek az ICAM-2-vel kompetitív módon kötődni (vagy azt kizárni). Az ilyen antitesteket például úgy lehet előállítani, hogy egy anti-ICAM—2 antitesttel szembeni antitestet fejlesztünk ki, és az antitestet szűrővizsgálatnak vetjük alá annak megállapítására, hogy képes-e kötni az ICAM-2 egy természetes ligandumát.

Minthogy a CD-18 család molekulái képesek kötődni az ICAM-2-höz, az ilyen molekulákkal (például alfa és béta alegységekkel rendelkező heterodimerekkel, vagy csak egy alfa vagy egy béta alegységből álló molekulákkal, vagy olyan molekulákkal, amelyek egyik vagy mindkét alegység fragmentumát tartalmazzák) való kezelés esetében ezek képesek versengeni (vagy azt kizárni) a HRV-vel a sejten lévő ICAM-2-höz való kötődésben.

A jelen találmány szerinti anti-aggregációs antitestek számos módon azonosíthatók és titrálhatók. Például mérni lehet az antitestek különböző kötődő képességét az ICAM-2-t kifejező sejteikez (ilyenek az aktivált endotéliális sejtek), és azt, hogy nem képesek kötődni az ICAM-2-t nem kifejező sejtekhez. A sejtek aggregációjának a vizsgálatára alkalmas módszereket az US-P 5 284 931 számú szabadalmi iratban írják le, amelyet teljes egészében referenciaként tekintünk. Egy másik módon az antitestek azon kapacitása, hogy kötődjenek az ICAM-2-höz vagy az ICAM-2- peptid fragmentumaihoz, szintén mérhető. Amint az a szakember számára könnyen érthető, a fenti vizsgálatokat módosítani lehet, vagy más sorrendben lehet alkalmazni, ezáltal lehetővé téve hatásos szűrővizsgálatok különböző útjait, amelyek mindegyike alkalmas azonosítani vagy különbséget tenni az ICAM-1-et kötni képes antitestek és a CD-18 molekulacsalád tagjai között.

Egy még előnyösebb módszer szerint az antitesteket szelektálni lehet azon képességük alapján, hogy kötődnek-e az ICAM-2-t kifejező COS sejtekhez, de ezzel szemben nem kötődnek az ICAM-2-t nem kifejező COS sejtekhez.

D. A jelen találmány szerinti hatóanyagok előállítása.

A jelen találmány szerinti hatóanyagokat természetes eljárásokkal (igy például egy állat, növény, gombák, baktériumok stb. ICAM-2-t kötni képes poliklonális antitestek termelésére való indukálásával); szintetikus módszerekkel így például Merrifield módszerét alkalmazva polipeptidek, így ICAM-2 funkcionális származékainak vagy az ICAM-2 antagonista fehérjék (akár immunglobulin, akár nesm immunglobulin) szintéziséről; hibridoma technológiával (így például az ICAM-2-höz kötődni képes monoklonális antitesteket termelve) vagy rekombináns technológiával (így például a jelen találmány szerinti hatóanyagokat termelve különböző gazdaszervezetekben, pl. élesztőben, baktériumokban, gombákban, emlős sejttenyészetekben stb. vagy rekombináns plazmidokból vagy vírus vektorokból állíthatjuk elő.

A módszer kiválasztása különböző tényezőktől függ, így a könnyű kivitelezhetőségtől, a kívánt hozamtól stb. Nem szükséges, hogy a fentiek közül csak egy módszert, eljárást vagy technológiát alkalmazzunk a gyulladás elleni szer termelésére. A fent leírt eljárások, módszerek és technológiák kombinálhatók abból a célból, hogy egy megfelelő hatású szert állítsunk elő.

V. Az ICAM-2, funkcionális származékai, valamint ezek hatását fokozó és hatását gyengítő szerek felhasználása.

A) A gyulladás visszaszorítása

A jelen találmány egyik tárgya az ICAM-2 és funkcionális szarmazékainak azon képességén alapszik, hogy kölcsönhatásba lépnek a CD-18 molekulacsalád receptoraival, különösen az LFA-1-el vagy vírus fehérjékkel (mint például a rhinovirus fehérjéjével stb.). Az ICAM-2 azon előnyös képessége, hogy kölcsönhatásba lép a glikoproteinek CD-18 családjával, felhasználható gyulladás visszaszorítására (azaz megelőzésére vagy csökkentésére).

A „gyulladás" kifejezést itt a specifikus védekező rendszer reakcióira és a nem-specifikus védekezőrendszer reakcióira használjuk.

A „specifikus védekezőrendszer" kifejezést itt az immunrendszer azon komponenseire használjuk, amelyek specifikus antigének jelenlétére reagálnak. A gyulladást a specifikus védekezőrendszer válaszának az eredményeként tekintjük, ha a gyulladást a specifikus védekezőrendszer okozza, befolyásolja vagy annak reakciójával van összefüggésben, specifikus védekező rendszer válasza által okozott gyulladás például az antigénekre, így a rubella vírusra adott válasz, az autoimmun betegségek, a T-sejtek által közvetített késleltetett típusú túlérzékenységi válasz (amint az például az olyan egyéneken tapasztalható, akik „pozitív" Mantaux választ adnak) stb. Krónikus gyulladásos betegségek és a transzplantált szövetek és szervek kilökődése további példák a specifikus védekező rendszer gyulladásos reakciójára.

A „nem-specifikus védekező rendszer" kifejezés itt immunológiai memóriával nem rendelkező leukociták által közvetített reakcióra vonatkozik. Ilyen sejtek a granulociták és a makrofágok. A jelen leírásban egy gyulladást akkor tekintünk a nem-specifikus védekezőrendszer

eredményének, ha a gyulladást a nem-specifikus védekezőrendszer reakciója okozza, közvetíti vagy azzal összefüggésben van. lyen gyulladásokra példák, legalábbis részben, amelyek a nem-specifikus védekezőrendszer eredményeként jönnek létre, a következők: felnőttkori légzési elégtelenségi tünet (adult respiratory distress syndrome, a továbbiakban ARDS); vagy vérmérgezéshez vagy traumához másodlagosan kapcsolódó, több helyen fellépő szöveti károsodás; a szívizomzat vagy más szövetek reperfúziós károsodása akut glomerulonephritis; reactiv arthritis; akut gyulladásos dermatitiszek; akut purulens meningitis vagy más központi idegrendszeri gyulladásos betegségi hő okozta károsodás; hemodializis; leukaferezis; ulcerativoolitis; Crohn-féle betegség; nekrotizáló enterocolitis; granulocita transzfúzióhoz kapcsolódó tünetek és citokin által okozott toxikus állapot.

Amint fent leírtuk, az ICAM-2 molekulának a CD-18 család molekuláihoz való kötődésének központi jelentősége van a celluláris adhézióban. Az adhézió folyamatán keresztül a limfociták képesek folyamatosan ellenőrizni egy állatban az idegen antigének jelenlétét. Jóllehet ezek a folyamatok normális körülmények között kívánatosak, azonban ezek az okai az átültetett szervek kilökődésének, az átültetett szövetek kilökődésének és sok autoimmun betegségnek is. Ezért bármely mód, amely a sejt adhéziót gyengíteni vagy meggátolni képes igen kívánatos a szerv transzplantátumokat (különösen a vese transzplantátumok esetén), átültetett szövetet befogadók vagy autoimmun betegségben szenvedők számára.

A CD-18 család tagjaival szembeni monoklonális antitestek képesek gátolni a leukocitál; adhéziótól függő funkcióit, beleértve az endotheliumhoz való kötődést [D. Haskard és mtsai, J. Immunol., *137*, 2901–2906 (1981)], a homotipusos adhéziókat [R. Rothlein és mtsai, J. Exp. Med., *163*, 1132–1149 (1986)], a limfociták antigén és mitogén által indukált proliferációját [D. Davignon és mtsai, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, *78*, 4535–4539 (1981)], antitestképződést [A. Fischer és mtsai, J. Immunol., *136*, 3198–3203 (1986)] és minden leukocita effektor funkcióját, így a citotoxikus T-sejtek [A.M. Krensky és mtsai. J. Immunol., *132*, 2180–2182 (1984)], makrofágok [G.Strassman és munkatásai, J. Immunol., *136*, 4328–4333 (1986)] és minden sejt litikus aktivitását, amely résztvesz az antitest-függő celluláris citotoxikus reakciókban [S. Kohl és mtsai. J. Immunol., *133*, 2972,-2973 (1984)]. Az összes fenti hatásokban az antitestek gátolják a leukociták azon képességét, hogy a megfelelő celluláris szubsztráthoz kapcsolódjanak, amely viszont gátolja a végső következményt. Ezek a funkciók, amilyen mértékig magukban foglalják az ICAM-2/LFA-1 kölcsönhatásokat, anti-ICAM-2 antitesttel visszaszoríthatók.

Így az ICAM-2-höz kötődni képes monoklonális antitestek alkalmazhatóak emlősökben mint gyulladáselleni szerek. Ezek a szerek szignifikánsan eltérnek az általánosan ismert gyulladáselleni szerektől, amennyiben ezek képesek szelektíven gátolni az adhéziót és nem rendelkeznek más mellékhatással, mint például nephrotoxicitással, amely a szokásos szerek esetében tapasztalható.

Minthogy az ICAM-2, különösen oldható formájában képes egy, a CD-18 család tagjaival szembeni antitesttel azonos módon hatni, az gyulladás visszaszorítására felhasználható. Továbbá, az ICAM-2 funkcionális származékai és antagonistái szintén alkalmazhatók gyulladás visszaszorítására.

1. A késleltetett típusú túlérzékenységi reakciók visszaszorítói.

Az ICAM-2 molekulák részben közvetítőként hatnak a gyulladásos reakciók, így a késleltetett típusú túlérzékenységi reakciók kialakulásához szükséges adhéziós folyamatokban. Így azon antitestek (különösen monoklonális antitestek), amelyek képesek kötődni az ICAM-2 molekulákhoz, terápiás hatással rendelkeznek az ilyen reakciók gyengítésében vagy megszüntetésében.

A fentitől eltérő módon – minthogy az ICAM-2 antagonistája az ICAM-1/LFA-1 kölcsönhatásnak – az ICAM-2 (különösen oldható formában) vagy funkcionális származékai felhasználhatók a késleltetett típusú túlérzékenységi reakciók visszaszorítására.

Ezt a terápiás alkalmazási lehetőséget két módon is fel lehet használni, elsősorban egy, az ICAM-2-vel szembeni monoklonális antitestet tartalmazó gyógyszerkészítményt lehet adni a betegnek, aki késleltetett típusú túlérzékenységi reakcióban szenved. Például ilyen összetételű szert lehet adni olyan egyéneknek, akik olyan antigénekkel kerültek érintkezésbe, mint a mérges szömörce (poison ivy, poison oak) stb. Egy másik megvalósítás szerint egy betegnek az ICAM-2-höz kötődni képes monoklonális antitest egy antigénnel együtt adható egy várható gyulladásos reakció megelőzésére. Így, egy antigén és egy ICAM-2-t kötő monoklonális antitest együttes adása esetén az átmenetileg toleránssá tehet egy egyént egy ezt követően adott antigénnel szemben.

2. Krónikus gyulladásos betegség terápiája

Minthogy a leukocita adhézió hiányos betegségben (leukocyte adhesion deficiency, a továbbiakban LAD) szenvedő egyének nem rendelkeznek LFA-1-el, nem hoznak létre gyulladásos választ, azt lehet hinni, hogy az LFA-1 természetes ligandum antagonistája, az ICAM-2 szintén meggátolja a gyulladásos válasz reakciót. Az ICAM-2-vel szembeni antitestek azon képessége, hogy a gyulladást meggátolják, képezi az alapját ezek terápiás alkalmazásának a krónikus gyulladásos betegségek és autoimmun betegségek, így például lupus erythematosum, autoimmun thyroiditis, kísérletes allergiás encephalomyelitis (experimental allergic encephamyelitis, a továbbiakban EAE), multiplex sclerosis, a diabetes egyes formái, Reynaud-féle szindroma, rheumatoid arthriris stb., kezelésében. Az ICAM-2-höz kötődni képes monoklonális antitestek többnyire alkalmazhatók azon betegségek kezelésében, amelyek általában szteroidokkal kezelhetők.

A jelen találmánynak megfelelően, ezek a gyulladásos és immun kilökődési válaszreakciók visszaszoríthatók (azaz akár megelőzhetők, vagy gyengíthetők) az ilyen kezelést igénylő betegeknek az adott gyulladás visszaszorítására elegendő mennyiségű gyulladás elleni

szert adva. Megfelelő gyulladás elleni szerek a következők: egy, az ICAM-2-höz kötődni képes antitest; egy antitestnek egy fragmentuma, amely fragmentum képes kötődni az ICAM-2-höz; ICAM-2; az ICAM-2 egy funkcionális származékai az ICAM-2 egy nem-immunglobulin antagonistája, amely nem azonos az ICAM-1-el vagy az ICAM-2 egy nem-immunglobulin antagonistája, amely nem azonos az LFA-1-el. Különösen előnyösek azok a gyulladás elleni szerek, amelyek az ICAM-2-nek egy oldható funkcionális származékát tartalmazzák. Egy ilyen gyulladás elleni kezelés magában foglalhatja még egy, a következő csoportból választott szer adását is: egy, az LFA-1-hez kötődni képes antitest; egy antitest funkcionális származéka, amely funkcionális származék képes kötődni az LFA-1-hez; és egy az LFA-1-nek egy nem-immunglobulin antagonistája.

A találmány a fent leírt módszereken belül magában foglal egy eljárást a specifikus védekező rendszer gyulladásos válasz reakciójának a visszaszorítására, amely szerint a betegnek még egy immunszuppresszív hatású szert is adunk. Ezt a szert előnyös alacsonyabb dózisban (azaz „szub-optimális" dózisban) adni, mint az normálisan szükséges lenne. Egy szub-optimális adag alkalmazása azért lehetséges,mert az szinergetikus hatású a jelen találmányban megadott hatóanyagokkal. A megfelelő immunszuppresszív anyagok például a következők lehetnek: dexamethason, azathiprin, ICAM-1, cyclosporin A stb.

3. Nem-specifikus gyulladás terápiája

A jelen találmány részben abból a felfedezésből származik, hogy a granulocita-endotéliális sejt adherencia a CD-18 család glikoproteinjeinek az endotéliummal való kölcsönhatásának a következménye. Minthogy a celluláris adhézió szükséges ahhoz, hogy a leukociták a gyulladás helyére vándoroljanak és/vagy különböző effektor funkciókat fejtsenek ki a gyulladással kapcsolatban, azon szerek, amelyek gátolják a celluláris adhéziót, gyengíteni fogják vagy megelőzik az ilyen gyulladást. Az ilyen gyulladásos reakciók a „nem specifikus védekező rendszer" reakciójának tulajdoníthatóak, amelyeket immunológiai memóriával nem rendelkező leukociták közvetítenek. Ilyen sejtek a granulociták és makrofágok. Itt a gyulladást a nem specifikus védekező rendszer válasz reakciója eredményének tekintjük, ha a gyulladást a nem specifikus védekező rendszer reakciója okozza, közvetiti vagy azzal kapcsolatos.

A legalább részben a nem specifikus védekezőrendszer reakciójaként fellépő gyulladásokra példa az olyan gyulladás, amely kapcsolatban van a következő állapotokkal: felnőttkori légzési elégtelenségi tünet (ARDS) vagy multiplex szerv károsodási tünet, amely másodlagosan jelentkezik vérmérgezés vagy trauma eseteiben: a szívizomzat vagy más szövet reperfúziós károsodása; akut glomerulonephritis reaktív arthritis; akut gyulladásos tünetekkel járó dermatitis; akut purulens meningitis vagy más központi idegrendszeri gyulladásos betegség; hő okozta károsodás haemodializis; leukapheresis; ulcerativ colitis; Crohn-féle betegség nekrotizáló enteroctilitis; granulocita transzfuzióval kapcsolatos tünetek, valamint citokin által indukált toxikus állapot.

A jelen találmány szerinti gyulladás elleni hatóanyagok olyan vegyületek, amelyek képesek specifikusan antagonizálni a granulocitákon lévő CD-18 komplex kölcsönhatását az endotéliális sejtekkel. Az ilyen antagonisták a következők: ICAM-2; az ICAM-2 egy funkcionális származéka; az ICAM-2-nek egy nem-immunglobulin antagonistája, amely nem azonos az ICAM-1-el vagy a CD-18 molekulacsalád egy tagjával.

B. A szerv- és szövetkilökődés visszaszorítói

Minthogy az ICAM-2, különösen oldható formában a CD-18 család tagjainak az antitestjeként képes hatni, felhasználható bármely sejt adhéziótól függő funkció által okozott szerv- vagy szövetkilökődés visszaszorítására. Továbbá, az anti-ICAM-2 antitest és az ICAM-2 antagonisták és funkcionális származékok szintén alkalmazhatók az ilyen kilökődések visszaszorítására.

Az ICAM-2 és az ICAM-2-höz kötődni képes antitestek felhasználhatók szerv vagy szövetkilökődés megelőzésére, vagy az autoimmun válaszok módosítására emlősök esetében anélkül, hogy mellékhatással rendelkeznének.

Nagy fontossággal bír, hogy az ICAM-2-t felismerni képes monoklonális antitestek lehetővé teszik a szervátültetéseket olyan egyének között is, akik HLA-ja (humán leucocyta antigen) nem összeillő.

C. A terápiás vagy diagnosztikus célból alkalmazott antigén anyag adásának kiegészítése.

A terápiás vagy diagnosztikus szerekre, például marha inzulinra, interferonra, szövettípusú plazminogén aktivátorra vagy egér monoklonális antitestekre adott immunválasz lényegében hátrányosan befolyásolja ezen sejtek terápiás vagy diagnosztikai értékét, és tény, hogy ezek betegséget, így szérumbetegséget is okozhatnak. Ezt a helyzetet orvosolni lehet a jelen találmány szerinti antitesek alkalmazásával. Az ilyen irányú magvalósítás esetén ezeket az antitesteket a terápiás vagy diagnosztikai szerrel együtt lehet alkalmazni. Az antitestek hozzáadása megelőzi, hogy a recipiens felismerje a szert és így megelőzi azt, hogy a recipiensben azzal szembeni immunválasz jöjjön létre. Az ilyen immunválasz elmaradása azt eredményezi, hogy a betegnek további terápiás vagy diagnosztikai szer adható.

Az ICAM-2-t (különösen oldható formáját) vagy annak funkcionális származékait alkalmazni lehet betegségek kezelésében az ICAM-1-et, vagy az LFA-1-et kötni képes antitestek helyett. Így, oldható formában ezek a molekulák felhasználhatóak átültetett szerv vagy szövet kilökődésének a meggátlására. Az ICAM-2, vagy annak funkcionális származékai azonos módon alkalmazhatók mint az anti-ICAM-2 antitestek a terápiás vagy diagnosztikai szerek immunogén hatásának a csökkentésére.

D. Tumor metasztázisok visszaszorítói

A jelen találmányban megadott szerek alkalmazhatók a hematopoietikus tumorsejtek metasztázisának a visszaszorítására, amely sejtek a vándorlásukhoz a CD—18 családnak egy funkcionális tagját igénylik. A jelen találmány ezen megvalósításának megfelelően az ilyen keze-

lést igénylő betegnek a hatóanyag (mint például az ICAM-2-t kötni képes antitest; az ICAM-2-t kötni képes toxin-származék antitest; egy antitest fragmentum, amely fragmentum képes kötődni az ICAM-2-höz egy antitest toxin-származék fragmentuma, amely fragmentum képes az ICAM-2-höz kötődni; ICAM-2; az ICAM—2-nek egy funkcionális származéka; az ICAM-2-nek egy nem-immunglobulin antagonistája, amely nem azonos az ICAM-1-el) olyan mennyiségét adjuk, amely elegendő a metasztázis viszszaszorítására.

A találmány egy módszert is megad az ICAM-2-t kifejező tumorsejtek szaporodásának a visszaszorítására, amely szerint az ilyen kezelést igénylő betegnek a fenti sejtszaporodás visszaszorítására elegendő mennyiségű hatóanyagot adunk. Megfelelő hatóanyagok a következők: egy, az ICAM-2-höz kötődni képes antitest; egy, az ICAM-2-höz kötődni képes toxin-származék, antitest; egy antitest fragmentuma, amely fragmentum kötődni képes az ICAM-2-höz; egy antites toxin-származék fragmentuma, amely fragmentum képes kötődni az ICAM-2-höz; ICAM-2; az ICAM-2-nek egy funkcionális származéka; az ICAM-2-nek egy nem-immunglobulin antagonistája, amely nem azonos az ICAM-1-el; a CD-18 molekulacsalád egy toxin-származék tagja; és a CD-18 molekulacsalad egy tagjának egy toxin-származék funkcionális származéka.

A találmány megad még egy módszert az LFA-1-et kifejező tumorsejtek szaporodásának a visszaszorítására is, amely szerint az ilyen kezelést igénylő betegnek a fenti sejtek szaporodásának a visszaszorítására elegendő mennyiségű toxint adunk. Megfelelő toxinok az ICAM-2 toxin-származéka vagy az ICAM-2 funkcionális származékának egy toxin származéka.

E. Vírusfertőzés visszaszorítói

Az ICAM-1-ről az utóbbi időben bebizonyosodott, hogy a rhinovírusok nagyobb csoportjának a receptora [J.M. Greve és mtsai, Cell, *56*, 839–847 (1989); D.E. Staunton és mtsai, Cell, *56*, 849–853 (1989); J.E. Tomassini és mtsai, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *86*, 4907–4911 (1989), amely adatokat itt referenciaként használunk fel]. A rhinovírusok a kis, RNS tartalmú, fehérjeburokkal rendelkező picornavirus család tagjai, amelyek a közönséges meghűlések 40–50 %-át okozzák [R.R. Rueckert, Fields Virology, B.U. Fields és mtsai (kiadók) Raven Press, NY, (1985) 705–738 oldalak; S.J. Sperber és mtsai, Antimicr. Agents Chemo., *32*, 409–499 (1988), amelyeket itt referenciaként használunk fel]. Több mint 100 immunológiailag keresztreakciót nem adó rhinovirust vizsgáltunk meg, amelyek közül 90% kötődött az ICAM-1-hez.

Az ICAM-1 mellett a CD4 adhéziós molekulákról és a komplement receptor CR2-ről is azt állapították meg az utóbbi időben, hogy HIV és EBV vírusok esetében vírus receptorrá válnak [P.J. Maddon, Cell, *47*, 333–348 (1986); J.D. Fingeroth és mtsai, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *81*, 4510–4514 (1984), amelyeket itt refe--renciaként használunk fel]. Továbbá egy olyan molekula, amely az ICAM-1-hez hasonló Ig domen szerkezettel rendelkezik és amelynek celluláris adhéziós szerepe lehet, szintén egy poliovirus receptorrá válhat [C.L. Mendelsohn és mtsai, Cell, *56*, 855–865 (1989)].

Az ICAM-2 és funkcionális származékai a vírus (különösen a rhinovirus és még inkább a minor-szerotípusú rhinovírusok) megkötésében vagy a fertfőzésben receptorként hathatnak. Így, az ICAM-2-veI szembeni antitestek (vagy ezek fragmentumai), az ICAM-2, vagy az ICAM-2 funkcionális származékai arra használhatók fel, hogy blokkolják ezt a kötődést vagy fertőzést, és így visszaszorítják a vírusfertőzést.

F. Diagnosztikai és prognosztikai alkalmazások

Az ICAM-2-höz kötődni képes monoklonális antitesteket fel lehet használni arra, hogy képet kaphassunk vagy láthatóvá tegyük az ICAM-2-t kifejező és a gyulladásos helyeket a betegekben. Az ilyen felhasználás esetében a monoklonális antitestek detektálhatóan jelzettek radioizotopokkal, affinitás-jelzőkkel (így biotinnal, avidinnol stb.), fluoreszcens jelzőkkel, paramagnetikus atomokkal, jelzett anti-ICAM-2 antitesttel stb. Az ilyen jelzési eljárások jól ismertek a szakemberek számára. Az antitesteknek a klinikai alkalmazását a diagnosztilcai kép kialakítására H.B. Grossman [Urol. Clin. North Amer. *13*, 465–474 (1986)], [E.C. Unger és mtsai Invest. Radiol., *20*, 693–700 (1985)] és B. A. Khav és mtsai [Science, *209*, 295–297 (1980)] foglalták össze.

Az ICAM-2 expresszió jelenléte kötő ligandumok, így mRNS, cDNS vagy DNS segítségével is detektálható, amelyek kötődnek az ICAM-2 gén szekvenciákhoz az ICAM-2-t kifejező sejtekben. Ezen hibridizációs technikák keresztülvitelét Maniatis és mtsai [Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Coldspring Harbor, NY. (1982)] és B.D. Haymes és mtsai [Nucleic Acid Hybridization, a Practical Approach, IRL Press, Washington, DC, (1985)] írták le, amely adatokat itt referenciaként használunk fel.

Az ilyen detektálhatóan jelzett antitestek gócpontjának a felismerése jelzi az ICAM-2 expresszió vagy a tumor kifejlődésének a helyét. Az egyik megvalósítás szerint az expresszionak ezt a meghatározását úgy végezzük el, hogy szövet- vagy vérmintát veszünk és ezeket a mintákat olyan antitestek jelenlétében inkubáljuk, amelyek jelzettek vagy detektálhatóan jelezhetők. Egy előnyös megvalósítás szerint ez behatolás nélkül is megvalósítható mágneses képalkotással, fluorográfiával stb. Egy ilyen diagnosztikai teszt alkalmazható szervátültetés esetében a potenciális szövetkilökődés korai jeleinek a jelzésére. Az ilyen vizsgálatok abból a célból is elvégezhetők, hogy egy egyén rheumatoid arthritisre vagy krónikus gyulladásra való hajlamát megállapítsuk.

Radioaktív jelzéssel ellátott antitestekkel vagy antitest fragmantumokkal lehetséges az antigént radioimmun vizsgálatokkal deteictálni. A radioimmun vizsgálat (radyoimmune assay, a továbbiakban RIA) leírása megtalálható a „Laboratory Techniques and Biachemistry in Molecular Biology, T.S. Work és mtsai, North Holland Publishing Comapny, NY. (1978), ebben T. Chard „An Introduction to Radioimmuna Assay and Related Techniques" című fejezet, amelyben lévő adatokat itt referenciaként használunk fel. Ezenkívül

fluorszcens, enzimes vagy más alkalmas jelzések is használhatók.

A jelen találmány szerinti eljárásban alkalmazható, de a találmány oltalmi körét nem korlátozó jelzések a következők lehetnek: enzimes jelzések, radioizotóp jelzések, nem-radioaktív izotóp jelzések, fluoreszcens jelzések, toxin jelzések és kamilumineszcens jelzések.

Megelőző enzimes jelzések például a következők lehetnek;
malát-dehidrogenáz, staphylococcus-nukleáz, delta-5--szteroid-izomeráz, élesztő alkohol-dehidrogenáz, alfa--glicerol-foszfát-dehidrogenéz, trióz-foszfát-izomeráz, peroxidáz, alkalikus-foszfatáz, aszparagináz, gukóz-oxidáz, béta-galaktozidáz, ribonukleáz, ureáz, kataláz, glukóz-6-foszfát-dehidrogénáz, glukoamiláz, acetilkolineszteráz stb.

Megfelelő radioizotóp jelzések például a következők lehetnek:
^{3}H, ^{111}In, ^{125}J, ^{131}J, ^{32}P, ^{35}S, ^{14}C, ^{51}Cr,
^{57}To, ^{58}Co, ^{59}Fe, ^{75}Se, ^{152}Eu, ^{90}Y, ^{67}Cu, ^{217}Ci,
^{211}At, ^{212}Pb, ^{47}Sc, ^{109}Pd stb.

Megfelelő nem-radioaktív izotóp jelzések például a következők lehetnek:
^{157}Gd, ^{55}Mn, ^{162}Dy, ^{52}Tr, ^{56}Fe stb.

Megfelelő fluoreszcens jelzők például a következők lehetnek: ^{152}Eu jelző, fluoreszcein jelző, rodamin jelző, fikosritrin jelző, fikocianin jelző, allofikocisnin jelző, o-ftalaldehid jelző, fluoraszkamin jelző stb.

Megfelelő kemilumineszcens jelzők például a következők lehetnek: luminális jelző, izoluminális jelző, aromás akridinium-észter jelző, imidazol jelző, akridinium só jelző, oxalát-észter jelző, luciferin jelző, luciferáz jelző, aequorin jelző, stb.

VI. A jelen találmány szerinti készítmények terápiás alkalmazása

Az ICAM-2 terápiás hatását oly módon hasznosíthatjuk, hogy egy betegnek vagy az egész ICAM-2 molekulát vagy annak bármely terápiásan hatásos peptid fragmentumát adjuk, különös jelentőséggel bírnak az ICAM-2 azon peptid fragmentumai, amelyek oldhatók.

Az ICAM-2-t és annak funkconális származékait akár szintetikusan rekombinens DNS technológiával, vagy protaolizissel vagy ezen módszerek kombinációjával állíthatjuk elő. Az ICAM-2 terápiás előnyei fokozhatóak az ICAM-2 olyan funkcionális származékai által, amelyek további aminosav-maradékokat tartalmaznak a vivőanyaghoz való kötődés növelése és az ICAM-2 aktivitás fokozása céljából. A jelen találmány kiterjed továbbá az olyan ICAM-2 funkcionális származékokra is, amelyekből hiányoznak bizonyos aminosav csoportok vagy amelyek más aminosav-csoportokat tartalmaznak addig a határig, míg az ilyen származékok még rendelkeznek az ICAM-2 biológiai vagy farmakológiai aktivitásával.

A jelen találmányban megadott antitesteket és az ICAM-2-t akkor tekintjük „természetes szennyező anyagoktól lényegében mentes"-nek, ha az azt tartalmazó készítmények lényegében mentesek olyan anyagoktól, amelyek normális körülmények között és a természetben azzal együtt találhatók.

A jelen találmány kiterjed antitestekre és azok biológiailag aktív fragmentumaira (poliklonális vagy monoklonális), amelyek képesek kötődni az ICAM-2-höz. Az ilyen antitesteket elő lehet állítani állatokból vagy szövettenyészetekből vagy rekombináns DNS segítségével.

Egy betegnek ICAM-2-t kötni képes antitesteket vagy azok fragmentumait adva, vagy egy recipiens betegnek ICAM-2-t (vagy annak egy fragmentumát, variánsát vagy származékát) adva, a beadott szer adagja olyan tényezőktől függően fog változni, mint például a beteg kora, testsúlya, magassága, neme, általános egészségi állapota, előzetes egészségi állapota stb. Rendszerint kívánatos a befogadó egyénnek olyan dózis antitestet adni, amely közelítőleg 1 pg/kg és 10 mg/kg (a beteg testsúlyára vonatkoztatva), azonban alacsonyabb vagy magasabb adag is adható. Ha egy betegnek ICAM-2-t vagy annak egy funkcionális származékát adjuk, előnyös ezeket a molekulákat szintén 1 pg/kg és 10 mg/kg (a beteg testsúlyára vonatkoztatva) dózisokban alkalmazni, bár alacsonyabb vagy magasabb dózis is adható. Amint az alábbiakban majd tárgyalni fogjuk, a terápiás dózis csökkenthető, ha az anti-ICAM-2 antitestet együtt adjuk egy anti-LFA-1 antitesttel. Itt egy vegyületnek a másik vegyülettel való együttes adásán azt értjük, hogy a két vegyület adása olyan közeli időpontban történik, hogy mind a két vegyület azonos időben kimutatható a beteg szérumában.

Mind az ICAM-2-höz kötődni képes antitest, mint maga az ICAM-2 a betegnek beadható intravénásan, intramusculárisan, subcutan, bélen át vagy parenterálisan. Ha az antitestet vagy az ICAM-2-t injekció formájában alkalmazzuk, a beadás lehet folyamatos infúzió, vagy egyszeri, illetve ismételt implantált tabletta.

A jelen találmány szerinti hatóanyagok lehetővé teszik, hogy azokat egy recipiens egyénnek megfelelő mennyiségben adjuk a gyulladás visszaszorítására. Egy dózisról akkor mondjuk, hogy megfelelő mennyiségű a gyulladás visszaszorítására, ha a szer adagja, a beadás módja stb. elegendő a gyulladás csökkentésére vagy megelőzésére.

Az anti-ICAM-2 antitestet vagy annak egy fragmentumát adhatjuk külön is vagy egy vagy több immunszuppresszív hatású szerrel kombinációban (különösen egy szerv vagy szövet átültetése esetében). Az ilyen vegyület(ek) adása lehet „profilaktikus" vagy „terápiás" célú. Megelőzés céljából az immunszuppresszív vegyület(ek)et a szerv- vagy szövet-transzplantáció esetén bármilyen gyulladásos válaszreakció vagy -tünet (például közvetlenül előtte, egyszerre vagy röviddel a transzplantáció után) de a szervkilökődés bármely tünetének a megjelenése előtt kell adnunk, A vegyület(ek) profilaktikus adása azt a célt szolgálja, hogy megelőzze vagy gyengítse a várható gyulladásos válaszreakciót (így például az átültetett szerv vagy szövet kilökődését stb.). Ha terápiás célból adjuk, az immunszuppresszív hatású szereket aktuális gyulladás egy tünete (így például szerv vagy szövetkilökődés) kezdetekor vagy röviddel utána adjuk azt. A szer(ek) terápiás célú adása azt a célt szolgálja, hogy bármilyen aktuális gyulladást (így például egy átültetett szerv vagy szövet kilökődése) gyengítsünk.

A jelen találmány szerinti gyulladás elleni szerek ennek megfelelően alkalmazhatók akár a gyulladás kezdete előtt (a feltételezett gyulladás visszaszorítására) vagy a gyulladás fellépése után.

Egy gyógyszerkészítményről akkor mondjuk, hogy „farmakológiailag megfelelő", ha annak adása tolerálható a recipiens beteg számára. Egy ilyen szerről akkor mondjuk, hogy „terápiásan hatásos mennyiségben" adjuk, ha az adott mennyiség hatása élettanilag szignifikáns. Egy szer akkor szignifikáns élettani hatású, ha annak jelenléte a recipiens beteg fiziológiás állapotában kimutatható változást eredményez.

A jelen találmány szerinti antitestet és ICAM-2 molekulákat a gyógyszerkészítmények esetében ismert módszerek szerint lehet formulázni, amikor is ezek az anyagok vagy funkcionális származékaik gyógyászatilag megfelelő vivőanyaggal együtt kerülnek kiszerelése. Megfelelő vivőanyagokat, beleértve más humán fehérjét, például humán szérumalbumint és mindezek formázását például a Remington's Pharmacceutical Sciences [16th ed. Osol. A., Ed., Mack, Easton, PA., (1980)] írja le. A hatásos kezelés céljából megfelelő összetételű gyógyszerkészítmény előállítása céljából az ilyen készítmények tartalmazzák az anti-ICAM-2 antitest vagy az ICAM-2 molekula, vagy azok funkcionális származékainak hatásos mennyiségét a megfelelő mennyiségű vivőanyaggal együtt.

Ezenkívül farmakológiai vizsgálati módszereket lehet alkalmazni a hatás időtartamának a meghatározására. A szabályozott felszabadulást biztosító készítményeket olyan polimerek segítségével állíthatjuk elő, amelyek komplexet képeznek vagy adszorbeálják az anti-ICAM-2 antitestet vagy az ICAM-2-t, vagy ezek funkcionális származékait. A szabályzott felszabadulást megfelelő makromolekulák kiválasztásával (például poliészterek, poliaminosavak, polivinilpirrolidon, etilénvinilacetát, metilcellulóz, karboximetilcellulóz vagy protemin-szulfát) lehet vizsgálni, kiválasztva a makromolakula koncentrációt, valamint az összekapcsolás módszereit a felszabadulás szabályzása céljából. Másik lehetséges módszer a hatás időtartamának a szabályzására a szabályzott felszabadulást biztosító készítmények esetében az, hogy az anti-ICAM-2 antitestet vagy az ICAM-2 molekulákat, vagy ezek funkcionális származékait polimer anyag részecskéibe építjük be, ilyen polimerek lehetnek például poliészterek, poliaminosavak, hidrogélek, politejsav vagy etilén/vinil-acetát kopolimerek. Ezen szerek polimer részecskékbe való beépítése helyett ezeket az anyagokat mikrokapszulába lehet zárni, például koacervációs technikával vagy interfaciális polimerizációval, például etil-cellulóz vagy zselatin mikrokapszulákba és poli(metil-metakrilát) mikrokapszulákba, vagy kolloidális gyógyszer felszabadítást szabályozó rendszerbe, például liposzomáikba, albumin mikrogömbökbe, mikroemulziókba, nano-részecskékbe és nano-kapszulákba vagy makroemulziókba. Ezeket a módszereket a Remington's Pharmaceutical Sciences (1980) tartalmazza.

A találmány továbbá magában foglal egy gyógyszerkészítmény-kompozíciót, amely a következőket tartalmazza:

a) egy gyulladás elleni szert, (így egy, az ICAM-2-höz kötődni képes antitestet, egy antitest fragmentumot, amely fragmentum képes kötődni az ICAM-2-höz; ICAM-2-t; az ICAM-2-nek egy funkcionális származékát; az ICAM-2-nek egy nem-immunglobulin antagonistáját; amely nem azonos az ICAM-1-el) és

b) legalább egy immunszuppressziv hatású szert.

A megfelelő immunszupressziv hatású szerek például a következők lehetnek: dexamethasson, azathioprin és cyclosporin A.

Miután általánosságban leírtuk a találmányt, mindez még inkább érthető lesz a következő példák ismeretén keresztül, amelyeket a bemutatás céljából adunk meg és nem a jelen találmány oltalmi körének korlátozására (ha ez nincs külön feltüntetve).

1. példa

Az ICAM-2 cDNS klónozása

Az ICAM-2-t kódolni képes cDNS klónozása céljából Aruffo és Seed B. Seed és mtsai, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *34*, 3365–3369 (1987) cDNS-ek COS-sejtekben való expresszióval történő szelektálására szolgáló módosított módszerét alkalmaztuk a ligandumokat tartalmazó COS sejtek műanyag Petri-csészéhez kötött, funkcionálisan aktív, tisztított LFA-1-hez való megkötésére.

Részletezve, az LFA-1-et SKW-3 (DSM ACC 53) lizátumból tisztítottuk TS2/4 LFA-1 MAb Sepharose-on immunaffinitás kromatografálással az elúciót pH=11,5-nél végeztük 2 mM magnézium-klorid és 1% oktil-glükózid jelenlétében. Az LFA-1-et (10 μg/200/μl/6 cm lemez) bakteriológiai Petri-csészéhez kötöttük az oktil--glükozidot PBS-ben 2 mM magnézium-klorid oldattal 0,1%-osra hígítva, és éjjelen át inkubáltuk 4 °C-on.

A lemezeket 1%-os BSA-val lefedtük, és a következő elegyben tároltuk: PBS, 2 mM $MgCl_2$, 0,2% BSA, 0,025% azid, 50 g/ml gentamicin.

Az LPS-el (lipopoliszacharid) stimulált köldökzsinór véna endotéliális sejtjeiből cDNS génkönyvtárat szintetizáltunk Gubler és Hoffman módszerével, amint azt Staunton és mtsai [D.E. Staunton, Cell, *52*, 925–933 (1988)] leírtak. A második szál szintézisét követően a cDNS-t BstX1 adaptorokhoz ligáltuk [B. Seed és mtsai, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *84*, 3365–3369 (1987)] és a 600 bp-nál nagyobb cDNS-eket alacsony olvadáspontú (low melting point, a továbbiakban LMP) agaróz gél elektroforézissel elválasztottuk. Ezután a cDNS-t CDM8-ba ligáltuk [B. Seed, Nature, *329*, 840–342 (1987)], MC1061/P3 E.coli gazdasejtből (ATCC 47035) vittük be, és lemezre vittük úgy, hogy 5×10^5 sűrűségű telepeket kapjunk. A telepeket LB táptalajban felszuszpendáltuk, összegyűjtöttük, és plazmidot állítottunk elő standard alkalikus módszerrel [T. Maniatis és mtsai, Molecular Cloning: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1982)]. Tíz darab 10 cm-es, COS sejteket (ATCC CRL 1650 ATCC CRL 1651) tartalmazó lemezt 50%-os arányban transzfektáltunk a plazmid cDNS génkönyvtár 10 μg/lemez mennyiségével DEAE-dextránt alkalmazva [R.E. Kingston, Current Protocols in Molecular Biology, 9.0.1–9.9.6, Greene Publishing

Associates (1987)]. Az ICAM-2 tripszin-rezisztens az endotéliális és az SKW-3 sejteken. A COS-sejteket három napos utótranszfektálás után felszuszpendáltuk 0,025% tripszin, 1 mM EDTA, HBSS (Gibco) tartalmú eleggyel, és megkötöttük LFA-1-el bevont lemezeken [B. Seed és mtsai, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *84*, 3365–3369, (1987)], amint azt az alábbiakban leírjuk az ^{51}Cr-rel jelzett COS-sejtek esetében. A megtapadó sejteket úgy szabadítottuk fel, hogy 10 mM koncentrációig EDTA-t adtunk hozzá.

A plazmidot a megtapadt COS-sejt populációból nyertük ki Hirt szupernatasokban [B.J. Hirt, J. Mol Biol., *26*, 365–369 (1967)]. Ezután az MC1061/P3 E. coli törzset a plazmiddal transzformáltuk, a lemezeken lévő telepeket LB táptalajba felszuszpendáltuk, összegyűjtöttük, és alkalikus litikus módszerrel előállítottuk a plazmidot, Az LFA-1-hez tapadó transzfektált COS sejtek kiválasztását és a plazmid kinyerését még két ciklusban megismételtük. Az összegyűjtött telepeket, amelyeket a harmadik ciklus után nyertünk, telítettségig tenyésztettük 100 ml LB táptalajban, amely 18 μg/ml tetraciklint és 20 μg/ml ampicillint tartalmazott. A plazmidot kinyertük, és 1%-os LMP agaróz gél elektroforézissel frakcionáltuk, és az MC1061/P3-at kilenc különböző, méretű frakcióból származó plazmiddal külön transzformáltuk. A COS-sejteknek az LFA-1-hez való adhéziójának az elősegítésében a legaktívabb frakcióból nyert egyedi plazmidok XbaI-es emésztésével meghatároztuk az azokban lévő inszertum méretét és COS-sejtek adherancia tesztnek vetettük alá. Ennek eredményeképpen egy olyan plazmidot kaptunk, amely egy 1,1 kb méretű ICAM-2 cDNS inszertumot tartalmazott, ez a pCDIC2.27 plazmid.

Az adhéziós vizsgálatok elvégzéséhez, a pCDIC2.27 ICAM-2 plazmidot vagy egy CDM8-ban lévő 1,8 kb méretű SalI, KpnI fragmentumot tartalmazó ICAM-1 szerkezetet [D.E. Staunton és mtsai, Cell, *52*, 925–933 (1988) (2 μg/10 cm lemez) DEAE-dextrán segítségével COS sejtekbe vittük be. A COS sejteket a transzfekció után három nappal a következő oldattal szuszpentáltuk fel: 0,025% tripszin, 1 nM EDTA, HBSS oldat, és ^{51}Cr-el jeleztük. Közelítőleg 2×10^5Cr-el jelzett COS sejtet, amely a következő puffer oldatban volt: 2 ml PBS, 5% FCS, 2 mM magnézium-klorid 0,025 % azid, inkubáltuk 5 μg/ml alább említett MAb-val LFA-1-et befedett 6 cm-es lemezeken 25 °C-on 1 órán át. A meg nem tapadt sejteket enyhe rázogatással eltávolítottuk, és a lemezt háromszor mostuk a puferrel. A megtapadó sejtekket 10 mM koncentrációig EDTA-t adva eluáltuk, és elvégeztük a γ-számlálást.

Ennek az eljárásnak a keresztülvihetőségét előzőleg klónozott ICAM-1 cDNS-el transzfektált COS-sejtekkel bizonyítottuk (1A. ábra). A transzfektált COS-sejtek 25%-a kifejezett ICAM-1-et. Megkötés után a meg nem tapadó sejteket ICAM-1$^+$ sejtekkel kimerítettük, míg a megtapadó sejteket EDTA-val távolítottuk el az LFA-1-el bevont műanyagról. Ez utóbbiak majdnem mindegyike ICAM-1$^+$ volt. Az ICAM-1$^+$ sejteknek az LFA-1-el bevont műanyaghoz való tapadását RR1/1 ICAM-1 MAb-val meggátoltuk. A Petri-csészéhez kötött LFA-1 a COS-sejt megkötés és EDTA-val történt elúció 5 ciklusán keresztül stabil volt. A használatok között a lemezeket Mg^+ jelenlétében 4 °C-on tároltuk.

Az ICAM-2 klónozása céljából egy cDNS génkönyvtárat hoztunk létre a CDM8 plazmid vektorban, amelyet endotéliális sejtekből állítottunk elő. Ez bizonyította, hogy az LFA-1-től függő adhézió ICAM-1 függő és ICAM-1 független komponensekből áll [M.L. Dustin, és mtsai, J. Cell. Biol., *107*, 321–331 (1988)]. A transzfektált COS-sejteket LFA-1-el bevont Petri-csészékben inkubáltuk ICAM-1 MAb-vel, hogy megelőzzük az ICAM-1 cDNS-ek izolálását. A megtapadó sejteket, EDTA-val kimostuk és a plazmidokat izoláltuk és E. coliben szaporítottuk azokat. Három ciklus transzfekció, megtapadás és plazmid izoláció és egy méret szerinti frakcionálás után 30 plazmidot analizáltunk restrukciós endonukleázos emésztéssel. Három, 1,0 kb-nál nagyobb inszertummal rendelkező plazmid közül egyet transzfekcióval COS-sejtekbe vittünk be, amely az LFA-1-hez tapadt.

Az izolált plazmid hatására a transzfektált sejtek nagy százalékában LFA-1-hez kötődőek lettek, hasonló mértékben, mint az ICAM-1 transzfekció esetében (1B. ábra). A megtapadást LFA-1 MAb-vel blokkoltuk, de ellentétben az ICAM-1-el transzfektált sejtekkel, az ICAM-1 MAb nem blokkolt (18. ábra). Továbbá az ezzel a plazmiddal transzfektált sejtek nem reagáltak négy ICAM-1 MAb paneljával. Így, egy második LFA-1 ligandumot kódoló cDNS-hez szükséges minden követelmény megvolt és a ligandumot ICAM-2-nek neveztük el.

2. példa

Az ICAM-2 szekvencia jellemzése.

A 1052 bp hosszúságú ICAM-2 cDNS szekvencia (2. ábra) egy 65 bp méretű 5' és egy 167 bp méretű 3' nemtranszlatált régiót tartalmaz. Az 1019-es helyen lévő egy AATACA poliadenilációs szingált, amely ellentétben az AATAAA-tól, a gerincesek mRNS-eiben közelítőleg 2%-ban fordul elő [M. Wickens és mtsai, Science, *226*, 1045–1051 (1984)] egy 1058 bp méretű poli(A) farok követ. A legnagyobb nyitott leolvasási keret a 63. helyen lévő ATG-vel kezdődik és egy TAG terminációs kodonnal fejeződik be a 885. helyen. Hidrofobicitás analízis [J. Kyte és mtsai, J. Mol. Biol, *157*, 105–132 (1982)] és a hasítási helyek körüli aminosavak segítségével [G. von Heijne, Nucleic Acids Research, *4*, 4683–4690 (1986)] előre meg lehet állapítani a 21 aminosavból álló szignál peptidet (2. ábra).

Az előre megállapított az 1. aminosavtól a 201.-ig terjedő érett szekvencia egy vélt extracellularis doment tartalmaz, amelyet egy 26 csoportból álló hidrofób feltételezett transzmembrán domen és egy 26 aminosavból álló citoplazmatikus domen követ. A vélt α-hélixes transzmembrán szegmentum négy tekeredése amfipátiás, az egyik oldalra treonin és szerin esik, amely alapján feltételezhető a saját magával való kapcsolódás vagy más membrán fehérjékkel való kapcsolódás a membrán síkjában. A citoplazmatikus domen szokatlanul bázikus, ellentétben a legtöbb citoplazmatikus doménnel,

amelyek hidrofilek, ez pedig átlagos mértékben hidrofób. Az érett polipeptid előre várt tömege 28 176 dalton, amely, ha a hat előre várt N-kötésű glikozilációs helyet figyelembe vesszük, egy közelítőleg 46 kD méretű ICAM-2 glikoproteint eredményez.

3. példa

DNS és RNS hibridizációs analízisek

Az izolált ICAM-2 cDNS klónokat Northern és Southern hibridizációval analizáltuk. A Northern lenyomathoz 6 μg poli(A)$^+$ RNS-t használtunk, amelyet denaturáltunk és 1%-os agarózformaldehid gélen elektroforetizáltunk [T. Maniatis és mtsai, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1982)], majd Nylon membránra (Zeta Proba, BioRad) vittük elektromos úton. Az átvitel teljességéről a gél UV átvilágításával és a lenyomat fluoreszcens fotográfiájával győződtünk meg.

A genomiális DNS-eket ötször emésztettük a gyártó cég által javasolt mennyiségű EcoRI és HindIII endonukleázokkal (New England Biolabs). Ezt követően egy 0,8%-os agaróz gélen elektroforetizáltuk, majd a DNS-eket átvittük egy „Zeta Probe" membránra. Az RNS és DNS lenyomatokat standard eljárás szerint prohibridizáltuk és hibridizáltuk [T. Maniatis és mtsai, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, (1982)] α-(^{32} P)dXTp-vel jelzett ICAM-2 vagy ICAM-1 cDNS-ek véletlenszerű indításával (priming) (Boehringer Mannheim).

Az 1,1 kb méretű ICAM-2 cDNS egy 1,4 kb méretű poli(A)$^+$ mRNS-sé és kis mértékben egy 3 kb méretű mRNS-sé hibridizál (3 A ábra), amelyek eltérőek az ICAM-1 3,3 kb méretű és 2,4 kb méretű mRNS-eitől (3B. ábra). Az mRNS-t olyan sejtekben vizsgáltuk, amelyekre jellemző, hogy funkcionálisan függnek az ICAM-1-től, és második ligandumként az LFA-1-hez való kötődésétől függnek. Az ICAM-1 mRNS-t erősen indukálja endotéliális sejtekben az, LPS (3 B. ábra, 2. és 3. oszlopok). Ezzel ellentétben az ICAM-2 mRNS nagy mértékben kifejeződik az endotéliális sejtekben, és nem indukálható tovább LPS-el (3 A. ábra, 2. és 3. oszlopok). Ez megfelel az LFA-1 függő, erősen bazális és nem indukálható ICAM-1-független utnak az endotéliális sejtekben és az ICAM-1-függő út indukálhatóságának [M.L. Dustin és mtsai, J. Cell, Biol., *107*, 321–331 (1988)].

Az ICAM-2 mRNS a sejtek igen különböző típusaiban jelen van, beleértve a Ramos és BBN B-limfoblasztoid, az U937 monocita és az SKW limfolasztoid sejtvonalakat (3 A ábra, 1., 4., 6, és 8. oszlopok), amint a közepes ideig vagy tartósan exponált autoradiogram is mutatja. Ezek közül az SKW U937 és BBN-ről bebizonyosodott, hogy az LFA-1$^+$ sejtekhez való tapadásuk [R. Rothlein és mtsai, J. Immunol., *137*, 1270–1274 (1986)] és az LFA-1-el bevont műanyagokhoz való tapadásuk LFA-1 függő és ICAM-1 független.

A HELA epiteliális sejtvonal, amely az LFA-1 függő adhéziónak csak az ICAM-1 függő komponensével rendelkezik [M.W. Makgoba és mtsai, Eur. J. Immunol., *18*, 637–640 (1988)] nem mutat ICAM-2 mRNS-t (3A. ábra, 5. oszlop), még tartósan exponált autoradiogram után sem. Az ICAM-2 sejt megoszlása így egybeesik az ICAM-1 független LFA-1 függő adhéziós komponensével.

Az ICAM-2 cDNS-ei hibridizált genomiális DNS (3D. ábra) Southern lenyomat analízise egyetlen predomináns, 8,2 kb méretű EcoRI fragmentumot és 14 kb méretű HindIII fragmentumot mutatott ki, így feltételezhető, hogy egyetlen gén van jelen egy 8 kb méretű részben, amely a legtöbb kódoló információt hordozza.

4. példa

Az ICAM-1 és az ICAM-2 aminosavszekvenciáinak az összehasonlítása

Összehasonlítottuk az ICAM-2 és az ICAM-1 aminosavszekvenciáit, minthogy ezek LFA-1 ligandumként funkcionálisan hasonlóak. Az ICAM-1 tagja az Ig főcsaládnak, és extracelluláris doménje teljes egészében öt C-szerű doménből áll. Az ICAM-2 extracelluláris doménjének 201 aminosavat két Ig C-szerű doménből áll, amely feltételezett intradomén diszulfidhiddal összekötött ciszteinjének a távolsága 43 és 56 csoport távolságra van, és előre várt β-szálas szerkezetű (4. ábra). Figyelemreméltó, hogy az ICAM-2 két Ig-szerű doménje 34%-ban azonos aminosav-szekvenciájú az ICAM-1 két N-terminális doménjével (4. ábra) a középérték felett 15 standard eltéréssel az ALIGN pontban, és 27%-ban azonos az ICAM-1 3-as és 4-es doménjével a középérték felett 3 standard eltéréssel az ALIGN pontban.

Az NBRF és a SWISS-PROT fehérje adatbázisokat vizsgálva csak részleges domén homológiét mutatott az Ig főcsalád tagjaival, elsősorban a HLA II osztály antigénjeivel.

Az ICAM-2 valamivel kevesebb csoportot tartalmaz az Ig doménekre jellemzők közül, mint az ICAM-1. Az ICAM-2 17%- ban azonos az ICAM adhéziós molekula két N-terminális doménjével [B.A. Cunningham és mtsai, Science, *236*, 799–806 (1987)], illetve a MAG adhéziós molekulával [J.L. Salzer és mtsai, J. Cell Biol. *104*, 957–965 (1987)], míg az ICAM-1 19%-ban, illetve 20%-ban azonos.

A limfocita funkcióval összefüggő antigén-1-et (LFA-1) és az intercelluláris adhéziós molekula-1-et (ICAM-1) úgy azonosítottuk, hogy kerestünk olyan MAb-t, amely blokkolja a T-limfocita által közvetített sejtpusztítást, illetve a homotipiás adhéziót [R. Rothlein és mtsai, J. Immunol., *137*, 1270–1274 (1986); D. Davignon és mtsai, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *78*, 4535–4539 (1981)]. Ezzel szemben az ICAM-2-t funkcionális cDNS szelekciós eljárással azonosítottuk, amely nem igényli a fehérje előzetes azonosítását biokémiai vagy immunológiai technikákkal.

Az ICAM-2 cDNS-ének az izolálása igazolta, hogy szükséges még egy másik LFA-1 liganaum létezése. Az ICAM-2 mRNS megoszlása a sejtek korlátozott számában, amely sejtekre jellemző az ICAM-1 függő és ICAM-1 független adhézió az LFA-1-hez, feltételezi, hogy az ICAM-2-t számításba lehet venni minden eddig tapasztalt, az ICAM-1-től független LFA-1 függő adhézióban.

Az ICAM-2 és az ICAM-1 két N-terminális doménje sokkal jobban hasonlít egymásra, mint az Ig főcsalád más tagjaihoz, bizonyítva, hogy az Ig-szerű molekulának van egy alcsaládja, amely kötődik az LFA-1-hez. Lényeges, hogy az 1-es és 2-es doménekig domén delécióval és szisztematikus aminosav szubsztitucióval feltérképeztük az ICAM-1-nek az LFA-1 kötő régióját. Eszerint szerkezeti és funkcionális homológia is van közöttük. Az ICAM-2 a második az Ig család tagjai között, amely kötődik egy integrinhez. Bár a sejt adhéziós receptorok között csekély az előnyük, az integrinek között az extracelluláris matrix komponensek számos receptora több ligandumot ismer fel [R.O. Hynes, Cell, *48*, 549–544 (1987); E. Ruoslathi és mtsai, Science, *238*, 491–497 (1987)].

Sem az ICAM-1, sem az ICAM-2 nem tartalmaz RGD szekvenciát, és igy az LFA-1 felismerésének a módja eltérhet az integrinekétől, amelyek extracelluláris matrix komponenseket kötnek [R.D. Hynes, Cell, *48*, 549–554 (1987); E. Rouslathi és mtsai, Science, *238*, 491–497 (1987)]. A Mac-1 és a p150,95 által felismert celluláris ligandumok, az LFA-1-el közeli rokonságban lévő leukocita integrinek ugyanahhoz az Ig alcsaládhoz tartozhatnak. Az ICAM-1-ről az utóbbi időben bebizonyosodott, hogy a rhinovírusok nagyobb csoportjának a receptora, amely vírusok a közönséges megfázás 50%-át okozzák. Az ICAM-2 szintén receptorként funkcionálhat a rhinovírusok vagy más picorhavírusok esetében. Így terápiásan felhasználható ezen vírusfertőzések visszaszorítására (azaz megelőzésére vagy gyengítésére).

Az LFA-1 ligandumok családja kihangsulyozza ennek a felismerési folyamatnak a fontosságát és azt, hogy ez a mechanizmus érzékeny specifitású és különböző funkcióju. Az ICAM-1 és az ICAM-2 közötti számos különbségnek valószínűleg jelentősége van. Az ICAM-1 legtöbb sejtben indukálható, míg az ICAM-2 expressziót az eddig vizsgált sejtekben a citokinek nem befolyásolják. Az ICAM-1 hárommal több doménjétől az várható, hogy annak LFA-1 kötő helye a sejt felszinről jobban kinyulik, mint az ICAM-2 esetében, így ez azt teszi feltételezhetővé, hogy szorosabb sejt-sejt érintkezés szükséges az LFA-1: ICAM-2 esetében, mint az LFA-1: ICAM-1 kölcsönhatásban. Az ICAM-2-vel transzfektált COS-sejtek sokkal könnyebben leválaszthatóak az LFP—1-el bevont műanyag lemezről, mint az ICAM-1-el transzfektált COS-sejtek, amivel a mosás nyíróereje is növekszik. Ez az ICAM-2 kisebb méretének tulajdonitható, amely azt kevésbé teszi hozzáférhetővé az LFA—1 számára a mesterséges szubsztráton, vagy a szekvenciák közötti különbségeknek tulajdonítható, amely az affinitások közötti különbséget okozhatja.

Az ICAM-1 és ICAM-2 különböző citoplazmatikus doménjei különböző jeleket adhatnak vagy a sejt felületén eltérő elhelyezkedésf okozhatnak; hasonló módon a jelzés vagy a citoszkeletonnal való kölcsönhatás az LFA—1 esetében eltérő lehet attól függően, hogy ICAM-1 vagy ICAM-2 kötődött-e.

Az ICAM-1 és egy második LFA-1 ellen-receptor, az ICAM-2 az immunglobulin (Ig) főcsalád egy alcsaládját alkotják [D.E. Staunton és mtsai, Cell, *52*, 925–933 (1988)], amely adatokat itt referenciaként használunk fel. Az ICAM-1 öt Ig-szerű C doménnel rendelkezik, míg az ICAM-2 kettővel, amelyek nagyrészt homológok az ICAM-1 aminoterminális doménjeivel. Az ICAM-1-et és az ICAM-2-t különböző típusú sejtek fejezik ki, amely különböző leukocita függő adhéziós funkciót enged feltételezni, igy az immunválasz reakcióban az indukviós és effektor funkciókat. Az ICAM-1 expresszió nagy mértékben indukálható citokinekkel, és így az LFA-1/ICAM-1 adhéziós rendszer képes irányítani a leukociták vándorlását és lokalizációját a gyulladás során [R.J. Rothlein, Immunol., *137*, 1270–1274 (1986); S.D. Marlin és mtsai, Cell, *51*, 813–819 (1987); T.K. Kishimoto és mtsai, Adv. Immunol. *46*, 149–182 (1989); M.L. Dustin és mtsai, Immunol. Today, *9*, 213–215 (1988), mindezeket az adatokat itt referenciaként felhasználjuk].

Az ICAM-1 csoportjai , amelyeket fent definiáltunk, fontosak az LFA-1 kötésben és más ICAM molekulában is megtalálhatóak [D. E. Staunton és mtsai., Nature, *339*. 61–64 (1989)], amely adatot itt referenciaként használunk fel. A humán ICAM-1 50%-ban azonos az egér ICAM-1-el és 35% ban azonos a humán ICAM-2-vel [D.E. Staunton és mtsai, Nature, *339*, 61–64 (1989)]. Az LFA-1 kötés szempontjából a legfontosabb csoportok, az E34 és Q73, megtalálhatóak az egér ICAM-1-ben és a humán TCAM-2-ben is. Ez összeegyeztethető azzal a ténnyel, hogy az egér ICAM-1 és a humán ICAM-2 egyaránt képes kötődni a humán LFA-1-hez. Egy D2 N-hez kapcsolt glikozilációs hely az N156 helyen szintén megtalálható az ICAM-2-ben, amely befolyásolja az LFA-1 kötést. Több a rhinovírus-14-hez való kötődéshez fontos csoport, a Q58, G46, D71, K77 és R166, nincs meg az egér ICAM-1-ben vagy a humán ICAM-2-ben [D.E. Staunton és mtsai, Cell, *56*, 849–853 (1989), amely adatokat itt referenciaként használunk fel, amely tény egybevág azzal, hogy az egérsejtek [R.J. Colonna és mtsai, J.Virol., *57*, 7–12 (1936)] és az ICAm-2 nem képesek kötődni a rhinovirus-14-hez.

Bár a találmány leirását a speciális megvalósitásokkal kapcsolatosan irtuk le, magától értetődik, hogy a találmány további módosításokat foglal magában. Ezek a módosítások a találmány bármilyen változását, használatát vagy adaptációját tartalmazhatják, azaz általánosságban a találmány alkalmazható a jelen tartalomtól való eltérésekkel együtt, amely módosítások a találmánnyal kapcsolatos szakterület ismert gyakorlatából vagy a felhasználók gyakorlatából adódnak és amelyek az előbbiekben előadott alapelveknek és a csatolt igénypontoknak megfelelnek.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás ICAM-2-t vagy egy legalább 95%-ban homológ fragmentumát vagy egy ICAM-2-vel legalább 95%-ban homológ variánst kódoló rekombináns DNS előállítására, *azzal jellemezve*, hogy ICAM-2-t kifejező sejtekből cDNS-könyvtárat hozunk létre, ezzel ICAM-2—t ki nem fejező sejteket transzformálunk, és kiszűrjük

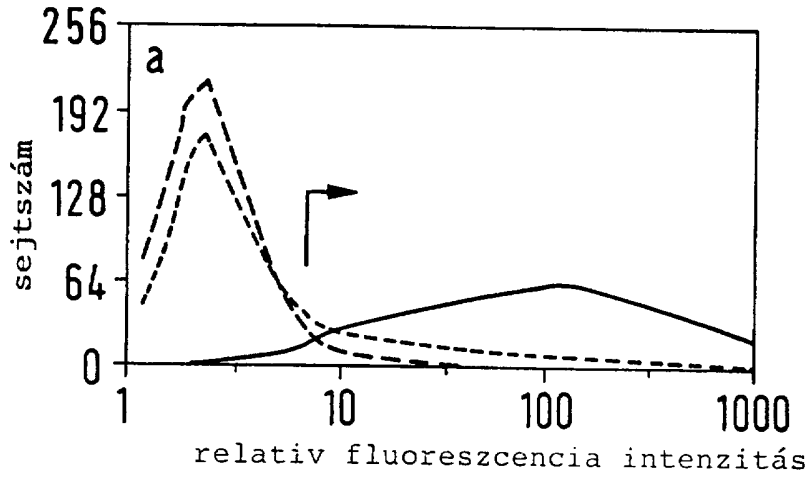
az ICAM-2-t kifejező sejteket, amelyekből a plazmidokat izoláljuk, majd ezek restrikciós enzimes emésztése után a fragmentumokat szűrjük az LFA-1-hez való tapadást eredményező inszertumokra.

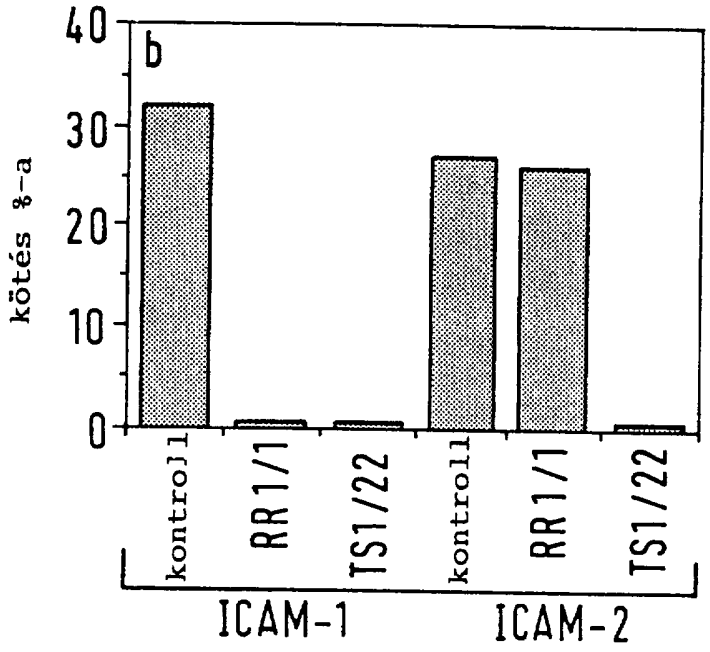
2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az ICAM-2-t vagy egy legalább 95%-ban homológ fragmentumát vagy egy az ICAM-2-vel legalább 95%-ban homológ variánst egy sejtben kifejező DNS-molekulát izolálunk.

3. Eljárás ICAM-2 vagy egy legalább 95%-ban homológ fragmentuma vagy egy az ICAM-2-vel legalább 95%-ban homológ variáns előállítására, *azzal jellemezve*, hogy egy 1. igénypont szerint előállított szekvenciát tartalmazó vektorral transzformált sejtet tenyésztünk, és a tenyészetből izoláljuk a kívánt polipeptidet.

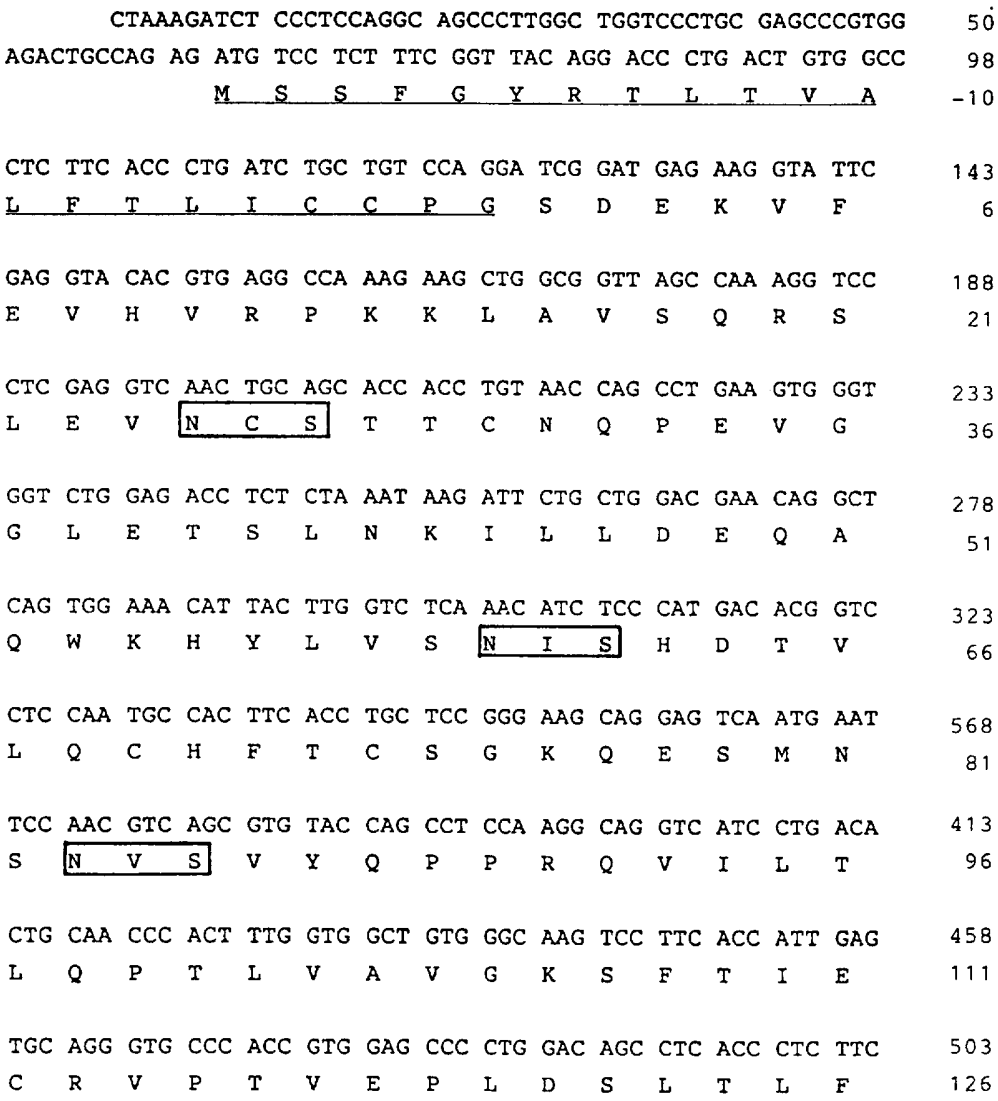
4. Eljárás ICAM-2-t vagy legalább 95%-ban homológ fragmentumát, analógját, variánsát vagy kémiai származékát kifejező sejt jelenlétének kimutatására a sejtnek vagy a sejt kivonatának egy komplementer nukleinsav molekulával való hibridizációja útján, *azzal jellemezve*, hogy a sejtet vagy az illető sejt kivonatát az ICAM-2 m-RNS-sel hibridizáló nukleinsav-molekulával szűrjük.

1. ÁBRA


256
192
128
64
0
a
sejtszám
1
10
100
1000
relativ fluoreszcencia intenzitás


40
30
20
10
0
b
kötés %-a
kontroll
RR1/1
TS1/22
kontroll
RR1/1
TS1/22
ICAM-1
ICAM-2

2. ÁBRA


CTAAAGATCT CCCTCCAGGC AGCCCTTGGC TGGTCCCTGC GAGCCCGTGG 50
AGACTGCCAG AG ATG TCC TCT TTC GGT TAC AGG ACC CTG ACT GTG GCC 98
M S S F G Y R T L T V A -10
CTC TTC ACC CTG ATC TGC TGT CCA GGA TCG GAT GAG AAG GTA TTC 143
L F T L I C C P G S D E K V F 6
GAG GTA CAC GTG AGG CCA AAG AAG CTG GCG GTT AGC CAA AGG TCC 188
E V H V R P K K L A V S Q R S 21
CTC GAG GTC AAC TGC AGC ACC ACC TGT AAC CAG CCT GAA GTG GGT 233
L E V N C S T T C N Q P E V G 36
GGT CTG GAG ACC TCT CTA AAT AAG ATT CTG CTG GAC GAA CAG GCT 278
G L E T S L N K I L L D E Q A 51
CAG TGG AAA CAT TAC TTG GTC TCA AAC ATC TCC CAT GAC ACG GTC 323
Q W K H Y L V S N I S H D T V 66
CTC CAA TGC CAC TTC ACC TGC TCC GGG AAG CAG GAG TCA ATG AAT 568
L Q C H F T C S G K Q E S M N 81
TCC AAC GTC AGC GTG TAC CAG CCT CCA AGG CAG GTC ATC CTG ACA 413
S N V S V Y Q P P R Q V I L T 96
CTG CAA CCC ACT TTG GTG GCT GTG GGC AAG TCC TTC ACC ATT GAG 458
L Q P T L V A V G K S F T I E 111
TGC AGG GTG CCC ACC GTG GAG CCC CTG GAC AGC CTC ACC CTC TTC 503
C R V P T V E P L D S L T L F 126

2. ÁBRA

2. oldal

```
CTG TTC CTG GGC AAT GAG ACT CTG CAC TAT GAG ACC TTC GGG AAG      548
L   F   R   G   N   E   T   L   H   Y   E   T   F   G   K      141

GCA GCC CCT GCT CCG CAG GAG GCC ACA GCC ACA TTC AAC AGC ACG      593
A   A   P   A   P   Q   E   A   T   A   T   F   N   S   T      156

GCT GAC AGA GAG GAT GGC CAC CGC AAC TTC TCC TGC CTG GCT GTG      238
A   D   R   E   D   G   H   R   N   F   S   C   L   A   V      171

CTG GAC TTG ATG TCT CGC GGT GGC AAC ATC TTT CAC AAA CAC TCA      683
L   D   L   M   S   R   G   G   N   I   F   H   K   H   S      186

GCC CCG AAG ATG TTG GAG ATC TAT GAG CCT GTG TCG GAC AGC CAG      728
A   P   K   M   L   E   I   Y   E   P   V   S   D   S   Q      201

ATG GTC ATC ATA GTC ACG GTG GTG TCG GTG TTG CTG TCC CTG TTC      773
M   V   I   I   V   T   V   V   S   V   L   L   S   L   F      216
                                    TM

GTG ACA TCT GTC CTG CTC TGC TTC ATC TTC GGC CAG CAC TTG CGC      818
V   T   S   V   L   L   C   F   I   F   G   Q   H   L   R      231

CAC CAG CGG ATG GGC ACC TAC GGG GTC GGA GCG GCT TGG AGG AGG      863
H   Q   R   M   G   T   Y   G   V   G   A   A   W   R   R      246

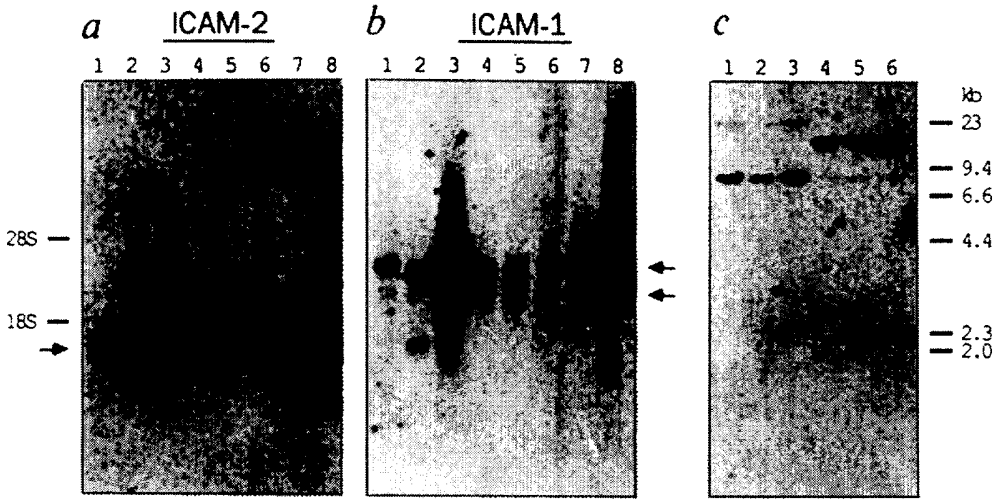
CTG CCC CAG GCC TTC CGG CCA TAG CAACCATGAG TGGCATGGCC            907
L   P   Q   A   F   R   P                                      253

CACACCACGG TGTCACTGGA ACTCAGTGTG ACTCCTCAGG GTTGAGGTCC          957

AGCCCTGGCT GAAGGACTGT GACAGGCAGC AGAGACTTGG GACATTGCCT         1007

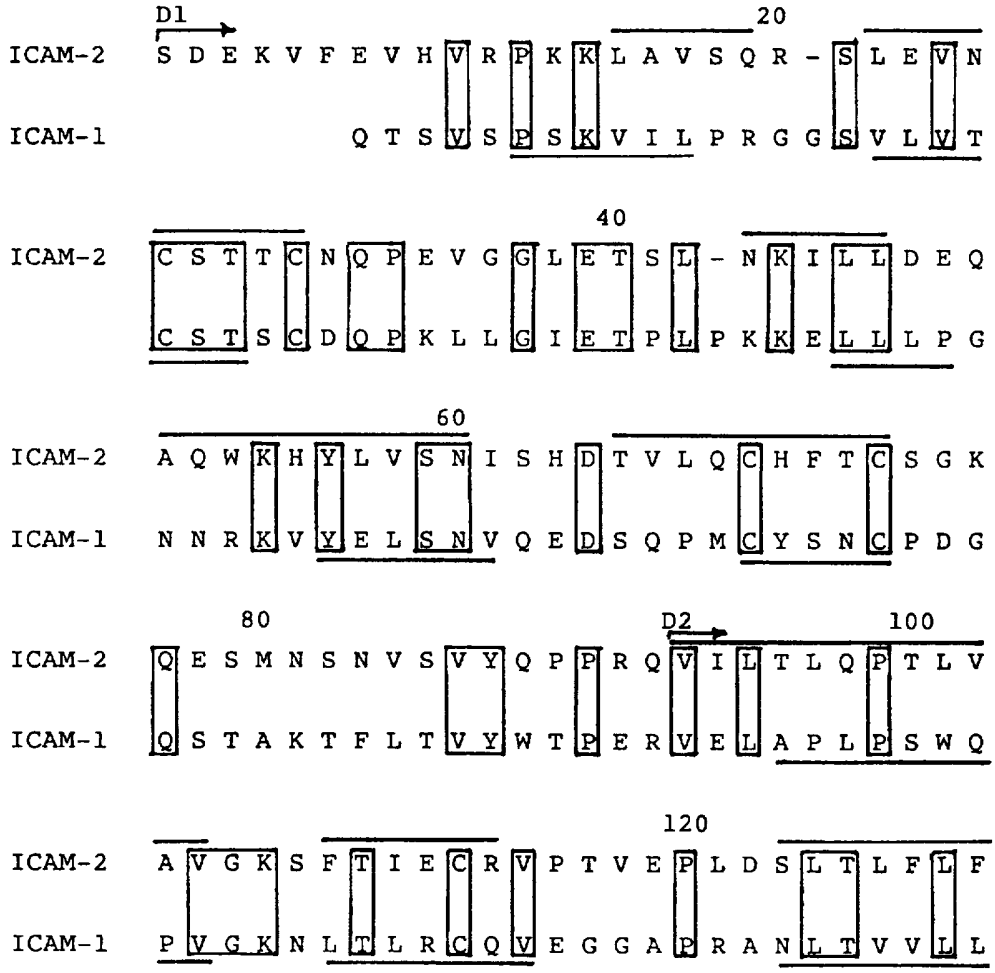
TTTCTAGCCC GAATACAAAC ACCTGGACTT AAAAAAAAAA AAAAA              1052
```

3. ÁBRA


a
ICAM-2
1 2 3 4 5 6 7 8
28S
18S
b
ICAM-1
1 2 3 4 5 6 7 8
c
1 2 3 4 5 6
kb
23
9.4
6.6
4.4
2.3
2.0

4. ÁBRA

Az ICAM-2 és az ICAM-1 amino-terminális domenjeinek az egybevetése



4. ÁBRA

2. oldal

