



HU000228477B1

(19) **HU****MAGYARORSZÁG**
Szellemi Tulajdon Nemzeti Hivatala(11) Lajstromszám: **228 477**(13) **B1**

SZABADALMI LEÍRÁS

(21) A bejelentés ügyszáma: **P 02 02449**(22) A bejelentés napja: **2000. 08. 23.**(40) A közzététel napja: **2002. 10. 28.**(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlöny és Védjegyértéktőben: **2013. 03. 28.**(51) Int. Cl.: **A61K 38/17** (2006.01)**A61K 393/95** (2006.01)**C07K 147/05** (2006.01)**C07K 16/28** (2006.01)**C12N 15/12** (2006.01)**G01N 33/50** (2006.01)

(86) A nemzetközi (PCT) bejelentési szám:

PCT/US 00/23347

(87) A nemzetközi közzétételi szám:

WO 0114557

(30) Elsőbbségi adatok:

60/150,390 1999. 08. 23. **US****60/164,897** 1999. 11. 10. **US**

(72) Feltalálók(k):

Wood, Clive, Boston, Massachusetts (US)**Freeman, Gordon J., Brookline, Massachusetts (US)**

(73) Jogosult(ak):

Dana-Farber Cancer Institute, Inc., Boston,
Massachusetts (US)**Genetics Institute, LLC, Cambridge,**
Massachusetts (US)

(74) Képviselő:

DANUBIA Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.,
Budapest

(54)

PD-1, a B7-4 receptora, és alkalmazásai

(57) Kivonat

A találmány a PD-1-et mint B7-4 receptorát azonosítja. A B7-4 képes az immunsejt-aktiválást gátolni az immunsejt felszínén lévő gátló receptorhoz való kötődés hatására. Ennek megfelelően a találmány tárgyát képezik szerek PD-1, B7-4 és a B7-4 és PD-1 közötti kölcsönhatás modulálására, annak érdekében, hogy kostimuláns vagy gátló jelet moduláljunk immunsejtben, az immunválasz modulálását eredményezve.

PC 202449

MEGA
SOLC

3.3.3.3

PD-1, a B7-4 receptora, és alkalmazásai

A leírásban feltárt munkát a „National Institute of Health” AI 39671, AI 44690, CA 84500 és AI 41584 számú pályázatainak támogatásával végeztük. AZ Amerikai Egyesült Államok kormányának tehát vannak bizonyos jogai a találmánnyal kapcsolatban.

A bejelentés az U.S.S.N 60/150 390. számú, 1999. augusztus 23-án bejelentett amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentés elsőbbségét igényli. A bejelentés igényli az U.S.S.N 60/164 897. számú, 1999. november 10-én bejelentett amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentés elsőbbségét is. Mindkét bejelentés hivatkozás útján teljes egészében a kitanítás részét képezi.

Annak érdekében, hogy a T-sejtek idegen fehérjékre reagáljanak, az antigénprezentáló sejteknek (APC) két jelet kell adniuk a nyugvó T-sejtek számára [Jenkins, M. és Schwatz, R., J. Exp. Med. 165, 302-319. old. (1987); Mueller, D.L. és mtsai., J. Immunol. 144, 3701-3709. old. (1990)]. Az első jel, amely az immunválasz specifitását okozza, a T-sejt-receptoron (TCR) keresztül továbbítódik a fő hisztokompatibilitási komplexhez (MHC) kapcsolódó idegen antigénhatású peptid felismerését követően. A második jel, amit kostimulációnak neveznek, indukálja a T-sejtek proliferációját és működőképessé válását [Lenschow és mtsai., Annu. Rev. Immunol. 14, 23. old. (1996)]. A kostimuláció se nem antigénspecifikus, se nem korlátozódik az MHC-re, és azt gondolják, hogy az APC-k által expresszált egy vagy több különálló sejtfelszíni molekula biztosítja [Jenkins, M.K. és mtsai., J. Immunol. 140, 3324-3330. old. (1988); Linsley, P.S. és mtsai., J. Exp. Med. 173, 721-730. old. (1991); Gimmi, C.D. és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 6575-6579. old. (1991); Young, J.W. és mtsai., J. Clin. Invest. 90, 229-237. old. (1992); Koulova, L. és mtsai., J. Exp. Med. 173, 759-762. old. (1991); Reiser, H. és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 271-275. old. (1992); van-Seventer, G.A., és mtsai., J. Immunol. 144, 4579-4586. old. (1990); LaSalle, J.M. és mtsai., J. Immunol. 147, 774-780. old. (1991); Dustin, M.I. és mtsai., J. Exp. Med. 169, 503. old. (1989); Armitage, R.J. és mtsai., Nature 357, 80-82. old. (1992); Liu, Y. és mtsai., J. Exp. Med. 175, 437-445. old. (1992)].

Az APC-n expresszált CD80 (B7-1) és CD86 (B7-2) fehérjék kritikus kostimuláns molekulák [Freeman, J. és mtsai., J. Exp. Med. 174, 625. old. (1991); Freeman és mtsai., J. Immunol. 143, 2714. old. (1989); Azuma, és mtsai., Nature 366, 76. old. (1993); Freeman és mtsai., Science 262, 909. old. (1993)]. Úgy látszik, hogy a B7-2 uralkodó szerepet játszik az elsődleges immunválaszok során, míg a B7-1, amely később serkentő jellegűen („upregulate”) szabályozott az immunválasz során, fontos lehet az elsődleges T-sejtes válaszok meghosszabbításában vagy másodlagos T-sejtes válaszokban [Bluestone és mtsai., Immunity 2, 555. old. (1995)].

Egy receptor, amelyhez a B7-1 és B7-2 kötődik, a CD28, konstitutívan expresszálódik a nyugvó T-sejteken, és az expressziója növekszik aktiválás után. A T-sejt-receptoron keresztül történő jeltovábbítás után a CD28 ligációja és kostimuláns jel továbbítása indukálja a T-sejtek proliferációját és IL-2 szekrécióját [Linsley, P.S. és mtsai., J. Exp. Med. 173, 721-730. old. (1991); Gimmi, C.D. és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 6575-6579. old. (1991); June, C.H. és mtsai., Immunol. Today 11, 211-216. old. (1990); Harding, F.A. és mtsai., Nature 356, 607-609. old. (1992)]. Egy második receptor, amit CTLA4-nek (CD152) neveznek, homológ a CD28-cal, de nem expresszálódik a nyugvó T-sejteken, és T-sejt aktiválás után jelenik meg [Brunet, J.F. és mtsai., Nature 328, 267-270. old. (1987)]. A CTLA4 kritikusnak látszik a T-sejtes válaszok negatív szabályozásában [Waterhouse és mtsai., Science 270, 985. old. (1995)]. A CTLA4 gátlásáról azt találták, hogy eltávolítja a

gátló jeleket, míg a CTLA4 aggregációjáról azt találták, hogy T-sejtes válaszokat gátló jellegűen („downregulate”) szabályozó gátló jelet biztosít [Allison és Krummel, *Science* 270, 932. old. (1995)]. A B7-molekulának magasabb affinitása van a CTLA4 iránt, mint a CD28 iránt [Linsley, P.S. és mtsai., *J. Exp. Med.* 174, 561-569. old. (1991)], és a B7-1-ről és a B7-2-ről azt találták, hogy a CTLA4-molekula különböző régióihoz kötődnek, és eltérő kinetikájuk van a CTLA4-hez való kötődésben [Linsley és mtsai., *Immunity* 1, 793. old. (1994)]. Azonosítottak egy, a CD28-cal és CTLA4-gyel rokon új molekulát, az ICOS-t, és az fontosnak látszik az IL-10 termelésében [Hutloff és mtsai., *Nature* 397, 263. old. (1999); WO 98/38216. számú nemzetközi közlési irat], mint ahogy a liganduma is, amely a B7-család egy új tagja [Aicher, A. és mtsai., *J. Immunol.* 164, 4689-4696. old. (2000); Mages, H.W. és mtsai., *Eur. J. Immunol.* 30, 1040-1047. old. (2000); Brodie, D. és mtsai., *Curr. Biol.* 10, 333-336. old. (2000); Ling, V. és mtsai., *J. Immunol.* 164, 1653-1657. old. (2000); Yoshinaga, S.K. és mtsai., *Nature* 402, 827-832. old. (1999)]. Ha T-sejteket csak a T-sejt-receptoron keresztül stimulálnak, további kostimuláns jel nélkül, azok érzéketlenné, anergiássá válnak vagy elpusztulnak, az immunválasz lefelé történő modulálását eredményezve.

A B7:CD28/CTLA4 kostimuláns útvonal fontosságát demonstrálták *in vitro*, és számos *in vivo* modellrendszerben. Ezen kostimuláns útvonal gátlása antigénspecifikus tolerancia kialakulását eredményezi egér és humán rendszerekben [Harding, F.A. és mtsai., *Nature* 356, 607-609. old. (1992); Lenschow, D.J. és mtsai., *Science* 257, 789-792. old. (1992); Turka, L.A. és mtsai., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 11102-11105. old. (1992); Gimmi, C.D. és mtsai., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 6586-6590. old. (1993); Boussiotis, V. és mtsai., *J. Exp. Med.* 178, 1753-1763. old. (1993)]. Ezzel ellentétben, a B7 expressziója B7-negatív egér daganatsejtek által T-sejt-közvetített specifikus immunitást indukál, amely daganat kilökődésével és daganatos kihívás elleni hosszan tartó védelemmel jár [Chen, L. és mtsai., *Cell* 71, 1093-1102. old. (1992); Townsend, S.E. és Allison, J.P., *Science* 259, 368-370. old. (1993); Baskar, S. és mtsai., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 5687-5690. old. (1993)]. Tehát a kostimuláns útvonal manipulálása nagyszerű lehetőséget biztosít immunválasz stimulálására vagy szuppressziójára emberben.

A találmány, legalábbis részben, azon a felismerésen alapul, hogy PD-1 az antigénprezentáló sejteken expresszált B7-4-molekulák receptora. A PD-1 negatív jelet továbbít immunsejtekhez, a CTLA4-hez hasonlóan. A B7-4-molekulák az antigénprezentáló sejtek felszínén expresszálódnak, és kostimuláns jelet biztosítanak immunsejtek számára, és lefelé moduláló jelet képesek továbbítani az immunsejtek számára, attól a molekulától függően, amelyhez kötődnek. Ezáltal a PD-1, B7-4 és/vagy a B7-4 és PD-1 közötti kölcsönhatás modulációja az immunválasz modulációját eredményezi.

Ennek megfelelően egy megvalósítási mód szerint a találmány tárgya eljárás immunválasz modulálására, amely szerint immunsejtet érintkezésbe hozunk olyan szerrel, amely modulálja a PD-1 útján történő jeltovábbítást, és ezáltal moduláljuk az immunválaszt.

Egy megvalósítási mód szerint az immunválaszt gátló jellegűen szabályozzuk.

Egy másik megvalósítási mód szerint a PD-1 útján történő jeltovábbítást az alábbi szerek bármelyikével stimuláljuk: PD-1-et felismerő aktiváló ellenanyag, B7-4 gátló receptorhoz kötődő formája, vagy PD-1-hez kötődő kismolekula.

Egy megvalósítási mód szerint az immunsejt az alábbiak bármelyike: T-sejt, B-sejt vagy mieloid sejt.

Egy megvalósítási mód szerint anergiát indukálunk az immunsejtben.



Egy megvalósítási mód szerint az eljárás szerint az immunsejtet olyan további szerrel is érintkezésbe hozzuk, amely gátló jellegűen szabályozza az immunválaszt.

Egy megvalósítási mód szerint az immunválaszt serkentő jellegűen szabályozzuk.

Egy megvalósítási mód szerint a PD-1-en keresztül történő jeltovábbítást az alábbi szerek bármelyikével gátoljuk: PD-1-et felismerő gátló ellenanyag, B7-4 nem aktiváló formája, B7-4-et felismerő ellenanyag, vagy PD-1 oldható formája.

Egy megvalósítási mód szerint az érintkezésbe hozást *in vivo* végezzük. Egy másik megvalósítási mód szerint az érintkezésbe hozást *in vitro* végezzük.

Egy másik megvalósítási mód szerint a találmány tárgya eljárás B7-4 kölcsönhatásának modulálására immunsejten lévő gátló receptorral, amely szerint B7-4-et expresszáló antigénprezentáló sejtet érintkezésbe hozunk az alábbi szerek bármelyikével: B7-4 egy formája, PD-1 egy formája, vagy olyan szer, amely modulálja a B7-4 és PD-1 kölcsönhatását oly módon, hogy a B7-4 kölcsönhatása immunsejten lévő gátló receptorral modulálódik.

Egy megvalósítási mód szerint az eljárás szerint az immunsejtet vagy antigénprezentáló sejtet érintkezésbe hozzuk olyan szerrel is, amely modulálja az immunválaszt.

Egy megvalósítási mód szerint az érintkezésbe hozást *in vivo* végezzük. Egy másik megvalósítási mód szerint az érintkezésbe hozást *in vitro* végezzük.

Egy megvalósítási mód szerint az immunsejt az alábbiak bármelyike: T-sejt, B-sejt vagy mieloid sejt.

Egy másik megvalósítási mód szerint a találmány tárgya eljárás immunsejt aktiválásának gátlására nem apoptotikus mechanizmuson keresztül, amely szerint növeljük PD-1 aktivitását vagy expresszióját immunsejtben, ily módon az immunsejt aktiválását gátoljuk.

Egy másik megvalósítási mód szerint a találmány tárgya oltóanyag, amely antigént és immunsejtben PD-1-en keresztül történő jeltovábbítást gátló szert tartalmaz.

Egy másik megvalósítási mód szerint a találmány tárgya készítmény, amely antigént és immunsejtben PD-1-en keresztül történő jeltovábbítást elősegítő szert tartalmaz.

Egy másik megvalósítási mód szerint a találmány tárgya eljárás olyan állapotban lévő alany kezelésére, amelyre jó hatással lenne immunválasz serkentő jellegű szabályozása, amely eljárás szerint az alany immunsejtjében PD-1-en keresztül történő jeltovábbítást gátló szert adunk be, ily módon olyan állapotot kezelünk, amelyre jó hatással lenne immunválasz serkentő jellegű szabályozása.

Egy megvalósítási mód szerint a szer PD-1 vagy B7-4 oldható formáját tartalmazza.

Egy megvalósítási mód szerint az eljárás szerint egy második szert is beadunk, amely serkentő jellegűen szabályozza az alany immunválaszt.

Egy megvalósítási mód szerint az állapot az alábbiak bármelyike: daganat, idegrendszeri betegség vagy immunszuppresszív betegség.

Egy másik megvalósítási mód szerint a találmány tárgya eljárás olyan állapotban lévő alany kezelésére, amelyre jó hatással lenne immunválasz gátló jellegű szabályozása, amely eljárás szerint az alany immunsejtjében PD-1-en keresztül történő jeltovábbítást stimuláló szert adunk be, ily módon olyan állapotot kezelünk, amelyre jó hatással lenne immunválasz gátló jellegű szabályozása.

Egy megvalósítási mód szerint a szer az alábbiak bármelyike: PD-1-en keresztül történő jeltovábbítást stimuláló ellenanyag, bispecifikus ellenanyag, vagy oldható B7-4.

Egy megvalósítási mód szerint az eljárás szerint egy második szert is beadunk, amely gátló jellegűen szabályozza az alany immunválasztát.

Egy megvalósítási mód szerint az állapot az alábbiak bármelyike: transzplantáció, allergia vagy auto-immun betegség.

Egy másik megvalósítási mód szerint a találmány tárgya sejtalapú vizsgálati eljárás B7-4 vagy PD-1 aktivitását moduláló vegyületek szkrínelésére, amely szerint B7-4 célmolekulát vagy PD-1 célmolekulát expresszáló sejtet érintkezésbe hozunk tesztvegyülettel, és meghatározzuk a tesztvegyület képességét B7-4 vagy PD-1 célmolekula aktivitásának modulálására.

Egy másik megvalósítási mód szerint a találmány tárgya sejtmentes vizsgálati eljárás B7-4 vagy PD-1 célmolekulához való kötődését moduláló vegyületek szkrínelésére, amely szerint B7-4 vagy PD-1 fehérjét vagy annak biológiailag aktív részletét érintkezésbe hozunk tesztvegyülettel, és meghatározzuk a tesztvegyület képességét a B7-4 vagy PD-1 fehérjéhez vagy annak biológiailag aktív részletéhez való kötődésre.

Az alábbiakban röviden ismertetjük a leíráshoz tartozó ábrákat:

Az 1. ábrán humán szekretált B7-4, B7-4S nukleotidszekvenciáját (1. azonosítószámú szekvencia) mutatjuk be.

A 2. ábrán humán szekretált B7-4, B7-4M nukleotidszekvenciáját (3. azonosítószámú szekvencia) mutatjuk be.

A 3. ábrán a humán B7-4S aminosav-szekvenciáját (2. azonosítószámú szekvencia) mutatjuk be, és illusztráljuk a szignál, IgV, IgC és hidrofób farok doméneket.

A 4. ábrán a humán B7-4M aminosav-szekvenciáját (4. azonosítószámú szekvencia) mutatjuk be, és illusztráljuk a szignál, IgV, IgC és transzmembrán és citoplazmatikus doméneket.

Az 5. ábrán egér B7-4 nukleotidszekvenciáját (22. azonosítószámú szekvencia) mutatjuk be.

A 6. ábrán egér B7-4 aminosav-szekvenciáját (23. azonosítószámú szekvencia) mutatjuk be.

A 7. ábrán a humán és egér B7-4 aminosav-szekvencia egymás alá rendezését mutatjuk be.

A 8. ábrán CD28Ig, CTLA4-Ig és kontroll Ig B7-4M-mel transzfektált COS-sejtek általi kötése FACS-elemzésének az eredményét mutatjuk be.

A 9. ábrán IgG és egér ICOS-his fúziós fehérje B7-4M-mel transzfektált COS-sejtek általi kötése FACS-elemzésének az eredményét mutatjuk be.

A 10. ábrán IgM, BB1 és 133 ellenanyagok B7-4M-mel transzfektált COS-sejtek általi kötése FACS-elemzésének az eredményét mutatjuk be.

A 11. ábrán azt mutatjuk be, hogy a B7-4M (292)-vel transzfektált COS-sejtek képesek T-sejtek proliferációjának kostimulálására.

A 12. ábrán azt mutatjuk be, hogy B7-4M (292)-vel transzfektált COS-sejtek képesek T-sejtek proliferációjának kostimulálására.

A 13. ábrán a PD-1-nek B7-4M-mel transzfektált COS-sejtek általi kötését mutatjuk be.

A 14. ábrán azt mutatjuk be, hogy hozzáadott PD-1 képes, és Flt4 nem képes versengeni PD-1-gyel B7-4M-mel transzfektált COS-sejtek általi kötésével.

A 15. ábrán a PD-1 azon képességét mutatjuk be, hogy képes B7-4M-mel transzfektált CHO-sejtekhez kötődni, áramlási citometriával meghatározva.

A 16. ábrán a PD-1 azon képességét mutatjuk be, hogy képes B7-4M-mel transzfektált CHO-sejtekhez kötődni, BIAcore-elemzéssel meghatározva.

A 17. ábrán a B7-4 azon képességét mutatjuk be, hogy képes negatív jelet átírni T-sejtekhez.

A 18. ábrán T-sejtek proliferációjának és citokintermelésének gátlását mutatjuk be B7-4 jelenlétében stimulált humán T-sejtekben.

A 19. ábrán azt mutatjuk be, hogy T-sejt-receptor/B7-4 aktiválás CD28-kostimulálás jelenlétében T-sejt-proliferáció gátlásai eredményezi.

A 20. ábrán PD-1 kötődését mutatjuk be B7-4-et expresszáló CHO-sejtekhez.

A 21. ábrán B7-4 működését mutatjuk be CD28-jel gátlásában.

A 22. ábrán citokintermelés gátlását mutatjuk be PD-1:B7-4 útvonal által, citokin ELISA-val mérve.

A 23. ábrán citokintermelés gátlását mutatjuk be PD-1:B7-4 útvonal által, citokin mRNS-szintek mérésével.

A 24. ábrán azt mutatjuk be, hogy PD-1:B7-4 útvonal mechanizmusa a sejtciklus megállítása.

A 25. ábrán B7-4 elleni ellenanyagok képességét mutatjuk be B7-4 és PD-1 közötti kölcsönhatás gátlására.

A 26. ábrán PD-1 elleni ellenanyagok képességét mutatjuk be B7-4 és PD-1 közötti kölcsönhatás gátlására.

A 27. ábrán oldható B7-4Fc képességét mutatjuk be betegség súlyosbítására kísérletes autoimmun encefalomyelitis egérmodelljében.

A korábban jellemzett B-limfocita-aktiváló antigének, például B7-1 és B7-2, mellett vannak más antigének is az antigénprezentáló sejtek felszínén, amelyek modulálják immunsejtek kostimulálását. Például izoláltak B7-4 polipeptideket keratinocita és placenta cDNS-klóntárakból. Mi azt találtuk, hogy a B7-4 továbbá T-sejteket kostimulál vagy gátol. A találmány a PD-1-et mint B7-4 receptorát azonosítja.

Az immunsejteknek vannak olyan receptoraik, amelyek aktiváló jeleket továbbítanak. Például a T-sejteknek T-sejt-receptoraik vannak és a CD3-komplex, B-sejteknek B-sejt-receptoraik vannak, és a mieloid sejteknek Fc-receptoraik vannak. Ezenfelül az immunsejtek olyan receptorokat hordoznak, amelyek olyan jeleket továbbítanak, amelyek kostimuláns jelet biztosítanak, vagy olyan receptoraik vannak, amelyek olyan jeleket továbbítanak, amelyek gátolják a receptor-közvetített jelátvitelt. Például CD28 kostimuláns jelet továbbít T-sejtek számára. A T-sejt-receptor kötése után a CD28 kötése kostimuláns jelet eredményez, amelyet például az IL-2R α , IL-2R β és IL-2R γ receptorok serkentő jellegű szabályozása, IL-2 hívó RNS megnövekedett átírása, citokingének (köztük IL-2, IFN- γ , GM-CSF és TNF- α) megnövekedett expressziója jellemez. Kostimuláns jel továbbítása lehetővé teszi a sejtek sejtcikluson keresztül való előrehaladását, és ezáltal növeli a T-sejtek proliferációját [Greenfield és mtsai., Crit. Rev. Immunol. 18, 389. old. (1998)]. A T-sejt felszínén kostimuláns jelet a sejtből továbbító receptor kötése (például citokinszekrécióhoz és/vagy T-sejt proliferációjához vezető kostimuláns receptor kötése) B7-családba tartozó molekula által, mint például B7-4 által, kostimulációt eredményez. Ezáltal B7-családba tartozó molekula, mint például B7-4 és a sejtből kostimuláns jelet továbbító receptor közötti kölcsönhatás gátlása az immunválasz lefelé történő modulációját és/vagy immunsejt-anergiának nevezett

specifikus érzéketlenséget eredményez. Ezen kölcsönhatás gátlását elérhetjük például anti-CD28 Fab-fragmensek, B7-1 elleni ellenanyagok, B7-2 elleni ellenanyagok és/vagy B7-4 elleni ellenanyagok alkalmazásával, vagy olyan receptor oldható formájának alkalmazásával, amelyhez B7-családba tartozó molekula kötődni képes kompetitív inhibitorként (például CTLA4Ig).

Kostimuláns molekulákhoz kötődő gátló receptorokat is azonosítottak immunsejteken. CTLA4 aktiválása például negatív jelet továbbít T-sejtekbe. CTLA4 kapcsolódása gátolja az IL-2-termelést és sejtciklus leállítását indukálhatja [Krummel és Allison, *J. Exp. Med.* 183, 2533. old. (1996)]. Ezenfelül CTLA4-et nem tartalmazó egerekben limfoproliferatív betegséget alakul ki [Tivol és mtsai., *Immunity* 3, 541. old. (1995); Waterhouse és mtsai., *Science* 270, 985. old. (1995)]. CTLA4 gátlása ellenanyagokkal megszüntetheti a gátló jelet, míg CTLA4 aggregációja ellenanyagokkal gátló jelet továbbíthat. Tehát attól a receptortól függően, amelyhez kostimuláns molekula kötődik (azaz kostimuláns receptor, mint például CD28, vagy gátló receptor, mint például CTLA4), bizonyos B7-molekulák elősegíthetik T-sejtek kostimulációját vagy gátlását.

PD-1 a molekulák immunoglobulin családjának a tagja [Ishida és mtsai., *EMBO J.* 11, 3887. old. (1992); Shinohara és mtsai., *Genomics* 23, 704. old. (1994)]. A PD-1-et korábban kivonásos klónozáson alapuló megközelítés alkalmazásával azonosították, amelyet programozott sejthalál modulátorainak azonosítására terveztek [Ishida és mtsai., *EMBO J.* 11, 3887-3895. old. (1992); Woronicz és mtsai., *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 200, 137. old. (1995)]. A PD-1-ről azt tartják, hogy szerepet játszik a limfociták túlélésében, például klonális szelekció során [Honjo, *Science* 258, 591. old. (1992); Agata és mtsai., *Int. Immunology* 8, 765. old. (1996); Nishimura és mtsai., *Int. Immunology* 8, 773. old. (1996)]. A PD-1-et B-sejtes válaszok szabályozójának is feltételezték [Nishimura, *Int. Immunology* 10, 1563. old. (1998)]. Ellentétben a CTLA4-gyel, amely csak T-sejteken található meg, PD-1 megtalálható B-sejteken és mieloid sejteken is.

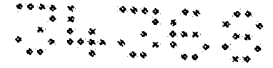
A jelen felismerés, hogy PD-1 B7-4-hez kötődik, a PD-1-et a gátló receptorok családjába helyezi a CTLA4-gyel. Míg kostimuláns receptorok kötése kostimuláns jelet eredményez immunsejten, gátló receptor kötése, például CTLA4 vagy PD-1 kötése (például keresztkötés vagy aggregáció útján) gátló jel továbbításához vezet immunsejten, immunválasz gátló jellegű szabályozását és/vagy immunsejt-anergiát eredményez. Míg gátló jel átvitele immunsejt válaszainak gátló jellegű szabályozásához vezet (és a teljes immunválasz ebből eredő gátló jellegű szabályozásához), gátló jel megakadályozása (például PD-1 elleni nem aktiváló ellenanyag alkalmazásával) immunsejtekben immunsejt válaszok serkentő jellegű szabályozásához vezet (és az immunválasz ebből eredő serkentő jellegű szabályozásához).

A találmány tárgyát PD-1 aktivitásának és/vagy expressziójának modulálására alkalmas szerek képezik; a PD-1 és természetes ligandumja(i) (például B7-4) közötti kölcsönhatás; és szerek immunválasz modulálására PD-1 és természetes ligandumja, például B7-4 közötti kölcsönhatás modulálása útján. Ezen eljárásokban alkalmazható szemléltető moduláló szereket mutatunk be a továbbiakban.

B7-4 és PD-1 nukleinsav és polipeptid-molekulák

Egy megvalósítási mód szerint PD-1 aktivitásának és/vagy expressziójának modulálására alkalmas szer B7-4- és/vagy PD-1-nukleinsav-molekula, előnyösen humán B7-4- és/vagy PD-1-nukleinsav-molekula.

Egy megvalósítási mód szerint a találmány szerinti izolált nukleinsav-molekulák eukarióta B7-4- vagy PD-1-polipeptideket kódolnak. A molekulák B7-4 családjá számos konzervált régiót tartalmaz, köztük szignáldoméneket, IgV-doméneket és az IgC-doméneket. Az IgV-doméneket és az IgC-doméneket a szakterüle-



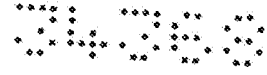
ten Ig-szupercsalád doméneknek tartják. Ezen domének olyan szerkezeti egységeknek felelnek meg, amelyeknek Ig-redőnek nevezett elkülöníthető feltekeredési mintázatuk van. Az Ig-redők két β -redőből álló szendvicset tartalmaznak, amelyek mindegyike 5-10 aminosav antiparalel β -szálából állnak, konzervált diszulfid-hiddal a két redő között a legtöbb, de nem az összes doménben. Az Ig, TCR és MHC molekulák IgC-doménjei ugyanolyan típusú szekvenciamintázatot tartalmaznak, amelyeket C1-készletnek neveznek az Ig-szupercsaládban. Más IgC-domének más készletekbe tartoznak. Az IgV-domének szintén közös szekvenciamintázatot tartalmaznak, és V-készlet doméneknek nevezzük azokat. Az IgV-domének hosszabbak, mint a C-domének, és két további β -szálát alkotnak.

A humán B7-4 molekula két formáját azonosították. Az egyik forma egy természetben előforduló oldható polipeptid, azaz egy rövid hidrofíl doménje van, és nincs transzmembrán doménje, és a leírásban B7-4S-nek nevezzük (és a 2. azonosítószámú szekvencián mutatjuk be). A második forma egy sejthez kapcsolt polipeptid, azaz transzmembrán és citoplazmatikus doménje van, és a leírásban B7-4M-nek nevezzük (és a 4. azonosítószámú szekvencián mutatjuk be).

A B7-4 fehérjék szignálszekvenciát tartalmaznak, és egy IgV-domént és egy IgC-domént. A 2. azonosítószámú szekvencia szignálszekvenciáját körülbelül az 1. aminosavtól körülbelül a 18. aminosavig mutatjuk be. A 4. azonosítószámú szekvencia szignálszekvenciáját körülbelül az 1. aminosavtól körülbelül a 18. aminosavig mutatjuk be. A 2. azonosítószámú szekvencia IgV-doménjét körülbelül az 19. aminosavtól körülbelül a 134. aminosavig mutatjuk be, és a 4. azonosítószámú szekvencia IgV-doménjét körülbelül az 19. aminosavtól körülbelül a 134. aminosavig mutatjuk be. A 2. azonosítószámú szekvencia IgC-doménjét körülbelül az 135. aminosavtól körülbelül a 227. aminosavig mutatjuk be, és a 4. azonosítószámú szekvencia IgV-doménjét körülbelül az 135. aminosavtól körülbelül a 227. aminosavig mutatjuk be. A 2. azonosítószámú szekvencián bemutatott B7-4 hidrofíl farka egy, a körülbelül a 228. aminosavtól körülbelül a 245. aminosavig bemutatott hidrofíl farkat tartalmaz. A 4. azonosítószámú szekvencián bemutatott B7-4 polipeptid egy, a 4. azonosítószámú szekvencia körülbelül a 239. aminosavától körülbelül a 259. aminosaváig bemutatott transzmembrán domént és egy, a 4. azonosítószámú szekvencia körülbelül a 260. aminosavától körülbelül a 290. aminosaváig bemutatott citoplazmatikus domént tartalmaz.

Egér B7-4-molekulákat is azonosítottunk. Az egér cDNS-szekvenciát az 5. ábrán mutatjuk be, és az egér B7-4 aminosav-szekvenciát a 6. ábrán mutatjuk be. Ezen egér B7-4-molekulák szintén a találmány tárgyát képezik.

A találmány szerint a PD-1-et B7-4-hez kötődő receptorként azonosítottuk. A PD-1-molekulák az immunglobulin-gén szupercsalád tagjai. A PD-1-nek [Ishida és mtsai., EMBO J. 11, 3887. old. (1992); Shinohara és mtsai., Genomics 23, 704. old. (1994); 5 698 520. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat] egy immunglobulin szupercsaládba tartozó domént tartalmazó extracelluláris régiója, egy transzmembrán doménja, és egy immunreceptor tirozin-alapú gátló motívumot (ITIM) tartalmazó intracelluláris doménja van. Ezen jellemzők molekulák egy nagyobb családját határozzák meg, amit immuninhibitorikus receptoroknak nevezünk, amely tartalmazza a gp49B-t, PIR-B-t és a élősejt gátló receptorokat (KIR) is [Vivier és Daeron, Immunol. Today 18, 286. old. (1997)]. Gyakran feltételezik, hogy ezen receptorok tirozinon foszforilált ITIM-motívuma kölcsönhat az SH2-domént tartalmazó foszfatázokkal, ami gátló jelekhez vezet. Ezen immuninhibitorikus receptorok egy alhalmaza kötődik az MHC-molekulákhoz, például a KIR-ekhez, és a CTLA4 kötődik a B7-1-hez és



B7-2-höz. Azt javasolták, hogy filogenikus kapcsolat van az MHC- és B7-gének között [Henry és mtsai., *Immunol. Today* 20, 285-288. old. (1999)].

A PD-1 nukleotidszekvenciáját a 10. és 11. azonosítószámú szekvencián mutatjuk be, és a PD-1 aminosav-szekvenciáját a 12. azonosítószámú szekvencián mutatjuk be [lásd még Ishida és mtsai., *EMBO J.* 11, 3887. old. (1992); Shinohara és mtsai., *Genomics* 23, 704. old. (1994); 5 698 520. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat]. A PD-1-et korábban kivonásos klónozáson alapuló megközelítés alkalmazásával azonosították, amelyet apoptózisos sejthalálban szerepet játszó fehérjék szelektálására. A találmány szerint a PD-1-et a CD28/CTLA4 család tagjaként azonosítjuk azon képessége alapján, hogy kötődik B7-4-hez. Mint a CTLA4, a PD-1 gyorsan indukálódik T-sejtek felszínén anti-CD3 hatására [Agata és mtsai., *Int. Immunol.* 8, 765. old. (1996)]. Azonban ellentétben a CTLA4-gyel, a PD-1 indukálódik a B-sejtek felszínén is (anti-IgM hatására). A PD-1 expresszálódik timociták és mieloid sejtek egy alhalmazán is [Agata és mtsai., mint fent; Nishimura és mtsai., *Int. Immunol.* 8, 773. old. (1996)]. A találmány a B7-4-et mint a PD-1 ligandumát azonosítja.

A találmány különböző megvalósítási módjait további részletességgel is leírjuk az alábbi alfejezetekben:

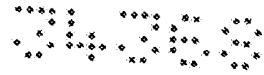
I. Definíciók

A leírás szerinti értelemben „immunsejt” kifejezés alatt olyan sejteket értünk, amelyek hematopoietikus eredetűek, és szerepet játszanak az immunválaszban. Immunsejtek közé tartoznak limfociták, mint például B-sejtek és T-sejtek; természetes ölősejtek; mieloid sejtek, mint például monociták, makrofágok, eozinofil sejtek, törzssejtek, bazofil sejtek és granulociták.

A leírás szerinti értelemben „T-sejt” kifejezés alatt $CD4^+$ T-sejteket és $CD8^+$ T-sejteket értünk. A T-sejt kifejezés magában foglalja a 1-es típusú segítő T-sejteket és a 2-es típusú segítő T-sejteket. Az „antigénprezentáló sejt” kifejezés alatt professzionális antigénprezentáló sejteket (például B-limfocitákat, monocitákat, dendritikus sejteket, Langerhans-féle sejteket) értünk, valamint egyéb antigénprezentáló sejteket (például keratinocitákat, endoteliális sejteket, asztrocitákat, fibroblasztokat, oligodendrocitákat).

A leírás szerinti értelemben az „immunválasz” kifejezés alatt T-sejt-közvetített és/vagy B-sejt-közvetített immunválaszokat értünk, amelyeket befolyásol a T-sejtek kostimulációjának a modulálása. Személtető immunválaszok közé tartoznak T-sejtes válaszok, például citokintermelés, és sejtcsapótoxicitás. Ezenfelül az immunválasz kifejezés alatt olyan immunválaszokat is értünk, amelyeket közvetve befolyásol a T-sejtek aktiválása, például ellenanyag-termelés (humorális válaszok) és citokin-érzékeny sejtek, például makrofágok aktiválása.

A leírás szerinti értelemben „kostimuláns receptor” kifejezés alatt olyan receptorokat értünk, amelyek kostimuláns jeleket továbbítanak immunsejtekbe, például CD28. A leírás szerinti értelemben a „gátló receptor” kifejezés alatt olyan receptorokat értünk, amelyek negatív jelet továbbítanak immunsejtbe (például CTLA4 vagy PD-1). Gátló receptor által továbbított gátló jel még akkor is előfordulhat, ha kostimuláns receptor (mint például CD28) nincs jelen az immunsejten, ezáltal az nem egyszerűen a gátló receptorok és kostimuláns receptorok közötti kompetíció függvénye a kostimuláns molekulákért [Fallarino és mtsai., *J. Exp. Med.* 188, 205. old. (1998)]. Gátló jel továbbítása immunsejtbe érzéketlenséget vagy anergiát vagy programozott sejthalált eredményezhet az immunsejtben. A gátló jel továbbítása előnyösen olyan mechanizmuson keresztül működik, amely nem foglal apoptózist magába. A leírás szerinti értelemben „apoptózis” kifejezés alatt programozott sejthalált ér-



tünk, amelyet a szakterületen ismert módszerekkel jellemezhetünk. Az apoptózisos sejthalált például sejtek zsugorodásával, membránok hólyagosodásával, és kromatin kondenzációjával jellemezhetjük, ami a sejtek fragmentálódásában tetőzik. Az apoptózison átmennő sejtek internukleoszómális DNS-hasítás jellegzetes mintázatát mutatják.

A receptorhoz kötődő B7-4-molekula formájától függően a jel akár továbbítható (például B7-4-molekula multivalens formája által, ami receptorok keresztikötését eredményezi), akár gátolható (például B7-4-molekula oldható, monovalens formája által), például B7-4-molekulák aktiváló formáinak a receptorért való versengése által. Azonban vannak olyan esetek, amelyekben oldható molekula stimuláló lehet. A különféle moduláló szerek hatásait könnyen demonstrálhatjuk a találmány szerinti rutin szkrináló vizsgálati eljárások alkalmazásával.

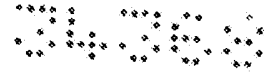
A leírás szerinti értelemben a „kostimulál” kifejezés alatt aktivált immunsejtek vonatkozásában kostimuláns molekula azon képességét értjük, hogy egy második, nem aktiváló, receptor-közvetített jelet biztosít („kostimuláns jelet”), amely proliferációt vagy effektor funkciót indukál. Például kostimuláns jel citokinszekréciót eredményezhet, például olyan T-sejtekben, amelyek T-sejt-receptor-közvetített jelet kaptak. Az olyan immunsejteket, amelyek sejtreceptor-közvetített jelet kaptak, például aktiváló receptoron keresztül, leírás szerinti értelemben „aktivált immunsejteknek” nevezzük.

A leírás szerinti értelemben az „aktiváló receptor” kifejezés alatt olyan immunsejt-receptorokat értünk, amelyek antigént komplexált antigént (például MHC-molekulákkal összefüggésben) kötnek, vagy ellenanyagokhoz kötődnek. Ilyen aktiváló receptorok közé tartoznak T-sejt-receptorok (TCR), B-sejt-receptorok (BCR), citokin-receptorok, LPS-receptorok, komplement-receptorok, és Fc-receptorok.

Például T-sejt-receptorok T-sejteken vannak jelen és CD3-molekulákhoz kapcsolódnak. A T-sejt-receptorokat MHC-molekulákkal (valamint poliklonális T-sejt-aktiváló reagensekkel) összefüggésben lévő antigének stimulálják. A TCR-en keresztül történő T-sejt-aktiválás számos változást eredményez, például fehérjék foszforilációját, membránlipidek változásait, ionáramlásokat, ciklikus nukleotidok változásait, RNS-transzkripció változásait, fehérjeszintézis változásait, és sejttérfogat változásokat.

A B-sejt-receptorok B-sejteken vannak jelen. A B-sejt antigén-receptorok membrán-Ig (mIg) és más transzmembrán polipeptidek (például I α és I β) közötti komplexek. Az mIg jeltovábbító funkcióját receptormolekulák oligomer vagy multimer antigének általi keresztikötése váltja ki. A B-sejtek aktiválódhatnak anti-immunglobulin ellenanyagok által is. BCR-aktiválódás következtében számos változás történik a B-sejtekben, beleértve tirozin-foszforilációt.

Az Fc-receptorok sok immunválaszban résztvevő sejten megtalálhatók. Az Fc-receptorok (FcR) az immunglobulin molekulák (Ig) Fc-részének sejtfelszíni receptorai. Az eddig azonosított humán FcR-ek közé tartoznak azok, amelyek IgG-t (jele Fc γ R), IgE-t (jele Fc ϵ R1), IgA-t (jele Fc α R) és polimerizált IgM/A-t (jele Fc μ aR) ismernek fel. Az FcR-ek az alábbi sejttípusokban találhatók meg: Fc ϵ R1 (törzssejtek), Fc ϵ R2 (sok leukocita), Fc α R (neutrofilek), és Fc μ aR (mirigyepitélum, hepatociták) [Hogg, N., Immunol. Today 9, 185-186. old. (1988)]. A széles körben tanulmányozott Fc γ R-ek központi szerepet játszanak sejt immunvédekezésben, és felelősek az autoimmun betegségek patogenezisében szerepet játszó gyulladásos és hidrolitikus enzimek közvetítőanyagai felszabadulásának stimulálásában [Unkeless, J.C. és mtsai., Annu. Rev. Immunol. 6, 251-281. old. (1988)]. Az Fc γ R-ek kulcsfontosságú kapcsolatot alkotnak effektor sejtek és az Ig-t szekretáló limfociták között,



mivel a makrofág/monocita, polimorfonukleáris leukocita és természetes ölősejtek (NK) FcγR-jei IgG általi specifikus felismerés elemét ruházzák a sejtekre. A humán leukocitáknak legalább három különböző receptora van IgG-re: hFcγRI (amely monocitákon/makrofágokon található), hFcγRII (monocitákon, eozinofileken, vérlemezkéken, talán B-sejteken és a K562-sejtvonalon) és hFcγRIII (NK-sejteken, neutrofileken, eozinofileken és makrofágokon).

A T-sejtek vonatkozásában kostimuláns jel továbbítása T-sejthe olyan jeltovábbító útvonalat foglal magába, amelyet nem gátol a ciklosporin-A. Ezenfelül a kostimuláns jel citokinszekréciót (például IL-2 és/vagy IL-10) indukálhat T-sejtben és/vagy megakadályozhatja antigénre való érzéketlenséget, anergia indukálását, vagy a sejthalál indukálását a T-sejtben.

A leírás szerinti értelemben a „gátló jel” kifejezés alatt molekula gátló receptoron (például CTLA4-en vagy PD-1-en) keresztül továbbított jelét értjük immunsejten. Ilyen jel antagonizál aktiváló receptoron keresztül (például TCR-, CD3-, BCR- vagy Fc-molekulán keresztül) jellel, és például második hírvivő létrehozását; proliferáció gátlását; immunsejt effektor funkciójának gátlását, például csökkent fagocitózist, csökkent ellenanyag-termelést, csökkent sejtes toxicitást, immunsejt közvetítőanyag-termelésének (mint például citokinek [például IL-2] és/vagy allergiás válaszok közvetítőanyagai termelésének) elmaradását; vagy anergia kialakulását eredményezheti.

A leírás szerinti értelemben az „érzéketlenség” kifejezés alatt immunsejtek stimulálás, például aktiváló receptoron vagy citokinen keresztül történő stimulálás elleni ellenállását értjük. Érzéketlenség előfordulhat például immunszuppresszánsoknak való kitettség vagy antigén magas dózísának való kitettség miatt. A leírás szerinti értelemben az „anergia” vagy „tolerancia” kifejezések alatt aktiváló-receptor-közvetített stimuláció elleni ellenállást értünk. Ilyen ellenállás általában antigénspecifikus, és fennmarad azután is, hogy a toleranciát kiváltó antigénnek való kitettség megszűnik. Például az anergiát T-sejtekben (ellentétben az érzéketlenséggel) a citokintermelés, például IL-2-termelés hiánya jellemzi. T-sejt-anergia akkor fordul elő, amikor T-sejtek antigénnek vannak kitéve, és egy első jelet kapnak (T-sejt-receptor- vagy CD3-közvetített jelet) második jel (kostimuláns jel) nélkül. Ilyen körülmények között a sejtek újrakitettsége ugyanannak az antigénnek (még ha az újrakitettség kostimuláns molekula jelenlétében is történik) citokinek termelődésének elmaradását eredményezi, és ezáltal, proliferáció elmaradását. Anergias T-sejtek azonban képesek választi kialakítani nem kapcsolódó antigénekre, és képesek proliferációra citokinekkel (például IL-2) együtt tenyésztve. Például a T-sejt-anergiát megfigyelhetjük T-limfociták IL-2-termelésének hiányában is, ELISA-val mérve vagy proliferációs vizsgálati eljárással indikátor sejtvonal alkalmazásával. Más megoldásként jelzőgén-konstrukciót alkalmazhatunk. Például anergias T-sejtek nem iniciálják az IL-2-gén heterológ promóter általi transzkripcióját az 5' IL-2-gén enhancer szabályozása alatt, vagy az enhancerben található Ap1-szekvencia multimerje által [Kang és mtsai., Science 257, 1134. old. (1992)].

A B7-4 fehérje- és nukleinsav-szekvenciák bizonyos konzervált szerkezeti és funkcionális jellemzőkkel rendelkező molekulák családját alkotják. Hasonlóképpen a PD-1 fehérje- és nukleinsav-molekulák bizonyos konzervált szerkezeti és funkcionális jellemzőkkel rendelkező molekulák családjának a tagjai. A „család” kifejezés alatt fehérje- és nukleinsav-szekvenciák vonatkozásában két vagy több fehérje vagy nukleinsav-molekulát értünk, amelyeknek közös szerkezeti doménje vagy motívuma van, és leírás szerinti definiált elegendő aminosav- vagy nukleinsav-szekvencia homológiája van. Ilyen családtagok lehetnek természetben előfordulók vagy termé-



szetben nem előfordulók, és lehetnek ugyanabból vagy eltérő fajból. Például egy család tartalmazhat egy első, emberi eredetű fehérjét, valamint más, emberi eredetű különböző fehérjéket, vagy más megoldásként nem emberi eredetű homológokat tartalmazhat. A család tagjainak lehetnek közös funkcionális jellemzői. A táblázat szerinti B7-4-molekulák a molekulák B7-családjának tagjai. A „B7-család” vagy „B7-molekulák” kifejezések alatt a leírás szerinti értelemben kostimuláns molekulákat értünk, amelyeknek a szekvenciája homológ a B7-polipeptidekkel, például B7-1-gyel, B7-2-vel vagy B7-3-mal (amit a BB-1 ellenanyag ismer fel), B7h-val [Swallow és mtsai., *Immunity* 11, 423. old. (1999)] és/vagy B7-4-gyel. Például a humán B7-1-nek és B7-2-nek megközelítőleg 26% az aminosav-szekvencia azonossága, amikor a BLAST programmal összehasonlítjuk azokat az NCBI-nél az alapértelmezett paraméterekkel [Blosom62-mátrix 11-es értékű rés-büntetéssel létezésre és 1-es értékkel kiterjesztésre (lásd <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)].

Előnyös B7-polipeptidek képesek kostimuláns vagy gátló jeleket továbbítani immunsejtekbe, ezáltal elősegíteni vagy gátolni az immunsejt-válaszokat. Például amikor kostimuláns receptorhoz kötődik, a B7-4 immunsejtek kostimulációját indukálhatja, vagy gátolhatja immunsejtek kostimulációját, például amikor oldható formában van jelen. Amikor gátló receptorokhoz kötődnek, B7-4-molekulák gátló jelet továbbíthatnak immunsejtekbe. Előnyös B7-családtagok közé tartozik a B7-1, B7-2, B7-3 (amit a BB-1 ellenanyag ismer fel), B7h és B7-4, és azok oldható fragmensei vagy származékai. Egy megvalósítási mód szerint B7-családtagok egy vagy több receptorhoz kötődnek immunsejten, például CTLA4-hez, CD28-hoz, ICOS-hoz, PD-1-hez és/vagy más receptorokhoz, és - a receptortól függően - képesek gátló jelet vagy kostimuláns jelet továbbítani immunsejtbe, előnyösen T-sejtbe.

Előnyös PD-1-molekulák képesek gátló jelet továbbítani immunsejtbe, ezáltal gátolni immunsejt effektor funkcióit, vagy képesek immunsejtek kostimulációját elősegíteni (például kompetitív gátlás útján), például amikor oldható, monomer formában vannak jelen. Előnyös PD-1-családtagok kötődnek egy vagy több receptorhoz, például B7-1-hez, B7-2-höz, B7-4-hez és/vagy más molekulákhoz az antigénprezentáló sejteken, és szekvenciájuk homológ PD-1-gyel.

Ezenfelül egy megvalósítási mód szerint azon fehérjék, amelyek egy fehérjecsalád tagjai, kötődnek egy vagy több más családtag-fehérje ellen termeltetett ellenanyaghoz. Például az anti-BB1 ellenanyag felismeri a B7-4-molekulákat.

A leírás szerinti értelemben az „aktivitás” kifejezés alatt B7-4- vagy PD-1-polipeptid vonatkozásában B7-4- vagy PD-1-fehérje szerkezetében rejlő aktivitást értünk. A B7-4 vonatkozásában az „aktivitás” kifejezés alatt immunsejtek kostimulációjának modulálását értjük, például kostimuláns jel modulálását aktivált immunsejtben, vagy gátlás modulálását gátló jel modulálása útján immunsejtben, például kötődve természetes receptorhoz immunsejten. Amikor a B7-4-molekula aktiváló formája hozzákötődik kostimuláns receptorhoz, kostimuláns jel keletkezik az immunsejtben. Amikor a B7-4-molekula inaktív formája hozzákötődik gátló receptorhoz, gátló jel keletkezik az immunsejtben.

Kostimuláns jel modulációja immunsejt effektor funkciójának modulálását eredményezi. Ezáltal a „B7-4-aktivitás” kifejezés alatt értjük a B7-4-polipeptid képességét a természetes receptorához (receptoraihoz) való kötődésre, a képességét immunsejt kostimuláns vagy gátló jeleinek modulálására, és a képességét az immunválasz modulálására.



A PD-1 vonatkozásában az „aktivitás” kifejezés alatt PD-1-polipeptid képességét értjük aktivált immunsejt gátló jelének modulálására, például antigénprezentáló sejten lévő természetes ligandumhoz való kötődés útján. A PD-1 gátló jelet továbbít immunsejthez, a CTLA4-hez hasonló módon. Gátló jel modulálása immunsejten proliferáció és/vagy immunsejt általi citokinszekréció modulálását eredményezi. A PD-1 képes modulálni kostimuláns jelet is, immunsejt kostimuláns receptorral való kompetíciója révén a B7-molekulák kötéseért. Ezáltal a „PD-1-aktivitás” kifejezés alatt értjük a PD-1-polipeptid képességét a természetes ligandumához (ligandumaihoz) való kötődésre, a képességét immunsejt kostimuláns vagy gátló jeleinek modulálására, és a képességét az immunválasz modulálására.

A leírás szerinti értelemben „természetben előforduló” nukleinsav olyan RNS- vagy DNS-molekula, amelynek a nukleotidszekvenciája előfordul a természetben (azaz természetes fehérjét kódol).

A leírás szerinti értelemben „antiszensz” nukleinsav-molekula olyan nukleinsav-molekula, amely komplementer fehérjét kódoló „szensz” nukleinsav-molekulával, például komplementer kétszálú cDNS-molekula kódoló szálával, komplementer mRNS-szekvenciával, vagy komplementer gén kódoló szálával. Ennek megfelelően antiszensz nukleinsav-molekula hidrogénhidakkal kötődhet szensz nukleinsav-molekulához.

A leírás szerinti értelemben a „kódoló régió” kifejezés alatt nukleotidszekvencia olyan régiót értjük, amelyek aminosav-oldalláncokká transzlálódnak, míg a „nem kódoló régió” kifejezés alatt nukleotidszekvencia olyan régiót értjük, amelyek nem transzlálódnak aminosavakká (például 5' és 3' nem transzlálódó régiók).

A leírás szerinti értelemben a „vektor” kifejezés alatt másik, hozzá kapcsolt nukleinsav-molekulát továbbítani képes nukleinsav-molekulát értünk. Vektor egy típusa „plazmid”, amely alatt cirkuláris kétszálú DNS-t értünk, amelybe további DNS-szegmenseket ligálhatunk. Vektor másik típusa a vírusvektor, ahol a további DNS-szegmenseket a virális genomba ligálhatjuk. Bizonyos vektorok képesek autonóm replikációra a gazdasejtben, amelybe be lettek juttatva (például bakteriális origót tartalmazó bakteriális vektorok és episzómális emlős vektorok). Más vektorok (például nem episzómális emlős vektorok) integrálódnak a gazdasejt genomjába gazdasejtbe való bejuttatás után, és ezáltal a gazdasejt genomjával együtt replikálódnak. Ezenkívül bizonyos vektorok képesek azon gének expressziójának irányítására, amelyekhez működőképesen kapcsolva vannak. Az ilyen vektorokat a leírás szerinti értelemben „rekombináns expressziós vektoroknak” vagy egyszerűen „expressziós vektoroknak” nevezzük. Általában a rekombináns DNS módszerekben hasznos expressziós vektorok plazmidok. A találmány szerint a „plazmid” és „vektor” kifejezéseket felcserélhető módon alkalmazhatjuk, mivel a plazmidok a vektorok leggyakrabban alkalmazott formái. Azonban a találmány tárgyát képezik expressziós vektorok egyéb formái is, mint például virális vektorok (például replikáció-defektív retrovirusok, adenovírusok, adeno-asszociált vírusok), amelyek ekvivalens funkciót szolgálnak.

A leírás szerinti értelemben a „gazdasejt” kifejezés alatt olyan sejtet értünk, amelybe találmány szerinti nukleinsav-molekulát, mint például találmány szerinti rekombináns expressziós vektort bejuttatunk. A „gazdasejt” és „rekombináns gazdasejt” kifejezéseket felcserélhető módon alkalmazzuk a leírás szerinti értelemben. Nyilvánvaló, hogy ezen kifejezések nem csak az adott sejtekre vonatkoznak, hanem ilyen sejtek utódjaira és potenciális utódjaira is. Mivel bizonyos módosulások történhetnek az egymást követő generációkban mutáció vagy környezeti hatások hatására, az ilyen utódsejtek valójában nem biztos, hogy azonosak a szülősejtekkel, de még mindig a kifejezés oltalmi körébe tartoznak a leírás szerint.



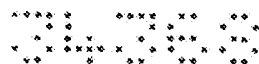
A leírás szerinti értelemben „transzgenikus állat” alatt nem ember állatot, előnyösen emlőst, előnyösebben egeret értünk, amelyben az állat egy vagy több sejtje „transzgént” tartalmaz. A „transzgén” kifejezés alatt exogén DNS-t értünk, amely integrálódott a sejt genomjába, amelyből a transzgenikus állat kifejlődik, és amely az éretlen állat genomjában marad, például kódoló géntermék expressziójának irányítására a transzgenikus állat egy vagy több sejt típusában vagy szövetében.

A leírás szerinti értelemben „homológ rekombináns állat” alatt transzgenikus típusú nem ember állatot, előnyösen emlőst, előnyösebben egeret értünk, amelyben endogén gént megváltoztattunk az endogén gén és az állat sejtjébe, például az állat embrionális sejtjébe bejuttatott exogén DNS-molekula közötti homológ rekombináció útján az állat kifejlődése előtt.

A leírás szerinti értelemben „izolált fehérje” alatt olyan fehérjét értünk, amely lényegében mentes más fehérjéktől, sejtes anyagtól és tenyésztő tápközegtől, amikor azt sejtekből izoláljuk vagy rekombináns DNS módszerekkel előállítjuk, vagy kémiai előanyagoktól vagy más vegyszerektől, amikor kémiai úton szintetizáljuk. „Izolált” vagy „tisztított” fehérje vagy annak biológiailag aktív részlete lényegében mentes az abból a sejtes vagy szöveti forrásból származó sejtes anyagoktól és más szennyező fehérjéktől, amelyből a B7-4- vagy PD-1-fehérje származik, vagy lényegében mentes kémiai előanyagoktól vagy más vegyszerektől, amikor kémiai úton szintetizáljuk. A „lényegében mentes sejtes anyagoktól” kifejezés alatt B7-4- vagy PD-1-fehérje olyan készítményeit értjük, amelyekben a fehérje el van választva azon sejt sejtkomponenseitől, amelyből izoláltuk, vagy amelyben rekombináns úton előállítottuk. Egy megvalósítási mód szerint a „lényegében mentes sejtes anyagoktól” kifejezés alatt B7-4- vagy PD-1-fehérje olyan készítményeit értjük, amelyeknek kevesebb, mint körülbelül 30%-a (száraz tömegre vonatkoztatva) nem B7-4- vagy PD-1-fehérje (amit a leírás szerinti értelemben „szennyező fehérjének” is nevezünk), előnyösebben kevesebb, mint körülbelül 20%-a nem B7-4- vagy PD-1-fehérje, még előnyösebben kevesebb, mint körülbelül 10%-a nem B7-4- vagy PD-1-fehérje, és legelőnyösebben kevesebb, mint körülbelül 5%-a nem B7-4- vagy PD-1-fehérje. Amikor a B7-4- vagy PD-1-fehérjét vagy annak biológiailag aktív részletét rekombináns úton állítjuk elő, az előnyösen lényegében mentes tenyésztő tápközegtől is, azaz a tenyésztő tápközeg kevesebb, mint körülbelül 20%-a, előnyösebben kevesebb, mint körülbelül 10%-a, és legelőnyösebben kevesebb, mint körülbelül 5%-a a fehérjekészítmény térfogatának.

A „lényegében mentes kémiai előanyagoktól vagy más vegyszerektől” kifejezés alatt B7-4- vagy PD-1-fehérje olyan készítményeit értjük, amelyekben a fehérjét elválasztottuk a kémiai előanyagoktól és más vegyszerektől, amelyek részt vettek a fehérje szintézisében. Egy megvalósítási mód szerint a „lényegében mentes kémiai előanyagoktól vagy más vegyszerektől” kifejezés alatt B7-4- vagy PD-1-fehérje olyan készítményeit értjük, amelyeknek kevesebb, mint körülbelül 30%-a (száraz tömegre vonatkoztatva) kémiai előanyag vagy nem B7-4 vagy PD-1 vegyszer, előnyösebben kevesebb, mint körülbelül 20%-a kémiai előanyag vagy nem B7-4 vagy PD-1 vegyszer, még előnyösebben kevesebb, mint körülbelül 10%-a kémiai előanyag vagy nem B7-4 vagy PD-1 vegyszer, és legelőnyösebben kevesebb, mint körülbelül 5%-a kémiai előanyag vagy nem B7-4 vagy PD-1 vegyszer.

A leírás szerinti értelemben az „ellenanyag” kifejezés alatt ellenanyag „antigénkötő részletét” is értjük (vagy egyszerűen „ellenanyag-részletet”). A leírás szerinti értelemben az „antigénkötő részlet” kifejezés alatt ellenanyag egy vagy több fragmensét értjük, amely megtartja antigénhez (például B7-4-hez) való kötődés specifikus képességét. Kimutatták, hogy egy ellenanyag antigénkötő funkcióit a teljes hosszúságú ellenanyag részletei



is képesek ellátni. Az „antigénkötő részlet” kifejezés alatt értett kötőfragmensek példái közé tartoznak (i) Fab-fragmens, a VL, HL, CL és CH1 doménekéből álló monovalens fragmens; (ii) $F(ab')_2$ -fragmens, két Fab-fragmensből álló bivalens fragmens, amelyet diszulfid-híd köt össze a csuklórégióban; (iii) a VH és CH1 doménekéből álló Fd-fragmens; (iv) ellenanyag egy karjának a VL és VH doménjeiből álló Fv-fragmens; (v) dAb-fragmens [Ward és mtsai., *Nature* 341, 544-546. old. (1989)], amely VH-domént tartalmaz; és (vi) izolált komplementaritást meghatározó régió (CDR). Ezenkívül, habár az Fv-fragmens két doménjét, a VL- és VH-domént eltérő gének kódolják, azokat összekapcsolhatjuk rekombináns módszerek alkalmazásával, olyan szintetikus kapcsolómolekulával, amely lehetővé teszi, hogy azokat egyetlen molekulává alakítsuk, amelyben a VL- és VH-régiók párosodnak monovalens molekulákat alkotva [amit egyláncú Fv-ként ismerünk (scFv); lásd Bird és mtsai., *Science* 242, 423-426. old. (1988); Huston és mtsai., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 5879-5883. old. (1988); és Osbourn és mtsai., *Nature Biotechnology* 16, 778. old. (1998)]. Ilyen egyláncú ellenanyagokat is be-
leértünk az ellenanyag „antigénkötő részlete” kifejezésbe. Specifikus scFv bármely VH- és VL-szekvenciáját hozzákapcsolhatjuk humán immunoglobulin állandó régió cDNS-hez vagy genomális szekvenciához, annak érdekében, hogy teljes IgG-molekulát vagy más izotípusokat kódoló expressziós vektorokat állítsunk elő. A VH-t és VL-et alkalmazhatjuk Fab-, Fv vagy más immunoglobulin-fragmens előállítására is, akár fehérjekémia, akár rekombináns DNS technológia alkalmazásával. Az egyláncú ellenanyagok más formái, mint például kettős ellenanyagok is a találmány tárgykörébe tartoznak. A kettős ellenanyagok („diabody”) bivalens, bispecifikus ellenanyagok, amelyekben a VH- és VL-doméneket egyetlen polipeptidláncként expresszáljuk, de olyan kapcsolómolekulát alkalmazunk, amely túl rövid ahhoz, hogy lehetővé tegye ugyanazon a lánc két doménje közötti párosodást, ezáltal kényszeríti a doméneket, hogy egy másik lánc komplementer doménjeivel párosuljanak, és két antigénkötő helyet hozzanak létre [lásd például Holliger, P. és mtsai., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 6444-6448. old. (1993); Poljak, R.J. és mtsai., *Structure* 2, 1121-1123. old. (1994)].

Még másképp ellenanyag vagy annak antigénkötő részlete nagyobb immunadhéziós molekulák része lehet, amelyeket az ellenanyag vagy ellenanyag-részlet egy vagy több más fehérjével vagy peptiddel való kovalens vagy nemkovalens kapcsolódása hoz létre. Ilyen immunadhéziós molekulák példái közé tartozik sztreptavidin magrégió alkalmazása tetramer scFv-molekula létrehozására [Kipriyanov, S.M. és mtsai., *Human Antibodies and Hybridomas* 6, 93-101. old. (1995)], és ciszteim-oldallánc, markerpeptid és C-terminális polihisztidin-címke alkalmazása bivalens és biotinilált scFv-molekulák előállítására [Kipriyanov, S.M. és mtsai., *Mol. Immunol.* 31, 1047-1053. old. (1994)]. Ellenanyag-részleteket, mint például Fab- és $F(ab')_2$ -fragmenseket egész ellenanyagokból állíthatunk elő hagyományos módszerek alkalmazásával, mint például egész ellenanyagok sorrendben papainos vagy pepszines emésztésével. Ezenkívül ellenanyagokat, ellenanyag-részleteket, és immunadhéziós molekulákat szokásos rekombináns módszerekkel állíthatunk elő a leírás szerint.

Ellenanyagok lehetnek poliklonálisak vagy monoklonálisak; xenogének, allogének, vagy szingének; vagy azok módosított formái, mint például humanizált, kiméra ellenanyagok, stb. Előnyösen a találmány szerinti ellenanyagok specifikusan vagy lényegében specifikusan kötődnek B7-4-molekulákhoz. A leírás szerinti értelemben a „monoklonális ellenanyag” és „monoklonális ellenanyag-készítmény” kifejezések alatt ellenanyag-molekulák olyan populációját értjük, amely csak egyfajta, antigén adott epitópjával reagálni képes antigénkötő helyet tartalmaz, míg „poliklonális ellenanyag” és „poliklonális ellenanyag-készítmény” kifejezés alatt ellenanyag-molekulák olyan populációját értjük, amely többfajta, adott antigénnel reagálni képes antigénkötő helyet



tartalmaz. Monoklonális ellenanyag-készítmény tipikusan egyetlen kötőaffinitást mutat egy adott antigénre nézve, amellyel immunológiailag reagál.

A leírás szerinti értelemben a „humanizált ellenanyag” kifejezés alatt olyan, nem emberi sejt által termelt, változó és állandó régiókat tartalmazó ellenanyagokat értünk, amelyek úgy vannak módosítva, hogy jobban hasonlítsanak emberi sejt által előállított ellenanyagokra. Például a nem emberi ellenanyag aminosav-szekvenciájának megváltoztatásával emberi csírvonal immunglobulin-szekvenciákban található aminosavak beépítésével. A találmány szerinti humanizált ellenanyagok tartalmazhatnak nem emberi csírvonal immunglobulin-szekvenciák által kódolt aminosav-oldalláncokat (például véletlenszerűen vagy helyspecifikus mutagenézissel beépített *in vitro*, vagy szomatikus *in vivo* mutációkat), például a CDR-ekben. A leírás szerinti értelemben a „humanizált ellenanyag” kifejezés alatt olyan ellenanyagokat is értünk, amelyekben más emlősfajok, mint például egér csírvonalából származó CDR-szekvenciákat ültettünk be emberi szerkezeti szekvenciákba.

A leírás szerinti értelemben az „izolált ellenanyag” kifejezés alatt olyan ellenanyagot értünk, amely lényegében mentes más, eltérő antigénspecifitású ellenanyagoktól (például egy izolált ellenanyag, amely specifikusan kötődik B7-4-hez, lényegében mentes olyan ellenanyagoktól, amelyek B7-4-től eltérő antigénekhez kötődnek). Ezenkívül izolált ellenanyag lényegében mentes lehet más sejtes anyagtól és/vagy vegyszerektől.

Ismert és meghatározott összefüggés van egy adott fehérje aminosav-szekvenciája és a fehérjét kódoló nukleotidszekvencia között, amit a genetikai kód határoz meg (lásd lent). Hasonlóképpen ismert és meghatározott összefüggés van egy adott nukleinsav-molekula nukleotidszekvenciája és ezen nukleinsav-molekula által kódolt aminosav-szekvencia között, amit a genetikai kód határoz meg.

A genetikai kód

Alanin	Ala	A	GCA	GCC	GCG	GCT			
Arginin	Arg	R	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGT	
Aszparagin	Asn	N	AAC	AAT					
Aszparaginsav	Asp	D	GAC	GAT					
Cisztein	Cys	C	TGC	TGT					
Glutaminsav	Glu	E	GAA	GAG					
Glutamin	Gln	Q	CAA	CAG					
Glicin	Gly	G	GGA	GGC	GGG	GGT			
Hisztidin	His	H	CAC	CAT					
Izoleucin	Ile	I	ATA	ATC	ATT				
Leucin	Leu	L	CTA	CTC	CTG	CTT	TTA	TTG	
Lizin	Lys	K	AAA	AAG					
Metionin	Met	M	ATG						
Fenilalanin	Phe	F	TTC	TTT					
Prolin	Pro	P	CCA	CCC	CCG	CCT			
Szerin	Ser	S	AGC	AGT	TCA	TCC	TCG	TCT	

Treonin	Thr	T	ACA	ACC	ACG	ACT
Triptofán	Trp	W	TGG			
Tirozin	Tyr	Y	TAC	TAT		
Valin	Val	V	GTA	GTC	GTG	GTT
Stop kodon			TAA	TAG	TGA	

Fontos és jól ismert jellemzője a genetikai kódnak a redundancia, miáltal a legtöbb, fehérjét alkotó aminosav kódolására egynél több triplett alkalmazható (amint fent bemutatjuk). Tehát számos különböző nukleotidszekvencia kódolhat egy adott aminosav-szekvenciát. Az ilyen nukleotidszekvenciákat funkcionálisan ekvivalensnek tekintünk, mivel ugyanazon aminosav-szekvencia előállítását eredményezik minden organizmusban (habár bizonyos organizmusok néhány szekvenciát hatékonyabban transzlálhatnak, mint másokat). Ezenkívül alkalomadtán egy purin vagy pirimidin metilált változatát találhatjuk meg egy adott nukleotidszekvenciában. Az ilyen metilációk nem befolyásolják a kódolási kapcsolatot a trinukleotid kodon és a megfelelő aminosav között.

Az előzőek fényében egy, találmány szerinti B7-4- vagy PD-1-polipeptidet (vagy annak bármely részletét) kódoló DNS- vagy RNS-molekula nukleotidszekvenciája alkalmazható a B7-4- vagy PD-1-aminosav-szekvencia megállapítására, a genetikai kódot alkalmazva a DNS- vagy RNS-molekula transzlálására aminosav-szekvenciává. Hasonlóképpen, bármely B7-4- vagy PD-1-aminosav-szekvencia esetén, B7-4- vagy PD-1-fehérjét kódoló megfelelő nukleotidszekvenciákat következtethetünk ki a genetikai kódból (ami, a redundancia miatt többféle nukleinsav-szekvenciát eredményezhet egy adott aminosav-szekvenciára). Ezáltal találmány szerinti B7-4- vagy PD-1-nukleotidszekvencia leírását és/vagy feltárását úgy kell tekinteni, hogy tartalmazza a nukleotidszekvencia által kódolt aminosav-szekvencia leírását és/vagy feltárását is. Hasonlóképpen, találmány szerinti B7-4- vagy PD-1-aminosav-szekvencia leírását és/vagy feltárását úgy kell tekinteni, hogy tartalmazza az aminosav-szekvencia által kódolható összes lehetséges nukleotidszekvencia leírását és/vagy feltárását is.

II. Izolált nukleinsav-molekula

Egy megvalósítási mód szerint az igényelt eljárásokban történő alkalmazásra szolgáló moduláló szerek izolált nukleinsav-molekulákat tartalmaznak, amelyek B7-4- vagy PD-1-fehérjét kódolnak, vagy azok biológiailag aktív részleteit. Hibridizációs próbaként történő alkalmazásra elegendő nukleinsav-fragmensek, B7-4-et vagy PD-1-et kódoló nukleinsavak (például B7-4- vagy PD-1-mRNS) azonosítására, és PCR-láncindítóként történő alkalmazásra való fragmensek, B7-4- vagy PD-1-nukleinsav amplifikálására vagy mutálatására szintén a találmány tárgyát képezik. A leírás szerinti értelemben a „nukleinsav-molekula” kifejezés alatt DNS-molekulákat (például cDNS-t vagy genomiális DNS-t) és RNS-molekulákat (például mRNS-t) értünk, és a DNS vagy RNS nukleotidanalógokkal előállított analógjait. A nukleinsav-molekula lehet egyszálú vagy kétszálú, de előnyösen kétszálú DNS.

„Izolált” nukleinsav-molekula az, amely el van választva más nukleinsav-molekuláktól, amelyek jelen vannak a nukleinsav-molekula természetes forrásában. Például genomiális DNS vonatkozásában az „izolált” kifejezés alatt olyan nukleinsav-molekulákat értünk, amelyek el vannak választva attól a kromoszómától, amellyel a genomiális DNS természetesen kapcsolatban van. Előnyösen „izolált” nukleinsav-molekula mentes a nukleinsav-molekulát természetben szegélyező szekvenciáktól (azaz a nukleinsav 5' és 3' végein lévő szekvenciáktól)



azon organizmus genomiális DNS-ében, amelyből a nukleinsav-molekula származik. Például különféle megvalósítási módok szerint az izolált B7-4- vagy PD-1-nukleinsav-molekula kevesebb, mint 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb hosszúságú, a nukleinsav-molekulát a genomiális DNS-ben természetben szegélyező nukleinsav-szekvenciát tartalmazhat azon organizmus genomiális DNS-ében, amelyből a nukleinsav-molekula származik. Ezenkívül „izolált” nukleinsav-molekula, mint például cDNS-molekula lényegében mentes lehet egyéb sejtes anyagoktól, vagy tenyésztő tápközegtől, amikor rekombináns módszerrel lett előállítva, vagy lényegében mentes lehet kémiai előanyagoktól vagy más vegyszerektől, amikor kémiai úton lett szintetizálva. „Izolált” B7-4- vagy PD-1-nukleinsav-molekula azonban kapcsolva lehet más nukleotidszekvenciákhoz, amelyek normálisan nem szegélyezik a B7-4- vagy PD-1-szekvenciát a genomiális DNS-ben (például a B7-4- vagy PD-1-nukleotidszekvenciák vektor szekvenciákhoz lehetnek kapcsolva). Bizonyos előnyös megvalósítási módok szerint „izolált” nukleinsav-molekula, mint például cDNS-molekula mentes lehet egyéb sejtes anyagoktól is. Azonban nem szükségeszerű, hogy a B7-4- vagy PD-1-nukleinsav-molekula mentes legyen egyéb sejtes anyagoktól ahhoz, hogy „izoláltnak” tekintsük (például egyéb emlős DNS-től elválasztott, és bakteriális sejtbe inzertált B7-4- vagy PD-1-molekulát még mindig „izoláltnak” tekintenénk).

Találmány szerinti nukleinsav-molekulát, például az 1., 3., 10. vagy 11. azonosítószám szerinti nukleotidszekvenciájú nukleinsav-molekulát, vagy annak részletét szokásos molekuláris biológiai módszerek és a leírásban feltárt szekvenciainformáció alkalmazásával izolálhatunk. Például az 1., 3., 10. vagy 11. azonosítószám szerinti nukleotidszekvenciájú nukleinsav-molekula egészének vagy részletének hibridizációs próbaként történő alkalmazásával B7-4- vagy PD-1-nukleinsav-molekulákat izolálhatunk szokásos hibridizációs vagy klónozási módszerek alkalmazásával [például ahogy Sambrook, J. és mtsai., „Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, 2. kiadás, kiad.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989) leírják].

Ezenkívül az 1., 3., 10. vagy 11. azonosítószám szerinti szekvenciájú nukleinsav-molekula egészét vagy részletét tartalmazó nukleinsav-molekulát izolálhatunk polimeráz-láncreakció (PCR) útján sorrendben az 1., 3., 10. vagy 11. azonosítószám szerinti szekvenciák alapján tervezett szintetikus oligonukleotid-láncindítók alkalmazásával.

Találmány szerinti nukleinsavat templátként cDNS, mRNS vagy más megoldásként genomiális DNS, és megfelelő oligonukleotid láncindítók alkalmazásával amplifikálhatunk szokásos PCR-amplifikációs módszerek szerint. Az így amplifikált nukleinsavat megfelelő vektorba klónozzhatjuk és DNS-szekvenciaelemzéssel jellemezhetjük. Ezenkívül B7-4- vagy PD-1-nukleotidszekvenciának megfelelő oligonukleotidokat szokásos szintetikus módszerekkel, például automatizált DNS-szintetizátorral állíthatunk elő.

Egy előnyös megvalósítási mód szerint találvány szerinti izolált nukleinsav-molekula az 1., 3., 10. vagy 11. azonosítószámú szekvenciákon bemutatott nukleotidszekvenciákat tartalmazza.

Egy másik előnyös megvalósítási mód szerint találvány szerinti izolált nukleinsav-molekula az 1., 3., 10. vagy 11. azonosítószámú szekvenciákon bemutatott nukleotidszekvenciák, vagy ezen nukleotidszekvenciák bármelyike egy részletének a komplementerét tartalmazza. Az 1., 3., 10. vagy 11. azonosítószámú szekvenciákon bemutatott nukleotidszekvenciával komplementer nukleinsav-molekula olyan, amely elegendően komplementer sorrendben az 1., 3., 10. vagy 11. azonosítószámú szekvenciákon bemutatott nukleotidszekvenciával ahhoz, hogy hibridizáljon az 1., 3., 10. vagy 11. azonosítószámú szekvenciákon bemutatott nukleotidszekvenciával, miáltal stabil duplex jön létre.



Még egy előnyös megvalósítási mód szerint találmány szerinti izolált nukleinsav-molekula olyan nukleotidszekvenciát tartalmaz, amely legalább körülbelül 50%-ban, 55%-ban, 60%-ban, 65%-ban, 70%-ban, 75%-ban, 80%-ban, 85%-ban, 90%-ban, 95%-ban, 98%-ban vagy többen homológ az 1., 3., 10. vagy 11. azonosítószerű szekvenciák bemutatott nukleotidszekvenciával (azaz a nukleotidszekvencia teljes hosszával), vagy ezen nukleotidszekvenciák bármelyikének egy részletével.

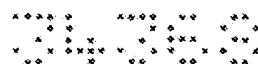
Ezenkívül a találmány szerinti nukleinsav-molekula az 1., 3., 10. vagy 11. azonosítószerű szekvenciák bemutatott nukleotidszekvenciának csak egy részletét tartalmazhatja, például egy fragmensét, amelyet próbaként vagy láncindítóként alkalmazhatunk, vagy egy fragmensét, amely B7-4- vagy PD-1-fehérje biológiailag aktív részletét kódolja. A B7-4- vagy PD-1-gének klónozásából meghatározott nukleotidszekvencia lehetővé teszi más B7-4- vagy PD-1-családtagok, valamint más fajokból való B7-4- vagy PD-1-család homológok azonosítására és/vagy klónozására tervezett próbák és láncindítók előállítását. A próba/láncindító tipikusan lényegében tiszta oligonukleotidot tartalmaz. Az oligonukleotid tipikusan olyan nukleotidszekvencia részletét tartalmazza, amely sztringens körülmények között hibridizál az 1., 3., 10. vagy 11. azonosítószerű szekvenciák szensz szekvenciájának legalább körülbelül 12 vagy 15, előnyösen körülbelül 20 vagy 25, előnyösebben körülbelül 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 vagy 75 összefüggő nukleotidjához, vagy az 1., 3., 10. vagy 11. azonosítószerű szekvenciák természetben előforduló allélvariánsához vagy mutánsához. Egy szemléltető megvalósítási mód szerint találmány szerinti nukleinsav-molekula olyan nukleotidszekvenciát tartalmaz, amely legalább körülbelül 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750 vagy 800 nukleotid hosszúságú, és sztringens hibridizálási körülmények között hibridizál az 1., 3., 10. vagy 11. azonosítószerű szekvenciák bemutatott nukleinsav-molekulához.

Egy másik megvalósítási mód szerint egy másik nukleinsav-molekula az 1., 3., 10. vagy 11. azonosítószerű szekvenciák legalább körülbelül 500, 600, 700, 800, 900 vagy 1000 összefüggő nukleotidját tartalmazza.

Egy megvalósítási mód szerint találmány szerinti nukleinsav-molekula, például próbaként történő alkalmazásra, nem tartalmazza az 1. azonosítószerű szekvencia körülbelül 815. nukleotidjától körülbelül 850. nukleotidjáig terjedő vagy az 1. azonosítószerű szekvencia körülbelül 320. nukleotidjától körülbelül 856. nukleotidjáig terjedő részletét. Egy másik megvalósítási mód szerint találmány szerinti nukleinsav-molekula, például próbaként történő alkalmazásra, nem tartalmazza a 3. azonosítószerű szekvencia körülbelül 314. nukleotidjától körülbelül 734. nukleotidjáig terjedő, vagy körülbelül 835. nukleotidjától körülbelül 860. nukleotidjáig terjedő részletét, vagy a 3. azonosítószerű szekvencia körülbelül 1085. nukleotidjától körülbelül 1104. nukleotidjáig terjedő, vagy körülbelül 1286. nukleotidjától körülbelül 1536. nukleotidjáig terjedő részletét.

Egy megvalósítási mód szerint a találmány szerinti nukleinsav-molekula az 1. vagy 3. azonosítószerű szekvencia legalább körülbelül 500 nukleotidját tartalmazza. Egy előnyös megvalósítási mód szerint találmány szerinti nukleinsav-molekula legalább az 1. azonosítószerű szekvencia körülbelül 600, legalább körülbelül 700, legalább körülbelül 800, legalább körülbelül 900 vagy legalább körülbelül 950 összefüggő nukleotidját, vagy a 3. azonosítószerű szekvencia körülbelül 1000 összefüggő nukleotidját tartalmazza. Egy másik megvalósítási mód szerint találmány szerinti nukleinsav-molekula a 3. azonosítószerű szekvencia legalább körülbelül 1500 vagy 1550 nukleotidját tartalmazza.

Előnyösen találmány szerinti izolált nukleinsav-molekula az 1. azonosítószerű szekvencia kódoló régiójának (amit az 59-793. nukleotidok mutatnak) vagy a 3. azonosítószerű szekvencia kódoló régiójának (amit az 53-922. nukleotidok mutatnak) legalább egy részletét tartalmazza. Egy másik megvalósítási mód szerint B7-4-



nukleinsav-molekula az 1. azonosítószámú szekvencia körülbelül 1. nukleotidjától körülbelül 319. nukleotidjáig terjedő részletét tartalmazza. Egy másik megvalósítási mód szerint B7-4-nukleinsav-molekula az 1. azonosítószámú szekvencia körülbelül 855. nukleotidjától körülbelül 968. nukleotidjáig terjedő részletét tartalmazza. Egy másik megvalósítási mód szerint B7-4-nukleinsav-molekula a 3. azonosítószámú szekvencia körülbelül 1. nukleotidjától körülbelül 314. nukleotidjáig terjedő részletét tartalmazza. Egy másik megvalósítási mód szerint B7-4-nukleinsav-molekula a 3. azonosítószámú szekvencia körülbelül 955. nukleotidjától körülbelül 1285. nukleotidjáig terjedő részletét tartalmazza. Egy másik megvalósítási mód szerint B7-4-nukleinsav-molekula a 3. azonosítószámú szekvencia körülbelül 1535. nukleotidjától körülbelül 1552. nukleotidjáig terjedő részletét tartalmazza.

Más megvalósítási módok szerint a találmány szerinti nukleinsav-molekula legalább 70%-ban azonos, előnyösebben 80%-ban azonos, és még előnyösebben legalább 90%-ban azonos olyan nukleinsav-molekulával, amely az 1. azonosítószámú szekvencia vagy a 3. azonosítószámú szekvencia legalább körülbelül 500, legalább körülbelül 600, legalább körülbelül 700, legalább körülbelül 900, legalább körülbelül 500 vagy legalább körülbelül 1000 összefüggő nukleotidotját tartalmazza.

B7-4- vagy PD-1-nukleotidszekvencián alapuló próbákat alkalmazhatunk ugyanolyan vagy homológ fehérjék transzkriptumainak, vagy genomiális szekvenciáinak detektálására. Előnyös megvalósítási módok szerint a próba tartalmaz jelzőcsoportot is hozzákapcsolva, például a jelzőcsoport lehet radioizotóp, fluoreszcens vegyület, enzim vagy enzim kofaktor. Ilyen próbákat alkalmazhatunk diagnosztikai teszt-reagenskészlet részeként B7-4- vagy PD-1-fehérjét hibásan expresszáló sejtek vagy szövetek azonosítására, mint például B7-4-et vagy PD-1-et kódoló nukleinsav mérésével alanytól származó mintá sejtjeiből, például B7-4- vagy PD-1-mRNS szintek detektálásával vagy annak meghatározásával, hogy genomiális B7-4- vagy PD-1-gén mutált-e vagy deletált-e.

„B7-4- vagy PD-1-fehérje biológiailag aktív részletét” kódoló nukleinsav-fragmentet előállíthatunk az 1., 3., 10. vagy 11. azonosítószámú szekvenciák részletének izolálásával, amely B7-4 vagy PD-1 biológiailag aktivitásával rendelkező polipeptid részletét kódolja (a B7-4- és PD-1-fehérjék biológiailag aktivitását ismertetjük a leírásban), a B7-4- vagy PD-1-fehérje kódolt részletének expresszáltatásával (például *in vitro* rekombináns expresszióval), és a B7-4- vagy PD-1-fehérje kódolt részlete aktivitásának megállapításával.

Az 1., 3., 10. vagy 11. azonosítószámú szekvenciáktól a genetikai kód degeneráltsága miatt eltérő nukleinsav-molekulák, amelyek ezáltal ugyanazt a B7-4- vagy PD-1-fehérjét kódolják, mint az 1., 3., 10. vagy 11. azonosítószámú szekvenciák által kódolt, a találmány tárgykörébe tartoznak. Ennek megfelelően, egy másik megvalósítási mód szerint, a találmány szerinti izolált nukleinsav-molekulának olyan nukleotidszekvenciája van, amely a 2., 4. vagy 12. azonosítószám szerinti aminosav-szekvencián bemutatott fehérjét kódolja. Egy másik megvalósítási mód szerint a találmány szerinti izolált nukleinsav-molekula olyan nukleotidszekvenciája van, amely B7-4- vagy PD-1-fehérjét kódol.

A szakember számára nyilvánvaló, hogy az 1., 3., 10. vagy 11. azonosítószámú szekvenciákon bemutatott B7-4- vagy PD-1-nukleinsav-szekvenciák mellett létezhet a populációban (például az emberi populációban) olyan DNS-szekvencia-polimorfizmus, amely a B7-4- vagy PD-1-fehérjék aminosav-szekvenciájának változásához vezet. Ilyen genetikai polimorfizmus a B7-4- vagy PD-1-génekben természetes allélvariációk miatt létezhet egyedek között egy populációban. A leírás szerinti értelemben a „gén” és „rekombináns gén” kifejezések alatt

olyan nukleinsav-molekulákat értünk, amelyek tartalmazzák az B7-4- vagy PD-1-fehérjét, előnyösen emlős B7-4- vagy PD-1-fehérjét kódoló nyílt leolvasási fázisokat, és továbbá tartalmazhatnak nem kódoló szabályozó szekvenciákat és intronokat is. Ilyen természetes allélvariációk közé tartoznak mind funkcionális, mind nem funkcionális B7-4- vagy PD-1-fehérjék, és tipikusan 1-5% varianciát eredményeznek a B7-4- vagy PD-1-gén nukleotidszekvenciájában. Az ilyen nukleotidvariációkat és az általuk eredményezett aminosav-polimorfizmusokat a B7-4- vagy PD-1-génben, amelyek a természetes allélvariáció eredményei, és nem változtatják meg a B7-4- vagy PD-1-fehérje funkcionális aktivitását, a találmány oltalmi körébe tartozónak tekintjük.

Ezenkívül egyéb B7-4- vagy PD-1-családtagokat kódoló nukleinsav-molekulákat, amelyeknek ezáltal olyan nukleotidszekvenciája van, amely eltér az 1., 3., 10. vagy 11. azonosítószám szerinti B7-4- vagy PD-1-családtag-szekvenciáktól, a találmány oltalmi körébe tartozónak tekintünk. Például másik B7-4- vagy PD-1-cDNS-t azonosíthatunk a humán B7-4 vagy PD-1 nukleotidszekvenciája alapján. Ezenkívül különböző fajokból származó B7-4- vagy PD-1-fehérjét kódoló nukleinsav-molekulákat, amelyeknek ezáltal olyan nukleotidszekvenciája van, amely eltér az 1., 3., 10. vagy 11. azonosítószám szerinti B7-4- vagy PD-1-szekvenciáktól, a találmány oltalmi körébe tartozónak tekintünk. Például egy B7-4- vagy PD-1-cDNS-t azonosíthatunk a humán B7-4- vagy PD-1-molekula nukleotidszekvenciája alapján.

A találmány szerinti B7-4- vagy PD-1-cDNS-ek természetes allélvariánsainak vagy homológjainak megfelelő nukleinsav-molekulákat izolálhatunk azok homológiája alapján a találmány szerinti B7-4- vagy PD-1-nukleinsavakkal a találmány szerinti cDNS-ek vagy azok részletének hibridizációs próbaként történő alkalmazásával, szokásos hibridizációs módszerek szerint. Például B7-4- vagy PD-1-DNS-t izolálhatunk humán genomális DNS-klóntárból az 1., 3., 10. vagy 11. azonosítószámú szekvenciák egészének vagy részletének hibridizációs próbaként történő alkalmazásával és szokásos hibridizációs módszerek alkalmazásával [például ahogy Sambrook, J. és mtsai., „Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, 2. kiadás, kiad.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989) leírják]. Ezenkívül B7-4- vagy PD-1-gén egészét vagy részletét tartalmazó nukleinsav-molekulát izolálhatunk polimeráz-láncreakcióval az 1., 3., 10. vagy 11. azonosítószámú szekvenciák alapján tervezett oligonukleotid-láncindítók alkalmazásával. Például mRNS-t izolálhatunk sejtekből (például a Chirgwin és mtsai. [Biochemistry 18, 5294-5299. old. (1979)] guanidinium-tiocianátos extrakciós eljárásával), és a cDNS-t állíthatunk elő reverz-transzkriptáz (például Moloney MLV reverz-transzkriptáz, beszerezhető a Gibco/BRL cégtől, Bethesda, MD; vagy AMV reverz-transzkriptáz, beszerezhető a Seikagaku America, Inc. Cégtől, St. Petersburg, FL) alkalmazásával. PCR-amplifikációra szolgáló szintetikus oligonukleotid-láncindítókat az 1., 3., 10. vagy 11. azonosítószámú szekvenciákon bemutatott nukleotidszekvenciák alapján tervezhetünk. Találmány szerinti nukleinsav-molekulát amplifikálhatunk templákként cDNS, vagy más megoldásként genomális DNS, és megfelelő oligonukleotid-láncindítók alkalmazásával, szokásos PCR-amplifikációs módszerek szerint. Az így amplifikált nukleinsavat megfelelő vektorba klónozzhatjuk és DNS-szekvencia-elemzéssel jellemezhetjük. Ezenkívül B7-4- vagy PD-1-nukleotidszekvenciának megfelelő oligonukleotidokat szokásos szintetikus módszerek szerint állíthatunk elő, például automatizált DNS-szintetizátor alkalmazásával.

Egy másik megvalósítási mód szerint találmány szerinti izolált nukleinsav-molekula legalább 15, 20, 25, 30 vagy több nukleotid hosszúságú, és sztringens körülmények között hibridizál az 1., 3., 10. vagy 11. azonosítószámú szekvenciát tartalmazó nukleinsav-molekulával. Egy másik megvalósítási mód szerint a nukleinsav-



molekula legalább 30, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550 vagy 600 nukleotid hosszúságú. A leírás szerinti értelemben a „sztringens körülmények között hibridizál” kifejezés alatt azokat a hibridizálási és mosási körülményeket értjük, amelyek között egymással legalább 30%, 40%, 50% vagy 60%-ban homológ nukleinsav-szekvenciák tipikusan hibridizálva maradnak egymáshoz. Előnyösen a körülmények olyanok, hogy egymással legalább körülbelül 70%-ban, előnyösebben legalább körülbelül 80%-ban, még előnyösebben legalább körülbelül 85%-ban vagy 90%-ban homológ szekvenciák tipikusan hibridizálva maradnak egymáshoz. Ilyen sztringens körülmények ismertek a szakember számára, és megtalálhatók a „Current Protocols in Molecular Biology” [6.3.1-6.3.6., kiad.: Wiley & Sons, N.Y. (1989)] című könyvben. Sztringens körülmények egy előnyös, nem korlátozó példája hibridizálás 6X nátrium-klorid/nátrium-citrát (SSC) pufferben körülbelül 45°C-on, majd egy vagy több mosás 0,2X SSC, 0,1% SDS pufferben 50-65°C-on. Előnyösen találmány szerinti izolált nukleinsav-molekula, amely sztringens körülmények között hibridizál az 1., 3., 10. vagy 11. azonosítószámú szekvenciákkal, megfelel egy természetben előforduló nukleinsav-molekulának.

A leírás szerinti értelemben a „természetben előforduló” nukleinsav-molekula kifejezés alatt olyan RNS- vagy DNS-molekulát értünk, amelynek a nukleinsav-szekvenciája előfordul a természetben (azaz természetes fehérjét kódol). A szakember számára nyilvánvaló, hogy az 1., 3., 10. vagy 11. azonosítószámú szekvenciákban bemutatott B7-4- vagy PD-1-nukleinsav-szekvenciák mellett létezik egy populációban olyan DNS-szekvencia-polimorfizmus, amely a B7-4- vagy PD-1-fehérjék kisebb aminosav-szekvenciájának változásához vezet. Ilyen genetikai polimorfizmus a B7-4- vagy PD-1-génekben a természetes allélvariációk miatt létezik egyedek között egy populációban. Ilyen természetes allélvariációk tipikusan 1-2% varianciát eredményeznek a gén nukleotidszekvenciájában. Az ilyen nukleotidvariációk és az általuk eredményezett aminosav-polimorfizmusok a B7-4- vagy PD-1-génben, amelyek a természetes allélvariáció eredményei, és nem változtatják meg a B7-4- vagy PD-1-fehérje funkcionális aktivitását, a találmány oltalmi körébe tartoznak.

B7-4- vagy PD-1-szekvenciák természetben előforduló allélvariációi mellett a szakember számára továbbá nyilvánvaló, hogy kisebb változásokat hozhatunk létre mutációval nukleotidszekvenciában, például az 1., 3., 10. vagy 11. azonosítószámú szekvenciákban, amelyek változásokhoz vezetnek a kódolt fehérje aminosav-szekvenciájában, anélkül, hogy megváltoztatná a B7-4- vagy PD-1-fehérje funkcionális aktivitását. Például „nem esszenciális” aminosav-oldallancok szubsztitúciójához vezető nukleotid-szubsztitúciókat végezhetünk az 1., 3., 10. vagy 11. azonosítószámú szekvenciákban. „Nem esszenciális” aminosav-oldallanc olyan oldalanc, amelyet megváltoztathatunk B7-4- vagy PD-1-fehérje vad típusú nukleinsav-szekvenciájában (például az 1., 3., 10. vagy 11. azonosítószámú szekvenciákban) anélkül, hogy megváltoztatnánk a B7-4- vagy PD-1-molekula funkcionális aktivitását. Előnyösen a B7-4- vagy PD-1-molekulák extracelluláris doménjában lévő oldalancokat nem változtatjuk meg, amelyekről azt találták, hogy szükségesek B7-4 receptorhoz vagy PD-1 természetes ligandumhoz való kötésében (például alanin-szkennelő mutagenézis szkrineléssel vagy egyéb, a szakterületen elismert szkrineléssel azonosítva). B7-4-molekulák esetében szemléltető, nem esszenciális oldalancokat a szakember azonosíthat B7-családtagok (vagy B7-4-családtagok) aminosavainak egymás alá rendezését végrehajtva, és meghatározva a nem konzervált oldalancokat. Ilyen oldalancok, mivel nem konzerváltak, valószínűbb, hogy jobban szubsztituálhatók.

Ennek megfelelően a találmány tárgyát képezik egy további megvalósítási mód szerint olyan B7-4- vagy PD-1-fehérjét kódoló nukleinsav-molekulák, amelyek B7-4- vagy PD-1-aktivitás szempontjából nem essz-

szenciális változásokat tartalmaznak az aminosav-oldalláncokban. Az ilyen B7-4- vagy PD-1-fehérjék eltérnek a 2., 4. vagy 12. azonosítószám szerinti aminosav-szekvenciáktól, és mégis megtartják inherens B7-4-aktivitásukat, vagy a PD-1 esetében, megtartják azon képességüket, hogy B7-4-hez kötődnek. B7-4- vagy PD-1-fehérje nem természetes variánsát kódoló izolált nukleinsav-molekulát létrehozhatunk egy vagy több nukleotid-szubsztitúció, -addíció vagy -deleció beépítésével az 1., 3., 10. vagy 11. azonosítószám szerinti szekvenciákba, ily módon egy vagy több aminosav-szubsztitúciót, -addíciót vagy -deleciót építve be kódolt fehérjébe. Mutációt szokásos módszerekkel építhetünk be az 1., 3., 10. vagy 11. azonosítószám szerinti szekvenciákba, mint például helyspecifikus mutagenézissel és PCR-közvetített mutagenézissel. Előnyösen konzervatív aminosav-szubsztitúciókat hajtunk végre egy vagy több nem esszenciális aminosav-oldalláncban. „Konzervatív aminosav-szubsztitúció” olyan, amelyben az aminosav-oldalláncot hasonló oldalláncú aminosavval helyettesítjük. Hasonló oldalláncú aminosav-oldalláncok családjait definiálták a szakterületen, beleértve bázikus oldalláncokat (például lizin, arginin, hisztidin), savas oldalláncokat (például aszparaginsav, glutaminsav), töltetlen poláros oldalláncokat (például glicin, aszparagin, glutamin, szerin, treonin, tirozin, cisztein), apoláros oldalláncok (például alanin, valin, leucin, izoleucin, prolin, fenilalanin, metionin, triptofán), béta-elágazó oldalláncok (például treonin, valin, izoleucin) és aromás oldalláncok (például tirozin, fenilalanin, triptofán, hisztidin). Tehát B7-4 vagy PD-1 nem esszenciális aminosavát előnyösen egy másikkal helyettesítjük ugyanabból az oldallánc-családból.

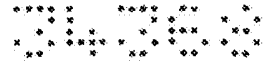
Más megoldásként, egy másik megvalósítási mód szerint random mutációkat építhetünk be B7-4-et vagy PD-1-et kódoló szekvencia egészébe vagy részletébe, mint például telítési mutagenézissel, és a kapott mutánsokat szkrinálhatjuk azon képességükre, hogy kötődnek DNS-hez és/vagy transzkripciót aktiválnak, hogy azonosítsuk azokat a mutánsokat, amelyek megtartották a funkcionális aktivitásukat. A mutagenézist követően a kódolt mutáns B7-4- vagy PD-1-fehérjét rekombináns úton expresszáltathatjuk gazdasejtben, és a mutáns funkcionális aktivitását meghatározhatjuk a szakterületen elérhető B7-4- vagy PD-1-aktivitás megállapítására szolgáló vizsgálati eljárások alkalmazásával.

Ennek megfelelően egy másik megvalósítási mód szerint a találmány tárgyát olyan B7-4- vagy PD-1-fehérjét kódoló nukleinsav-molekulák képezik, amelyek az aktivitás szempontjából nem esszenciális aminosav-oldallánc-változásokat tartalmaznak.

A találmány még egy másik megvalósítási mód szerint a találmány tárgyát B7-4- vagy PD-1-fúziófehérjéket kódoló nukleinsav-molekulák képezik. Ilyen, legalább egy első, B7-4- vagy PD-1-fehérjét, -polipeptidet vagy -peptidet kódoló nukleotidszekvenciát egy második, nem B7-4- vagy PD-1-fehérjét, -polipeptidet vagy -peptidet kódoló nukleotidszekvenciához működőképesen kapcsolva tartalmazó nukleinsav-molekulákat szokásos rekombináns DNS módszerek alkalmazásával állíthatunk elő.

Egy előnyös megvalósítási mód szerint mutáns B7-4-fehérjét vizsgálhatunk arra a képességére, hogy: 1) kostimulálja aktivált immunsejtek proliferációját és/vagy effektor funkcióit (vagy gátolja azok kostimulációját például oldható formában); 2) kötődik anti-B7-család- vagy anti-B7-4-ellenanyaghoz; és/vagy 3) kötődik B7-4 természetes receptorához (receptoraihoz) (például PD-1-hez).

Egy előnyös megvalósítási mód szerint mutáns PD-1-fehérjét vizsgálhatunk arra a képességére, hogy: 1) gátolja aktivált immunsejtek proliferációjának és/vagy effektor funkcióinak kostimulációját (például oldható formában); 2) kötődik anti-PD-1-ellenanyaghoz; és/vagy 3) kötődik PD-1 természetes ligandumához (ligandumaihoz) (például B7-4-hez).



A fent leírt B7-4- vagy PD-1-fehérjéket kódoló nukleinsav-molekulák mellett olyan izolált nukleinsav-molekulákat is alkalmazhatunk moduláló szerekként, amelyek azok antiszenszei. „Antiszensz” nukleinsav olyan nukleotidszekvenciát tartalmaz, amely komplementer fehérjét kódoló „szensz” nukleinsavval, például komplementer kétszálú cDNS-molekula kódoló szálával, vagy komplementer mRNS-szekvenciával. Ennek megfelelően antiszensz nukleinsav-molekula hidrogénhidakkal kötődhet szensz nukleinsav-molekulához. Az antiszensz nukleinsav lehet komplementer az egész B7-4-et vagy PD-1-et kódoló szállal, vagy csak annak egy részével. Egy megvalósítási mód szerint antiszensz nukleinsav-molekula antiszensz B7-4-et vagy PD-1-et kódoló nukleotidszekvencia kódoló szálának „kódoló régiójához”. A „kódoló régió” kifejezés alatt nukleotidszekvencia aminosavakká transzlálódó kodonokat tartalmazó régióját értjük. Egy másik megvalósítási mód szerint antiszensz nukleinsav-molekula antiszensz B7-4-et vagy PD-1-et kódoló nukleotidszekvencia kódoló szálának „nem kódoló régiójához”. A „nem kódoló régió” kifejezés alatt a kódoló régiót szegélyező 5' és 3' szekvenciákat értjük, amelyek nem transzlálódnak aminosavakká (azaz amit 5' és 3' nem transzlálódó régióknak is nevezünk).

A találmány szerint feltárt, B7-4-et vagy PD-1-et kódoló-szál-szekvenciák ismeretében találmány szerinti antiszensz nukleinsavakat tervezhetünk a Watson-Crick bázispárosodási szabályok szerint. Az antiszensz nukleinsav-molekula lehet komplementer a B7-4- vagy PD-1-mRNS teljes kódoló régiójával, de előnyösebben egy oligonukleotid, amely csak a B7-4- vagy PD-1-mRNS kódoló vagy nem kódoló régiójának egy részletéhez antiszensz. Például az antiszensz oligonukleotid komplementer lehet a B7-4- vagy PD-1-mRNS transzlációs starthelyét körülvevő régióval. Antiszensz oligonukleotid lehet például körülbelül 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 vagy 50 nukleotid hosszúságú. Találmány szerinti antiszensz nukleinsavat kémiai szintézis és enzimatisz ligálási reakciók alkalmazásával készíthetünk szakterületen ismert eljárások alkalmazásával. Például antiszensz nukleinsav-molekulát (például antiszensz oligonukleotidot) kémiaiilag szintetizálhatunk természetben előforduló nukleotidok, vagy különféle módon módosított, a molekulák biológiaiilag stabilitásának növelésére, vagy az antiszensz és szensz nukleinsavak között kialakuló duplex fizikai stabilitásának növelésére tervezett nukleotidok alkalmazásával, például foszforotioát-származékokat és akriddinnel szubsztituált nukleotidokat alkalmazhatunk. Antiszensz nukleinsav készítésére alkalmazható módosított nukleotidok például közé tartozik 5-fluorouracil, 5-bromouracil, 5-klorouracil, 5-jodouracil, hipoxantin, xantin, 4-acetilcitozin, 5-(karboxihidroximetil)-uracil, 5-karboximetilaminometil-2-tiouridin, 5-karboximetilaminometiluracil, dihidrouracil, béta-D-galaktozilqueozin, inozin, N6-izopenteniladenin, 1-metilguanin, 1-metilinozin, 2,2-dimetilguanin, 2-metiladenin, 2-metilguanin, 3-metilcitozin, 5-metilcitozin, N6-adenin, 7-metilguanin, 5-metilaminometiluracil, 5-metoxiaminometil-2-tiouracil, béta-D-mannozilqueozin, 5'-metoxikarboximetiluracil, 5-metoxiuracil, 2-metiltio-N6-izopenteniladenin, uracil-5-oxiecetsav (v), wybutoxozin, pszeudouracil, queozin, 2-tiocitozin, 5-metil-2-tiouracil, 2-tiouracil, 4-tiouracil, 5-metiluracil, uracil-5-oxiecetsav-metilészter, uracil-5-oxiecetsav (v), 5-metil-2-tiouracil, 3-(3-amino-3-N-2-karboxipropil)-uracil, (acp3)w és 2,6-diaminopurin. Más megoldásként az antiszensz nukleinsavat biológiaiilag állíthatjuk elő expressziós vektor alkalmazásával, amelybe nukleinsavat szubklónoztunk antiszensz irányított-ságban (azaz az inzertált nukleinsavról átíródó RNS antiszensz irányított-ságú a jelentőséggel bíró célnukleinsavhoz képest, amit a következő alfejezetben írunk le).

A találmány szerinti antiszensz nukleinsav-molekulákat tipikusan beadjuk alanyunk, vagy *in situ* állítjuk elő, oly módon, hogy azok hibridizáljanak vagy kötődjenek sejtbeli B7-4- vagy PD-1-fehérjét kódoló mRNS-hez és/vagy genomiális DNS-hez, és ezáltal gátolják a fehérje expresszióját, például transzkripció és/vagy transzlá-



ció gátlásával. A hibridizáció lehet hagyományos nukleotid-komplementaritás stabil duplexet létrehozva, vagy például DNS-duplexekhez kötődő antiszensz nukleinsav-molekula esetén specifikus kölcsönhatások útján a dupla hélix nagy árkában. Találmány szerinti antiszensz nukleinsav-molekulák beadási útjának példája közvetlen injekciót foglal magába szöveti helyen. Más megoldásként antiszensz nukleinsav-molekulákat módosíthatunk megfelelő sejtek célzására és szisztémásan adhatunk be. Például szisztémás beadás esetén antiszensz molekulákat úgy módosíthatunk, hogy azok specifikusan kötődjenek kiválasztott sejtek felszínén expresszált receptorokhoz vagy antigénekhez, például az antiszensz molekulának sejt felszíni receptorokhoz vagy antigénekhez kötődő peptidokhoz vagy ellenanyagokhoz történő hozzákapcsolásával. Az antiszensz nukleinsav-molekulákat beadhatjuk a sejtekbe találmány szerinti vektorok alkalmazásával is. Az antiszensz nukleinsav-molekulák elégséges intracelluláris koncentrációjának elérésére olyan vektorkonstrukciók előnyösek, amelyekben az antiszensz nukleinsav-molekulát erős pol-II vagy pol-III promóter szabályozása alá helyezzük.

Egy még további megvalósítási mód szerint a találmány szerinti nukleinsav-molekula α -anomer nukleinsav-molekula. Egy α -anomer nukleinsav-molekula specifikus kétszálú hibridet alkot komplementer RNS-sel, amelyben ... ellentétben a szokásos β -egységekkel ... a szálak paralel módon helyezkednek el [Gaultier és mtsai., *Nucleic Acids Res.* 15, 6625-6641. old. (1987)]. Az antiszensz nukleinsav-molekula tartalmazhat 2'-o-metilribonukleotidot is [Inoue és mtsai., *Nucleic Acids Res.* 15, 6131-6148. old. (1987)] vagy kiméra RNS-DNS analógot [Inoue és mtsai., *FEBS Lett.* 215, 327-330. old. (1987)].

Egy még további megvalósítási mód szerint a találmány szerinti antiszensz nukleinsav-molekula ribozim. A ribozimok katalitikus RNS-molekulák ribonukleáz aktivitással, amelyek képesek olyan egyszálú nukleinsav-molekulát, mint például mRNS-t elhasítani, amellyel van komplementer régiójuk. Ezáltal ribozimokat (például kalapácsfej ribozimokat, amelyeket Haseloff és Gerlach [*Nature* 334, 585-591. old. (1988)]) írnak le) alkalmazhatunk B7-4- vagy PD-1-transzkriptumok katalitikus hasítására, és ezáltal B7-4- vagy PD-1-mRNS translációjának gátlására. B7-4-et vagy PD-1-et kódoló nukleinsavra specifikus ribozimot a B7-4- vagy PD-1-cDNS leírás szerint feltárt nukleotidszekvenciája (azaz az 1., 3., 10. vagy 11. azonosítószámú szekvenciák) alapján tervezhetünk. Például *Tetrahymena* L-19 IVS RNS származékát állíthatjuk elő, amelyben az aktív hely nukleotidszekvenciája komplementer a hasítandó B7-4-et vagy PD-1-et kódoló mRNS nukleotidszekvenciával. Lásd például a 4 987 071. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratot (Cech és mtsai.) és az 5 116 742. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratot (Cech és mtsai.). Más megoldásként B7-4- vagy PD-1-mRNS-t alkalmazhatunk specifikus ribonukleáz aktivitású katalitikus RNS kisselektálására RNS-molekulák halmazából. Lásd például Bartel, D. és Szostak, J.W., *Science* 261, 1411-1418. old. (1993).

Más megoldásként B7-4- vagy PD-1-gének expresszióját gátolhatjuk a B7-4 vagy PD-1 szabályozó régiójával (például a B7-4- vagy PD-1-promóter és/vagy enhancerek) komplementer nukleotidszekvenciák célzásával, hogy tripla hélix szerkezeteket hozzunk létre, amelyek megakadályozzák a B7-4- vagy PD-1-gének transzkripcióját a célzott sejtekben. Lásd általánosságban Helene, C., *Anticancer Drug Des.* 6, 569-584. old. (1991); Helene, C. és mtsai., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 660, 27-36. old. (1992); és Maher, L.J., *Bioessays* 14, 807-815. old. (1992).

Egy még további megvalósítási mód szerint a találmány szerinti B7-4- vagy PD-1-nukleinsav-molekulákat módosíthatjuk a bázis-molekularészen, a cukor-molekularészen vagy a foszfát-molekularészen, hogy javítsuk például a molekula stabilitását, hibridizációját vagy oldhatóságát. Például a nukleinsav-molekulák

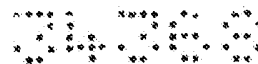


deoxiribóz-foszfát gerincét módosíthatjuk, hogy peptid-nukleinsavakat hozzunk létre [lásd Hyrup, B. és Nielsen, P.E., *Bioorg. Med. Chem.* 4, 5-23. old. (1996)]. A leírás szerinti értelemben a „peptid-nukleinsav” vagy „PNS” kifejezések alatti nukleinsav-mimetikumokat, például DNS-mimetikumokat értünk, amelyekben a deoxiribóz-foszfát gerincet pseudopeptid gerinc helyettesíti, és csak a négy természetes nukleobázis marad meg. A PNS-ek semleges gerincéről kimutatták, hogy lehetővé teszi a specifikus hibridizációt DNS-hez és RNS-hez alacsony ionerősségű körülmények között. PNS-oligomerek szintézisét szokásos szilárdfázisú peptidszintézis protokollok alkalmazásával végezhetjük, amint azt Hyrup és Nielsen (1996, mint fent) és Perry-O’Keefe és mtsai. [*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 14670-14675. old. (1996)] leírják.

A B7-4- vagy PD-1-nukleinsav-molekulák PNS-eit alkalmazhatjuk terápiás és diagnosztikai alkalmazásokban. Például PNS-eket alkalmazhatunk antiszensz vagy anti-gén szerekként génexpresszió szekvenciaspecifikus modulálására, például transzkripció vagy transláció megállításával vagy replikáció gátlásával. A B7-4- vagy PD-1-nukleinsav-molekulák PNS-eit alkalmazhatjuk egy gén egyszeres bázispár-mutációinak elemzésére is (például PNS-irányított PCR-összkötéssel, „PCR-clamping”); mint ‘mesterséges restrikciós enzimet’ amikor más enzimekkel együtt alkalmazzuk (például S1-nukleázokkal, Hyrup és Nielsen, 1996, mint fent); vagy mint próbákat és láncindítókat DNS-szekvenálásra vagy hibridizálásra (Perry-O’Keefe, 1996, mint fent).

Egy másik megvalósítási mód szerint a B7-4- vagy PD-1-nukleinsav-molekulák PNS-eit módosíthatjuk (például stabilitásuk vagy sejtbeli felvételük fokozása), lipofil vagy egyéb segítő csoportoknak PNS-hez történő hozzákapcsolásával, PNS-DNS kimérák kialakításával, vagy liposzómák vagy egyéb, drogbejuttatására a szakterületen ismert módszerek alkalmazásával. Például B7-4- vagy PD-1-nukleinsav-molekulák PNS-DNS kiméráit állíthatjuk elő, amelyek kombinálják a PNS és DNS előnyös tulajdonságait. Ilyen kimérák lehetővé teszik DNS-t felismerő enzimeknek (például RNáz-H-nak és DNS-polimerázoknak), hogy kölcsönhassanak a DNS-résszel, míg a PNS-rész magas kötési affinitást és specifitást biztosít. PNS-DNS kimérákat kapcsolhatunk bázishalmozás („stacking”), nukleobázisok közötti kötések száma és irányítottság alapján kiválasztott megfelelő hosszúságú kapcsolómolekulákkal (Hyrup és Nielsen, 1996, mint fent). PNS-DNS kimérák szintézisét Hyrup és Nielsen (1996, mint fent) és Finn, P.J. és mtsai. [*Nucleic Acids Res.* 24, 3357-3363. old. (1996)] leírása szerint végezhetjük. Például DNS-láncot szintetizálhatunk szilárd hordozón szokásos foszforamidit kapcsolási reakciók alkalmazásával. Módosított nukleozidanalógokat [például 5’-(4-metoxitritil)amino-5’-deoxi-timidin-foszforamiditet] alkalmazhatunk kapcsolómolekulaként a PNS és a DNS 5’-vége között [Mag, M. és mtsai., *Nucleic Acids Res.* 17, 5973-5988. old. (1989)]. A PNS-monomereket azután lépésenként kapcsoljuk 5’ PNS-szegmensű és 3’ DNS-szegmensű kiméra molekula létrehozására (Finn, P.J., 1996, mint fent). Más megoldásként kiméra molekulákat szintetizálhatunk 5’ DNS-szegmessel és 3’ PNS-szegmessel [Petersen, K.H. és mtsai., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 5, 1119-1124. old. (1975)].

Másik megvalósítási módok szerint az oligonukleotid tartalmazhat egyéb hozzákapcsolt csoportokat, mint például peptideket (például gazdasejt-receptorok *in vivo* célzására), vagy sejtmembránokon [lásd például Letsinger és mtsai., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 6553-6556. old. (1989); Lemaitre és mtsai., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 648-652. old. (1987); WO 88/09810. számú nemzetközi közzétételi irat], vagy a vér-agy-gáton (lásd például WO 89/10134. számú nemzetközi közzétételi irat) keresztüli transzport gyorsítására. Ezenfelül oligonukleotidokat módosíthatunk hibridizációval indukált hasítószerekkel [lásd például Krol és mtsai.,



Biotechniques 6, 958-976. old. (1988)] vagy interkalálódó szerekkel [lásd például Zon, Pharm. Res. 5, 539-549. old. (1988)]. Ebből a célból az oligonukleotidot másik molekulához konjugálhatjuk (például peptidhez, hibridizációval indukált keresztkötő szerhez, transzportáló szerhez vagy hibridizációval indukált hasítószerekhez).

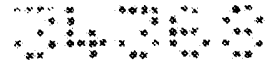
III. Izolált B7-4- vagy PD-1-fehérjék és anti-B7-4- vagy PD-1-ellenanyagok

Ezenfelül izolált B7-4- vagy PD-1-fehérjék, azok biológiai aktív részletei, valamint anti-B7-4- vagy PD-1-ellenanyagok alkalmazhatók moduláló szereként. Egy megvalósítási mód szerint natív B7-4- vagy PD-1-fehérjéket izolálhatunk sejtes vagy szöveti forrásból megfelelő tisztítási sémával, szokásos fehérjetisztítási módszerek alkalmazásával. Egy másik megvalósítási mód szerint B7-4- vagy PD-1-fehérjéket rekombináns DNS módszerekkel állítunk elő. A rekombináns expresszálatás alternatívájaként B7-4- vagy PD-1-fehérjét vagy polipeptidet kémiai úton szintetizálhatunk szokásos peptidszintézis módszerek alkalmazásával.

Egy másik megvalósítási mód szerint a találmány tárgyát izolált B7-4- vagy PD-1-fehérjék képezik. Előnyösen a B7-4- vagy PD-1-fehérjék az 1., 3., 10. vagy 11. azonosítószámú szekvenciát által kódolt aminosav-szekvenciát tartalmaznak. Egy másik előnyös megvalósítási mód szerint a fehérje a 2., 4. vagy 12. azonosítószám szerinti szekvenciát tartalmazza. Másik megvalósítási módok szerint a fehérje aminosav-szekvenciája legalább 50%-ban, legalább 60%-ban, előnyösebben 70%-ban, előnyösebben 80%-ban, és még előnyösebben 90%-ban vagy 95%-ban azonos a 2., 4. vagy 12. azonosítószámú szekvencián bemutatott aminosav-szekvenciával.

Más megvalósítási módok szerint a találmány tárgyát B7-4- vagy PD-1-fehérje izolált részletei képezik. Például a B7-4 fehérjék szignálszekvenciát tartalmaznak, és egy IgV-domént és egy IgC-domént. A 2. azonosítószámú szekvencia szignálszekvenciáját körülbelül az 1. aminosavtól körülbelül a 18. aminosavig mutatjuk be. A 4. azonosítószámú szekvencia szignálszekvenciáját körülbelül az 1. aminosavtól körülbelül a 18. aminosavig mutatjuk be. A 2. azonosítószámú szekvencia IgV-doménját körülbelül az 19. aminosavtól körülbelül a 134. aminosavig mutatjuk be, és a 4. azonosítószámú szekvencia IgV-doménját körülbelül az 19. aminosavtól körülbelül a 134. aminosavig mutatjuk be. A 2. azonosítószámú szekvencia IgC-doménját körülbelül az 135. aminosavtól körülbelül a 227. aminosavig mutatjuk be, és a 4. azonosítószámú szekvencia IgV-doménját körülbelül az 135. aminosavtól körülbelül a 227. aminosavig mutatjuk be. A 2. azonosítószámú szekvencián bemutatott B7-4 hidrofíl farka egy, a körülbelül a 228. aminosavtól körülbelül a 245. aminosavig bemutatott hidrofíl farkat tartalmaz. A 4. azonosítószámú szekvencián bemutatott B7-4 polipeptid egy, a 4. azonosítószámú szekvencia körülbelül a 239. aminosavától körülbelül a 259. aminosaváig bemutatott transzmembrán domént és egy, a 4. azonosítószámú szekvencia körülbelül a 260. aminosavától körülbelül a 290. aminosaváig bemutatott citoplazmatikus domént tartalmaz. A PD-1-polipeptid 288 aminosav hosszúságú, és a doménszerkezete ismert a szakterületen [Shinohara és mtsai., Genomics 23, 704. old. (1994)]. A fehérje megjósolt érett formája körülbelül 268 aminosavat tartalmaz, és extracelluláris doménből (147 aminosav), transzmembrán doménből (27 aminosav), transzmembrán régióból (27 aminosav) és citoplazmatikus doménből (94 aminosav) áll. Négy potenciális N-glikozilációs helyet találtak az extracelluláris doménben (5 698 520. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat). Két cisztein-oldallánc (cys68 és cys123) közötti 68 aminosav-oldallánc hasonlít a V-készletbe tartozó diszulfidon keresztül kötött immunglobulin-doménekhez (5 698 520. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat).

A találmány tárgyát képezik továbbá B7-4- vagy PD-1-fehérjék oldott formái. Ilyen formák lehetnek természetben előfordulók, például amit a 2. azonosítószámú szekvencián bemutatott, vagy mérnöki úton előállí-



tottak és tartalmazhatják például B7-4- vagy PD-1-fehérje extracelluláris doménjét. Szemléltető B7-4 extracelluláris domének a 4. azonosítószámú szekvencia körülbelül 19-238. aminosavait tartalmazzák. Szemléltető PD-1 extracelluláris domének a 12. azonosítószámú szekvencia körülbelül 21-288. aminosavait tartalmazzák.

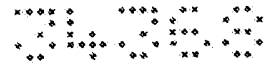
Egy megvalósítási mód szerint B7-4-fehérje extracelluláris doménje B7-4-polipeptid érett formáját tartalmazza, például az IgV- és IgC-domént, de nem a B7-4-polipeptid transzmembrán és citoplazmatikus doménjeit (például a 4. azonosítószámú szekvencia körülbelül a 19. aminosavjától körülbelül 238. aminosavjáig), vagy például a 2. azonosítószámú szekvencia körülbelül a 19. aminosavjától körülbelül 245. aminosavjáig.

Egy megvalósítási mód szerint PD-1-polipeptid extracelluláris doménje PD-1-polipeptid éretti formáját tartalmazza, például az immunglobulin szupercsalád doménjét (például V-készlet szekvenciákat), de nem a PD-1-polipeptid transzmembrán és citoplazmatikus doménjeit (például a 12. azonosítószámú szekvencia körülbelül 21-288. aminosavjai).

B7-4- vagy PD-1-fehérje biológiailag aktív részletei olyan, a B7-4- vagy PD-1-fehérje aminosav-szekvenciájához elegendően homológ vagy abból származó aminosav-szekvenciákat tartalmaznak, amelyek kevesebb aminosavat tartalmaznak, mint a teljes hosszúságú B7-4- vagy PD-1-fehérjék, és legalább B7-4- vagy PD-1-fehérjék legalább egy aktivitását mutatják, előnyösen a természetes kötőpartnerhez való kötés képességét. Tipikusan biológiailag aktív részletek a B7-4- vagy PD-1-fehérje legalább egy aktivitását mutató domént vagy motívumot tartalmaznak. B7-4- vagy PD-1-fehérje biológiailag aktív részlete lehet egy polipeptid, amely például legalább 10, 25, 50, 100, 150, 200 vagy több aminosav hosszúságú.

Két aminosav-szekvencia vagy két nukleinsav-szekvencia százalékos azonosságának meghatározásához a szekvenciákat egymás alá rendezzük optimális összehasonlítás céljára (például réseket illeszthetünk be egy első vagy második aminosav- vagy nukleinsav-szekvencia egyikébe vagy mindkettőbe optimális egymás alá rendezés érdekében, és a nem homológ szekvenciákat figyelmen kívül hagyhatunk az összehasonlítás céljából). Egy előnyös megvalósítási mód szerint az összehasonlítás céljából egymás alá rendezett referenciaszekvencia legalább 30%-a, előnyösen legalább 40%-a, előnyösebben legalább 50%-a, még előnyösebben legalább 60%-a, és még előnyösebben legalább 70%-a, 80%-a vagy 90%-a a referenciaszekvencia hosszúságának. Az egymásnak megfelelő pozíciókban lévő oldalláncokat azután összehasonlítjuk, és amikor az egyik szekvencia egy pozícióját ugyanaz az oldallánc foglalja el, mint a megfelelő pozíciót a másik szekvenciában, akkor a molekulák azonosak ebben a pozícióban. A százalékos azonosság két szekvencia között tehát a két szekvencia közötti azonos pozíciók száma (azaz %-os azonosság = azonos pozíciók száma / pozíciók száma * 100). Két szekvencia közötti százalékos azonosság a két szekvencia közötti azonos pozíciók számának függvénye, figyelembe véve a rések számát, az egyes rések hosszát, amelyeket be kell iktatni a szekvenciába a két szekvencia optimális egymás alá rendezéséhez. A leírás szerinti értelemben az aminosavak vagy nukleinsavak „azonossága” kifejezés ekvivalens az aminosav vagy nukleinsav „homológiával”.

Szekvenciák összehasonlítását és két szekvencia közötti százalékos azonosság megállapítását matematikai algoritmusok alkalmazásával érhetjük el. Egy előnyös megvalósítási mód szerint két aminosav-szekvencia közötti százalékos azonosságot a GCG szoftvercsomagban lévő GAP programmal határozzuk meg (<http://www.gcg.com>), akár a Blosum62 mátrix, akár PAM250 mátrix, és 16, 14, 12, 10, 8, 6 vagy 4 rés súlyozá-



si érték, és 1, 2, 3, 4, 5 vagy 6 hossz súlyozási érték alkalmazásával. Egy még további előnyös megvalósítási mód szerint két nukleotidszekvencia közötti százalékos azonosságot a GCG szoftvercsomagban lévő GAP programmal határozzuk meg (<http://www.gcg.com>) az NWSgapdna.CMP mátrix és 40, 50, 60, 70 vagy 80 rés súlyozási érték, és 1, 2, 3, 4, 5 vagy 6 hossz súlyozási érték alkalmazásával.

A találmány szerinti nukleinsav- és aminosav-szekvenciákat továbbá „keresőszekvenciaként” alkalmazhatjuk nyilvános adatházisok keresésének végrehajtására, például más családtagok vagy rokon szekvenciák azonosítására. Ilyen kereséseket Altschul és mtsai. [J. Mol. Biol. 215, 403-410. old. (1990)] NBLAST és XBLAST programjaival (2.0-ás verzió) hajthatunk végre. BLAST nukleotidkereséseket az NBLAST programmal hajthatunk végre (pontérték=100, szóhossz=12), hogy találmány szerinti B7-4- vagy PD-1-nukleinsav-molekulákkal homológ nukleotidszekvenciákat kapjunk. BLAST fehérjekereséseket az XBLAST programmal hajthatunk végre (pontérték=50, szóhossz=3), hogy találmány szerinti B7-4- vagy PD-1-fehérje-molekulákkal homológ aminosav-szekvenciákat kapjunk. Ahhoz, hogy összehasonlítási célokra részeket tartalmazó egymás alá rendezéseket kapjunk, Altschul és mtsai. [Nucleic Acids Res. 25, 3389-3402. old. (1997)] által leírt „Gapped BLAST” algoritmust alkalmazhatunk. Amikor BLAST és Gapped BLAST programokat alkalmazunk, a programok (például BLAST és Gapped BLAST) alapértelmezett paramétereit alkalmazhatjuk. Például a találmány szerinti nukleotidszekvenciákat az alapértelmezett Blastn 1-3 mátrixszal elemeztük, a rés-büntetések 11-es létezési és 1-es kiterjesztési állítottuk be. A találmány szerinti aminosav-szekvenciákat az alapértelmezett beállításokkal elemeztük: Blosum 62 mátrix, a rés-büntetések 11-es létezési és 1-es kiterjesztési állítottuk be. Lásd <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

A találmány tárgyát képezik B7-4 vagy PD-1 kiméra vagy fúziós fehérjék is. A leírás szerinti értelemben a „kiméra fehérje” vagy „fúziós fehérje” B7-4- vagy PD-1-poliipeptidet tartalmaz működőképesen kapcsolva nem B7-4- vagy PD-1-poliipeptidhez. „B7-4- vagy PD-1-poliipeptid” alatt olyan poliipeptidet értünk, amelynek B7-4- vagy PD-1-poliipeptidnek megfelelő aminosav-szekvenciája van, míg „nem B7-4- vagy PD-1-poliipeptid” alatt olyan poliipeptidet értünk, amelynek az aminosav-szekvenciája olyan fehérjének felel meg, amely lényegben nem homológ a B7-4- vagy PD-1-fehérjéével, például olyan fehérje, amely különbözik a B7-4- vagy PD-1-fehérjétől, és amely ugyanabból vagy eltérő organizmusból származik. A B7-4 vagy PD-1 fúziós fehérjében a B7-4- vagy PD-1-poliipeptid B7-4- vagy PD-1-fehérje egészének vagy részletének felelhet meg. Egy előnyös megvalósítási mód szerint B7-4 vagy PD-1 fúziós fehérje B7-4- vagy PD-1-fehérje legalább egy biológiailag aktív részletét tartalmazza, például B7-4- vagy PD-1-fehérje extracelluláris doménjét. A fúziós fehérjében a „működőképesen kapcsol” kifejezés alatt azt jelzi, hogy a B7-4- vagy PD-1-poliipeptid és a nem B7-4- vagy PD-1-poliipeptid fázisban vannak egymáshoz fuzionáltatva. A nem B7-4- vagy PD-1-poliipeptidet a B7-4- vagy PD-1-poliipeptid N-terminálisához vagy C-terminálisához fuzionáltathatjuk.

Például egy megvalósítási mód szerint a fúziós fehérje GST-B7-4 vagy GST-PD-1 fúziós fehérje, amelyben a B7-4- vagy PD-1-szekvenciákat GST-szekvenciák C-terminálisához fuzionáltattuk. Egy másik megvalósítási mód szerint a fúziós fehérje B7-4- vagy PD-1-HA fúziós fehérje, amelyben a B7-4- vagy PD-1-nukleotidszekvenciát egy vektorba inzertáljuk, mint például pCEP4-HA vektorba [Herrscher, R.F. és mtsai., Genes Dev. 9, 3067-3082. old. (1995)] oly módon, hogy a B7-4- vagy PD-1-szekvenciák fázisban legyenek fuzionáltatva influenza hemagglutinin epitópcímekhez. Ilyen fúziós fehérjék gyorsíthatják rekombináns B7-4- vagy PD-1-fehérje tisztítását.



B7-4 vagy PD-1 fúziós fehérjét egy első, B7-4-aktivitású peptidet kódoló nukleotidszekvencia és egy második, az első peptid oldhatóságát, affinitását, stabilitását vagy valenciáját megváltoztató molekulárszék, mint például immunglobulin állandó régióinak megfelelő peptidet kódoló nukleotidszekvencia rekombináns expresszáltatásával állíthatjuk elő. Előnyösen az első polipeptid B7-4-polipeptid egy részlete [például a 4. azonosítószámú szekvencián bemutatott szekvencia 1-238. vagy 19-238. aminosavaiból álló (a szignálszekvencia lehasítása utáni) részlete, amely elégséges aktivált immunsejtek kostimulációjának vagy gátlásának modulációjához]. Egy másik előnyös megvalósítási mód szerint az első polipeptid PD-1-polipeptid egy részlete [például a 12. azonosítószámú szekvencián bemutatott szekvencia 1-288. (vagy a szignálszekvencia lehasítása utáni 21-288.) aminosavaiból álló részlete, amely elégséges aktivált immunsejtek kostimulációjának vagy gátlásának modulációjához]. A második peptid immunglobulin állandó régiót tartalmazhat, például humán C γ 1-domént vagy C γ 4-domént, [például humán IgC γ 1-domén vagy humán IgC γ 4-domén csukló-, CH2- és CH3-régiót], lásd például az 5 116 964.; 5 580 756.; 5 844 095. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratok (Capon és mtsai.) és hasonló, amelyek hivatkozás útján a kitanítás részét képezik]. A kapott fúziós fehérjének megváltozott B7-4- vagy PD-1-oldhatósága, kötési affinitása, stabilitása és/vagy valenciája (azaz rendelkezésre álló kötéshelyek száma molekulánként) lehet, és növelheti a fehérjetisztítás hatékonyságát. Rekombináns módszerekkel előállított fúziós fehérjéket és peptideket szekretálhatunk, és izolálhatunk sejtek és a fehérjét vagy peptidet tartalmazó tápközeg keverékéből. Más megoldásként a fehérjét vagy peptidet citoplazmatikusan tarthatjuk meg, és a sejteket összegyűjthetjük, lizálhatjuk és a fehérjét izolálhatjuk. A sejtenyészetre tipikusan gazdasejteket, tápközegét és egyéb melléktermékeket tartalmaz. Sejtenyészetre alkalmas tápközegek jól ismertek a szakterületen. Fehérjét és peptideket izolálhatunk sejtenyészeti tápközegéből, gazdasejtekből vagy mindkettőből, a szakterületen fehérjék és peptidek tisztítására szolgáló ismert módszerekkel. Gazdasejtek transzfektálására és fehérjék és peptidek tisztítására szolgáló módszerek ismertek a szakterületen.

Különösen előnyös B7-4 vagy PD-1 fúziós fehérjék humán B7-4 vagy PD-1 extracelluláris doménját vagy immunglobulin változórégió-szerű doménját tartalmazzák, immunglobulin állandó régióhoz (például Fc-régióhoz) kapcsolva. Az immunglobulin állandó régió olyan genetikai módosításokat tartalmazhat, amelyek csökkentik vagy eliminálják az immunglobulin szerkezetének inherens effektor aktivitásait. Például B7-4- vagy PD-1-polipeptid extracelluláris részletét kódoló DNS-t kapcsolhatunk a WO 97/28267. számú nemzetközi közlési irat kitanítása szerint helyspecifikus mutagenézissel módosított humán C γ 1-domén és/vagy C γ 4-domén csukló-, CH2- és CH3-régiót kódoló DNS-hez.

Előnyösen találmány szerinti B7-4 vagy PD-1 fúziós fehérjét szokásos rekombináns DNS módszerekkel állíthatunk elő. Például különböző polipeptid-szekvenciákat kódoló DNS-fragmenseket ligálunk egymáshoz fázisban hagyományos módszerek szerint, például tompa vagy ragadós végeket alkalmazva ligálásra, alkalmas módon ragadós végek betöltésével, alkalikus foszfatáz kezeléssel a nemkívánatos kapcsolódás elkerülésére, és enzimikus ligálással. Egy másik megvalósítási mód szerint a fúziós gént hagyományos módszerekkel szintetizálhatjuk meg, beleértve automatizált DNS-szintetizátorokat. Más megoldásként génfragmensek PCR-amplifikációját hajthatjuk végre két egymást követő génfragmens közötti túlnyúlásokat eredményező horgonyzó láncindítók alkalmazásával, amelyeket azt követően anneálhatunk és újra amplifikálhatunk kiméra génszekvencia előállítására [lásd például „Current Protocols in Molecular Biology”, szerk.: Ausubel és mtsai., kiad.: John Wiley & Sons (1992)]. Ezenkívül sok expressziós vektor kereskedelmi forgalomban kapható, ame-

lyek már eleve tartalmazzák fúziós molekularészt (például GST-poliipeptidet vagy HA-epitóp-címkét). B7-4-et vagy PD-1-et kódoló nukleinsavat klónozzhatunk ilyen expressziós vektorba oly módon, hogy a fúziós molekularész fázisban legyen kapcsolva a B7-4- vagy PD-1 fehérjéhez.

Egy másik megvalósítási mód szerint a fúziós fehérje egy B7-4- vagy PD-1-fehérje, amely heterológ szignálszekvenciát tartalmaz az N-terminálisán. Bizonyos gazdaszövetekben (például emlős gazdaszövetekben) B7-4 vagy PD-1 expresszióját és/vagy szekrécióját növelhetjük heterológ szignálszekvencia alkalmazásával.

A találmány szerinti B7-4 vagy PD-1 fúziós fehérjéket gyógyászati készítményekbe építhetjük be és alanyban beadhatjuk *in vivo*. B7-4 vagy PD-1 fúziós fehérjék alkalmazása terápiásan hasznos immunológiai rendellenességek, például autoimmun betegségek kezelésére, vagy transzplantátumok kilökődésének gátlása esetén. Ezenkívül a találmány szerinti B7-4 vagy PD-1 fúziós fehérjéket immunogénként alkalmazhatjuk anti-B7-4- vagy PD-1-ellenanyagok előállítására alanyban, B7-4 vagy PD-1 tisztítására, és szkrinelési vizsgálati eljárásokban olyan molekulák azonosítására, amelyek gátolják B7-4 kölcsönhatását B7-4-receptorral, például PD-1-gyel.

Előnyösen találmány szerinti B7-4 vagy PD-1 kiméra vagy fúziós fehérjét szokásos rekombináns DNS módszerekkel állítjuk elő. Például a különböző polipeptid-szekvenciákat kódoló DNS-fragmenseket fázisban összeligáljuk hagyományos módszerek szerint, például tompa vagy ragadós végeket alkalmazva ligálásra, megfelelő végeket adó restrikciós enzimmel emésztve, alkalmas módon ragadós végek betöltésével, alkalikus foszfatáz kezeléssel a nemkívánatos kapcsolódás elkerülésére, és enzimátikus ligálással. Egy másik megvalósítási mód szerint a fúziós gént hagyományos módszerekkel szintetizálhatjuk meg, beleértve automatizált DNS-szintetizátorokat. Más megoldásként génfragmensek PCR-amplifikációját hajthatjuk végre két egymást követő génfragmens közötti komplementer túlnyúlásokat eredményező horgonyzó láncindítók alkalmazásával, amelyeket azt követően anneálhatunk és újra amplifikálhatunk kiméra génszekvencia előállítására [lásd például „Current Protocols in Molecular Biology”, szerk.: Ausubel és mtsai., kiad.: John Wiley & Sons (1992)]. Ezenkívül sok expressziós vektor kereskedelmi forgalomban kapható, amelyek már eleve tartalmazzák fúziós molekularészt (például GST-poliipeptidet). B7-4-et vagy PD-1-et kódoló nukleinsavat klónozzhatunk ilyen expressziós vektorba oly módon, hogy a fúziós molekularész fázisban legyen kapcsolva a B7-4- vagy PD-1 fehérjéhez.

A találmány tárgyát képezik a B7-4- vagy PD-1-fehérjék olyan variánsai, amelyek akár B7-4- vagy PD-1-agonistaként (mimetikumként), akár B7-4- vagy PD-1-antagonistaként működnek. A B7-4- vagy PD-1-fehérjék variánsait mutagenézissel állíthatjuk elő, például B7-4- vagy PD-1-fehérje különálló pontmutációjával vagy csonkolásával. A B7-4- vagy PD-1-fehérjék agonistája megtarthatja a természetben előforduló B7-4- vagy PD-1-fehérje biológiai aktivitásának lényegében az egészét vagy egy alhalmazát. B7-4- vagy PD-1-fehérje antagonistája természetben előforduló B7-4- vagy PD-1-fehérje egy vagy több aktivitását gátolhatja, például kompetitíven modulálva B7-4- vagy PD-1-fehérje sejtes aktivitását. Ezáltal specifikus biológiai hatásokat válthatunk ki korlátozott funkciójú variánssal történő kezeléssel. Egy megvalósítási mód szerint alanyban a fehérje természetben előforduló formájának biológiai aktivitásainak alkalmazásával rendelkező variánssal történő kezelésnek kevesebb mellékhatása van az alanyban a B7-4- vagy PD-1-fehérje természetben előforduló formájával történő kezeléshez viszonyítva.

Egy megvalósítási mód szerint B7-4- vagy PD-1-fehérje olyan variánsait, amelyek akár B7-4- vagy PD-1-agonistaként (mimetikumként), akár B7-4- vagy PD-1-antagonistaként működnek, B7-4- vagy PD-1-fehérje mutánsainak, például csonkolt mutánsainak kombinatorikus könyvtárainak B7-4- vagy PD-1-fehérje agonista



vagy antagonista aktivitásra való szkrinelésével azonosíthatjuk. Egy megvalósítási mód szerint B7-4- vagy PD-1-variánsok változatos könyvtárát kombinatorikus mutagenézissel állítjuk elő nukleinsav szinten, és változatos génkönyvtár kódolja. B7-4- vagy PD-1-variánsok változatos könyvtárát például szintetikus oligonukleotidok keverékének génszekvenciákba történő enzimatis ligálásával állíthatjuk elő, oly módon, hogy potenciális B7-4- vagy PD-1-szekvenciák degenerált készlete egyedi polipeptidként expresszáltatható, vagy más megoldásként (például fágprezentációra szolgáló) nagyobb fúziós fehérjék készleteként, amelyek tartalmazzák a B7-4- vagy PD-1-szekvenciákat. Eljárások számos változata létezik, amelyet alkalmazhatunk potenciális B7-4- vagy PD-1-variánsok könyvtárainak előállítására degenerált oligonukleotid-szekvenciából. Degenerált génszekvencia kémiai szintézisét automatizált DNS-szintetizátorban végezhetjük, és a szintetikus gént azután alkalmas expressziós vektorba ligálhatjuk. Gének degenerált készletének alkalmazása lehetővé teszi a potenciális B7-4- vagy PD-1-szekvenciák kívánt halmazát kódoló összes szekvencia egy elegyben történő biztosítását. Eljárások degenerált oligonukleotidok szintetizálására ismertek a szakterületen [lásd például Narang, S.A. és mtsai., *Tetrahedron* 39, 3. old. (1983); Itakura és mtsai., *Annu. Rev. Biochem.* 53, 323. old. (1984); Itakura és mtsai., *Science* 198, 1056. old. (1984); Ike és mtsai., *Nucleic Acid Res.* 11, 477. old. (1983)].

Ezenfelül B7-4- vagy PD-1-fehérje kódoló szekvenciájának fragmenseit tartalmazó könyvtárakat alkalmazhatunk B7-4- vagy PD-1-fragmensek változatos populációjának előállítására B7-4 vagy PD-1 variánsainak szkrinelésére és későbbi szelektálására. Egy megvalósítási mód szerint kódoló szekvencia fragmenseinek könyvtárát B7-4 vagy PD-1 kódoló szekvencia kétszálú PCR-fragmensének nukleázzal olyan körülmények között történő kezelésével állíthatjuk elő, amelyben molekulánként körülbelül csak egyszer történik behasítás („nick”), majd a kétszálú DNS denaturálásával, DNS renaturálásával kétszálú DNS létrehozására, amely szensz/antiszensz párokat tartalmazhat különböző behasított termékekből, egyszálú részletek eltávolításával a újra kialakult duplexekből S1-nukleázzal történő kezeléssel, és a kapott fragmens-könyvtár expressziós vektorba történő ligálásával. Ezzel az eljárással olyan expressziós könyvtárát állíthatunk elő, amely a B7-4- vagy PD-1-fehérje különböző méretű N-terminális, C-terminális és belső fragmenseit kódolja.

Számos módszer ismert a szakterületen pontmutációval vagy csonkolással készített kombinatorikus könyvtárak géntermékeinek szkrinelésére, és cDNS-könyvtárak szkrinelésére kiválasztott tulajdonságú géntermékekre. Az ilyen módszerek adaptálhatók B7-4- vagy PD-1-fehérjék kombinatorikus mutagenézisével előállított génkönyvtárak gyors szkrinelésére. A legszélesebb körben alkalmazott, nagy génkönyvtárak szkrinelésére szolgáló módszerek, amelyek alkalmasak nagy teljesítményű elemzésre, tipikusan a génkönyvtár replikálható expressziós vektorokba történő klónozását foglalják magukba, megfelelő sejtek transzformálását a vektorok kapott könyvtárával, és a kombinatorikus gének expresszáltásával olyan körülmények között, amelyben kívánt aktivitás detektálása elősegíti azon gént kódoló vektor izolálását, amelynek a termékét detektáltuk. A rekurzív együttes mutációt (REM) - egy új módszer, amely fokozza a működőképes mutánsok gyakoriságát a könyvtárakban - alkalmazhatunk a szkrináló vizsgálati eljárásokkal együtt B7-4- vagy PD-1-variánsok azonosítására [Arkin és Youvan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 7811-7815. old. (1992); Delagrave és mtsai., *Protein Eng.* 6, 327-331. old. (1993)].

Egy megvalósítási mód szerint sejtalapú vizsgálati eljárásokat alkalmazhatunk változatos B7-4- vagy PD-1-könyvtár elemzésére. Például expressziós vektorok könyvtárát transzfektálhatjuk olyan sejtvonalba, amelyre rendszeres körülmények között B7-4-et vagy PD-1-et szintetizál és szekretál. A transzfektált sejteket azután

tenyésztjük oly módon, hogy B7-4 vagy PD-1, és B7-4 vagy PD-1 adott mutánsa szekretálódik, és a mutánsnak a B7-4- vagy PD-1-aktivitásra gyakorolt hatását detektálhatjuk a sejt-felülszókban, például számos vizsgálati eljárás bármelyikével. A plazmid-DNS-t azután visszanyerhetjük azon sejtekből, amelyek eredményesek B7-4- vagy PD-1-aktivitás gátlásra, vagy más megoldásként fokozására, és az egyedí klónokat tovább jellemezzük.

A csak természetben előforduló aminosavakat tartalmazó B7-4- vagy PD-1-polipeptidek mellett B7-4- vagy PD-1-peptidomimetikumok is a találmány tárgyát képezik. Peptidanalógokat általánosan alkalmaznak a gyógyszeriparban a templát peptiddel analóg tulajdonságú nempeptid-drogokként. Nem peptid vegyületek ezen típusait „peptidmimetikumnak” vagy peptidomimetikumnak” nevezik [Fauchere, J. és mtsai., *Adv. Drug Res.* 15, 29. old. (1986); Veber és Freidinger, *TINS*, 392. old. (1985); és Evans és mtsai., *J. Med. Chem.* 30, 1229. old. (1987), amelyek hivatkozás útján a kitanítás részét képezik], és általában számítógépes modellezés segítségével fejlesztik ki azokat. Terápiásan hasznos peptidekhez szerkezetileg hasonló peptidmimetikumokat alkalmazhatunk ekvivalens terápiás vagy profilaktikus hatás előállítására. Általában a peptidomimetikumok szerkezetileg hasonlóak paradigma-polipeptidhez (azaz olyan polipeptidhez, amelynek biológiai vagy farmakológiai aktivitása van), mint például humán B7-hez 4- vagy PD-1-hez, de amelyben egy vagy több peptidkötés adott esetben az alábbi kötések bármelyikével van helyettesítve: $-\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{S}-$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}=\text{CH}-$ (cisz és transz), $-\text{COCH}_2-$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ vagy $-\text{CH}_2\text{SO}-$, a szakterületen ismert eljárásokkal, amelyek az alábbi irodalmi helyeken vannak továbbá leírva: Spatola, A.F., „Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins”, 267. old., szerk.: Weinstein, B., kiad.: Marcel Dekker, New York (1983); Spatola, A.F., *Vega Data* (1983. március), 1. kötet, 3. szám, „Peptide Backbone Modifications” (általános összefoglaló); Morley, J.S., *Trends Pharm. Sci.*, 463-468. old. (1980) (általános összefoglaló); Hudson, D. és mtsai., *Int. J. Pept. Prot. Res.* 14, 177-185. old. (1979) ($-\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$); Spatola, A.F. és mtsai., *Life Sci.* 38, 1243-1249. old. (1986) ($-\text{CH}_2-\text{S}-$); Hann, M.M., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 307-314. old. (1982) ($-\text{CH}-\text{CH}-$, cisz és transz); Almquist, R.G. és mtsai., *J. Med. Chem.* 23, 1392-1398. old. (1980) ($-\text{COCH}_2-$); Jennings-White, C. és mtsai., *Tetrahedron Lett.* 23, 2533. old. (1982) ($-\text{COCH}_2-$); Szelke, M. és mtsai., 45665. számú európai szabadalmi bejelentés (1982) 97:39405. számú kanadai szabadalmi bejelentés (1982) [$-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$]; Holladay, M.W. és mtsai., *Tetrahedron Lett.* 24, 4401-4404. old. (1983) [$-\text{C}(\text{OH})\text{CH}_2-$]; és Hruby, V.J., *Life Sci.* 31, 189-199. old. (1982) ($-\text{CH}_2-\text{S}-$); amelyek mindegyike hivatkozás útján a kitanítás részét képezi. Egy különösen előnyös nem peptid kötés a $-\text{CH}_2\text{NH}-$. Ilyen peptidmimetikumoknak szignifikáns előnyei lehetnek a polipeptid megvalósítási módokkal szemben, beleértve például: gazdaságosabb előállítás, nagyobb kémiai stabilitás, javított farmakológia tulajdonságok (féléletidő, abszorpció, hatás, hatékonyság, stb.), megváltozott specifitás (például széles spektrumú biológiai aktivitások), csökkent antigenitás, és mások. Peptidomimetikumok jelölése általában magában foglalja egy vagy több jel kovalens kapcsolását, közvetlenül vagy kapcsolómolekulán keresztül (például amidcsoporton keresztül), a peptidomimetikum nem zavaró pozíciójához (pozícióihoz), amely(ek)et kvantitatív szerkezet-aktivitás adatokkal és/vagy molekuláris modellezéssel jósolunk meg. Ilyen nem zavaró pozíciók általában olyan pozíciók, amelyek nem alkotnak közvetlen kapcsolatot a makromolekulával (makromolekulákkal), amely(ek)hez a peptidomimetikum kötődik a terápiás hatás létrehozására. A peptidomimetikumok származtatása (például jelölése) nem zavarhatja lényegesen a peptidomimetikum kívánt biológiai vagy farmakológiai aktivitásával.

B7-4- vagy PD-1-aminosav-szekvencia egy vagy több aminosavának azonos típusú D-aminosavval (például D-lizin L-lizin helyett) történő szisztematikus szubsztitúcióját alkalmazhatjuk stabilabb peptidek létre-



hozására. Ezenfelül B7-4- vagy PD-1-aminosav-szekvenciát vagy lényegében azonos szekvenciavariációt tartalmazó, mozgásában gátolt peptideket létrehozhatunk a szakterületen ismert eljárásokkal [Rizo és Gierasch, Annu. Rev. Biochem. 61, 387. old. (1992), amely hivatkozás útján a kitanítás részét képezi]; például intramolekuláris diszulfid-hidakat alkotni képes belső cisztein-oidallancok hozzáadásával, amelyek ciklizálják a peptidet.

A B7-4- vagy PD-1-poliipeptidek találmány szerint feltárt aminosav-szekvenciái lehetővé teszik a szakember számára, hogy B7-4-peptidszekvenicák és azok szekvenciavariánsainak megfelelő poliipeptideket állítson elő. Ilyen poliipeptideket prokarióta vagy eukarióta gazdasejtekben állíthatunk elő B7-4- vagy PD-1-peptidszekvenciát kódoló polinukleotidok expresszáltatásával, gyakran egy nagyobb poliipeptid részeként. Más megoldásként ilyen peptideket kémiai eljárásokkal szintetizálhatunk. Heterológ fehérjék rekombináns gazdáiban történő expresszáltatására, poliipeptidek kémiai szintézisére és *in vitro* transzlációra szolgáló eljárások jól ismertek a szakterületen, és amelyek az alábbi hivatkozásokban vannak továbbá leírva: Maniatis és mtsai., „Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, 2. kiadás, kiad.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989); Berger és Kimmel, Methods in Enzymology 152. kötet, „Guide to Molecular Cloning Techniques”, kiad. Academic Press, Inc. San Diego, CA (1987); Merrifield J., J. Am. Chem. Soc. 91, 501. old. (1969); Chaiken, I.M., CRC Crit. Rev. Biochem. 11, 255. old. (1981); Kaiser és mtsai., Science 243, 187. old. (1989); Merrifield, B., Science 232, 342. old. (1986); Kent, S.B.H., Annu. Rev. Biochem. 57, 957. old. (1988); és Offord, R.E., „Semisynthetic Proteins”, kiad.: Wiley Publishing (1980), amelyek mindegyike hivatkozás útján a kitanítás részét képezi.

Peptideket tipikusan közvetlen szintézissel állíthatunk elő, és alkalmazhatjuk azokat például B7-4/PD-1 kölcsönhatás agonistájaként vagy antagonistájaként. Peptideket módosított peptidekként állíthatunk elő, nempeptid molekulárisrészekkel az N-terminális és/vagy C-terminális kovalens kötéssel kapcsolva. Bizonyos előnyös megvalósítási módok szerint akár a karboxil-terminált, akár az amino-terminált, vagy mindkettőt módosítjuk kémiai úton. A terminális amino- és karboxil-csoportok leggyakoribb módosításai sorrendben az acetilálás és amidálás. Az amino-terminális módosítások, mint például acilálás (például acetilálás) vagy alkilálás (például metilálás), és karboxil-terminális módosítások, mint például amidálás, valamint egyéb terminális módosítások, beleértve a ciklizációt, belefoglalhatók a találmány különféle megvalósítási módjaiba. Bizonyos amino-terminális és/vagy karboxil-terminális módosítások és/vagy a mag szekvencia peptid-meghosszabbításai előnyös fizikai, kémiai, biokémiai, és farmakológiai tulajdonságokat biztosíthatnak, mint például: fokozott stabilitás, megnövelt hatás és/vagy hatékonyság, szérum-proteázok elleni rezisztencia, kívánatos farmakokinetikai tulajdonságok, és mások. Peptideket terápiásan alkalmazhatunk betegség kezelésére, például kostimuláció megvalósításával páciensben.

Izolált B7-4- vagy PD-1-fehérje, vagy annak részlete vagy fragmense (vagy ilyen poliipeptidet kódoló nukleinsav) alkalmazható immunogénként B7-4-hez vagy PD-1-hez kötődő ellenanyagok előállítására, poliklonális és monoklonális ellenanyagok előállítására szokásos módszerek alkalmazásával. Teljes hosszúságú B7-4- vagy PD-1-fehérjét alkalmazhatunk, vagy más megoldásként a találmány tárgyát képezik B7-4 vagy PD-1 antigenikus fragmensei immunogénként történő alkalmazásra. A B7-4 vagy PD-1 antigenikus peptidje legalább 8 aminosav-oidallancot tartalmaz, és B7-4- vagy PD-1-epitópját tartalmazza oly módon, hogy a peptid ellen termeltetett ellenanyag specifikus immunkomplexet alkot B7-4-gyel vagy PD-1-gyel. Előnyösen az antigenikus

peptid legalább 10 aminosav-oldalláncot, előnyösebben legalább 15 aminosav-oldalláncot, még előnyösebben legalább 20 aminosav-oldalláncot, és legelőnyösebben legalább 30 aminosav-oldalláncot tartalmaz.

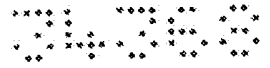
Más megoldásként B7-4- vagy PD-1-poliipeptid antigenikus peptidfragensét alkalmazhatjuk immunogénként. B7-4 vagy PD-1 antigenikus peptidfragensé legalább 8 aminosav-oldalláncot tartalmaz a 2., 4. vagy 12. azonosítószámú szekvencián bemutatott aminosav-szekvenviából, és B7-4- vagy PD-1-epitópját tartalmazza oly módon, hogy a peptid ellen tennetett ellenanyag immunkomplexet alkot B7-4-geyel vagy PD-1-geyel. Az antigenikus peptid által tartalmazott előnyös epitópok B7-4 vagy PD-1 olyan régiói, amelyek a fehérje felszínén helyezkednek el, például hidofil régiók. Egy megvalósítási mód szerint ellenanyag lényegében specifikusan kötődik B7-4- vagy PD-1-molekulához. Egy másik megvalósítási mód szerint ellenanyag specifikusan kötődik B7-4- vagy PD-1-poliipeptidhez.

Előnyösen az antigénhatású peptid legalább 10 aminosav-oldalláncot, előnyösebben legalább 15 aminosav-oldalláncot, még előnyösebben legalább 20 aminosav-oldalláncot, és legelőnyösebben legalább 30 aminosav-oldalláncot tartalmaz. Az antigenikus peptid által tartalmazott előnyös epitópok B7-4 vagy PD-1 olyan régiói, amelyek a fehérje felszínén helyezkednek el, például hidofil régiók, és amelyek egyediek a B7-4- vagy PD-1-poliipeptid tekintetében. Egy megvalósítási mód szerint az ilyen epitópok specifikusak lehetnek egy fajból, mint például egérből vagy emberből származó B7-4- vagy PD-1-fehérjékre (azaz olyan antigenikus peptidet alkalmazunk immunogénként, amely átíveli B7-4- vagy PD-1-poliipeptid olyan régióját, amely nem konzervált a fajok között; ilyen nem konzervált oldalláncokat egymás alá rendezéssel határozhatunk meg, mint például amit a leírás szerinti megadtunk). Elvégezhetjük a B7-4- vagy PD-1-fehérje szokásos hidrofóbítási elemzését hidofil régiók azonosítására.

B7-4- vagy PD-1-immunogént tipikusan ellenanyagok előállítására alkalmazunk, alkalmas alanyrak (például nyúl, kecske, egér vagy egyéb emlős) az immunogénnel történő immunizálásával. Alkalmas immunogén készítmény tartalmazhat például rekombináns úton expresszálatott B7-4- vagy PD-1-fehérjét vagy kémiai úton szintetizált B7-4- vagy PD-1-peptidet. A készítmény tartalmazhat továbbá adjuvánst, mint például Freund-féle komplett vagy inkomplett adjuvánst, vagy hasonló immunstimuláns szert. Alkalmas alany immunizálása immunogénikus B7-4- vagy PD-1-készítménnyel poliklonális anti-B7-4- vagy PD-1-ellenanyag választ indukál.

Egy másik megvalósítási mód szerint nukleinsav-oltóanyagokat különféle utakon adhatunk be, például injekcióval (például intramuszkuláris, intradermális vagy DNS-sel bevont aranyrészecskék biológikus injekciójával az epidermiszbe gényágyúval, amely részecskégyorsítót vagy sűrített gázt alkalmaz a részecskék bőrbe juttatására [Hayness és mtsai., J. Biotechnol. 44, 37. old. (1996.)]). Más megoldásként nukleinsav-oltóanyagokat nem invazív úton adhatunk be. Például tiszta vagy lipiddel kiserelt DNS-t juttathatunk be a légúti rendszerbe, vagy azt máshová célozhatjuk, például Peyer-féle plakkokba a DNS orális bejuttatásával [Schubbert, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 961. old. (1997)]. Legyengített mikroorganizmusokat alkalmazhatunk nyálkahártyafelszínre történő beadásra [Sizemore és mtsai., Science 270, 29. old. (1995)].

Poliklonális B7-4- vagy PD-1-ellenanyagot a fentiek szerint állíthatunk elő alkalmas alany B7-4- vagy PD-1-immunogénnel történő immunizálásával. Az anti-B7-4- vagy PD-1-ellenanyag titerét szokásos módszerekkel követhetjük az időben az immunizált alanyban, mint például immobilizált B7-4- vagy PD-1-ellenanyagot alkalmazó enzim immunológia vizsgálati eljárással (ELISA). Adott esetben a B7-4- vagy PD-1-poliipeptid ellen irányuló ellenanyag-molekulákat izolálhatjuk az emlősből (például a vérből), és tovább tisztíthatjuk jól is-



mert módszerekkel, mint például Protein-A kromatográfiával az IgG-frakció előállítására. Megfelelő időpontban az immunizálás után, például amikor az anti-B7-4- vagy PD-1-titer a legmagasabb, ellenanyag-termelő sejteket állíthatunk elő az alanyból, és alkalmazhatjuk azokat monoklonális ellenanyagok előállítására szokásos módszerekkel, mint például az eredetileg Koehler és Milstein [Nature 256, 495-497. old. (1975)] által leírt hibridóma módszerrel [lásd még Brown és mtsai., J. Immunol. 127, 539-546. old. (1981); Brown és mtsai., J. Biol. Chem. 255, 4980-4983. old. (1980); Yeh és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 2927-2931. old. (1976); és Yeh és mtsai., Int. J. Cancer 29, 269-275. old. (1982)], az újabb humán B-sejt-hibridóma módszerrel [Kozbor és mtsai., Immunol. Today 4, 72. old. (1983)], az EBV-hibridóma módszerrel [Cole és mtsai., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, 77-96. old., kiad.: Alan R. Liss, Inc. (1985)] vagy trióma módszerekkel. A monoklonális ellenanyag-hibridómák előállítására szolgáló technológia jól ismert [lásd általában Kenneth, R.H., „Monoclonal Antibodies: A New Dimension In Biological Analyses”, kiad.: Plenum Publishing Corp., New York, New York (1980); Lerner E.A., Yale J. Biol. Med. 54, 387-402. old. (1981); Geffer, M.L. és mtsai., Somatic Cell Genet. 3, 321-236. old. (1977)]. Röviden, egy immortalizált sejtvonalat (tipikusan mielómát) fuzionáltatunk B7-4- vagy PD-1-immunogénnel a fent leírt módon immunizált emlősből származó limfocitákhoz (tipikusan lépsejtekhez), és a kapott hibridómasejtek tenyésztésének a felülűszoját szkrinéljük olyan monoklonális ellenanyagot termelő hibridóma azonosítására, amely kötődik B7-4- vagy PD-1-polipeptidhez, előnyösen specifikusan.

A sok jól ismert, limfociták és immortalizált sejtvonalak fuzionáltatására alkalmazott protokoll bármelyikét alkalmazhatjuk anti-B7-4 vagy PD-1 monoklonális ellenanyagok létrehozására [lásd például Galfre, G. és mtsai., Nature 266, 550-552. old. (1977); Geffer és mtsai., 1977, mint fent; Lerner, 1981, mint fent; Kenneth, 1980, mint fent]. Ezenkívül a szakember számára nyilvánvaló, hogy ilyen eljárásoknak sok variációja létezik, amelyek szintén hasznosak lehetnek. Tipikusan az immortalizált sejtvonal (például mielóma sejtvonalat) ugyanabból az emlős fajból származik, mint a limfociták. Például egér hibridómákat készíthetünk találmány szerinti immunogén készítménnyel immunizált egérből származó limfociták és egér sejtvonal fuzionáltatásával. Előnyös immortalizált sejtvonalak egér mielóma sejtvonalak, amelyek érzékenyek hipoxantint, aminopterint és timidint tartalmazó tápközegre („HAT-tápközeg”). Számos mielóma sejtvonal bármelyikét alkalmazhatjuk fúziós partnerként, szokásos módszerek szerint, például a P3-NS1/1-Ag4-1, P3-x63-Ag8.653 vagy Sp2/O-Ag14 mielóma vonalat. Ezen mielóma sejtvonalak beszerezhetők az „American Type Culture Collection”-től (ATCC, Rockville, MD). Tipikusan a HAT-érzékeny mielóma sejtvonalakat polietilén-glikol (PEG) alkalmazásával fuzionáltatjuk egér lépsejtekhez. A fúzióban kapott hibridómasejteket azután HAT-tápközeg alkalmazásával szelektáljuk, ami elpusztítja a fuzionálatlan vagy rossz hatékonysággal fuzionáltatott mielómasejteket (a fuzionálatlan lépsejtek néhány nap múlva elpusztulnak, mert nincsenek transzformálva). A találmány szerinti monoklonális ellenanyagot termelő hibridómasejteket a hibridómatenyésztet felülűszojának B7-4- vagy PD-1-molekulához kötődő ellenanyagokra történő szkrinélésével detektáljuk, például szokásos ELISA vizsgálati eljárás alkalmazásával.

Monoklonális ellenanyagot szekretáló hibridómák előállításának alternatívájaként monoklonális anti-B7-4- vagy PD-1-ellenanyagot azonosíthatunk és izolálhatunk rekombináás kombinatorikus immunglobulin-könyvtár (például ellenanyag fágprezentációs könyvtár) B7-4-gyel vagy PD-1-gyel történő szkrinélésével, miáltal a könyvtár olyan tagjait izolálhatjuk, amelyek kötődnek B7-4- vagy PD-1-polipeptidhez. Fágprezentációs könyvtárak előállítására és szkrinélésére szolgáló reagenskészletek kereskedelmi forgalomban kaphatók (például



Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, katalógusszám 27-9400-01; és a Stratagene SurfZAP™ Phage Display Kit, katalógusszám 240612). Emellett ellenanyag-prezentációs könyvtárak előállítására és szkrinelésére különösen alkalmas eljárások és reagensek példáit találhatjuk például az alábbi irodalmi helyeken: Ladner és mtsai., 5 223 409. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat; Kang és mtsai., WO 92/18619. számú nemzetközi közzétételi irat; Dower és mtsai., WO 91/17271. számú nemzetközi közzétételi irat; Winter és mtsai., WO 92/20791. számú nemzetközi közzétételi irat; Markland és mtsai., WO 92/15679. számú nemzetközi közzétételi irat; Breitling és mtsai., WO 93/01288. számú nemzetközi közzétételi irat; McCafferty és mtsai., WO 92/01047. számú nemzetközi közzétételi irat; Garrard és mtsai., WO 92/09690. számú nemzetközi közzétételi irat; Ladner és mtsai., WO 90/02809. számú nemzetközi közzétételi irat; Fuchs és mtsai., Biotechnology (NY) 9, 1369-1372. old. (1991); Hay és mtsai., Hum. Antibod. Hybridomas 3, 81-85. old. (1992); Huse és mtsai., Science 246, 1275-1281. old. (1989); Griffiths és mtsai., EMBO J. 12, 725-734. old. (1993); Hawkins és mtsai., J. Mol. Biol. 226, 889-896. old. (1992); Clarkson és mtsai., Nature 352, 624-628. old. (1991); Gram és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 3576-3580. old. (1992); Garrard és mtsai., Biotechnology (NY) 9, 1373-1377. old. (1991); Hoogenboom és mtsai., Nucleic Acids Res. 19, 4133-4137. old. (1991); Barbas és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 7978-7982. old. (1991); és McCafferty és mtsai., Nature 348, 552-554. old. (1990).

Emellett a találmány oltalmi körébe tartoznak rekombináns B7-4- vagy PD-1-ellenanyagok, mint például kiméra és humanizált monoklonális ellenanyagok, amelyek mind humán, mind nem humán részleteket tartalmaznak, és amelyek szokásos rekombináns DNS módszerekkel állíthatók elő. Ilyen kiméra és humanizált monoklonális ellenanyagokat a szakterületen ismert rekombináns DNS módszerekkel állíthatunk elő, például az alábbi irodalmi helyeken leírt eljárások alkalmazásával: Robinson és mtsai., PCT/US86/02269. számú nemzetközi szabadalmi bejelentés; Akira és mtsai., 184 187. számú európai szabadalmi bejelentés; Taniguchi és mtsai., 171 496. számú európai szabadalmi bejelentés; Morrison és mtsai., 173 494. számú európai szabadalmi bejelentés; Neuberger és mtsai., WO 86/01533. számú nemzetközi közzétételi irat; Cabilly és mtsai., 4 816 567. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat; Cabilly és mtsai., 125 023. számú európai szabadalmi bejelentés; Better és mtsai., Science 240, 1041-1043. old. (1988); Liu és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 3439-3443. old. (1987); Liu és mtsai., J. Immunol. 139, 3521-3526. old. (1987); Sun és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 214-218. old. (1987); Nishimura és mtsai., Cancer Res. 47, 999-1005. old. (1987); Wood és mtsai., Nature 314, 446-449. old. (1985); és Shaw és mtsai., J. Natl. Cancer Inst. 80, 1553-1559. old. (1988); Morrison, S.L., Science 229, 1202-1207. old. (1985); Oi és mtsai., Biotechniques 4, 214. old. (1986); Winter, 5 225 539. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat; Jones és mtsai., Nature 321, 552-525. old. (1986); Verhoeyan és mtsai., Science 239, 1534. old. (1988); és Beidler és mtsai., J. Immunol. 141, 4053-4060. old. (1988).

Ezenfelül humanizált ellenanyagokat szokásos protokollok szerint készíthetünk, mint például az 5 565 332. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratban feltártak szerint. Egy másik megvalósítási mód szerint ellenanyag-láncokat vagy specifikus kötőpár tagjait a specifikus kötőpár egyik polipeptid tagját és replikálható geneikus prezentációs csomag komponensét kódoló nukleinsav-molekulákat tartalmazó vektorok és egyetlen kötőpár-tag polipeptid-láncát kódoló nukleinsav-molekulákat tartalmazó vektorok közötti rekombinációval állíthatjuk elő a szakterületen ismert módszerekkel, például amilyeneket az 5 565 332., 5 871 907. vagy 5 733 743. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratok írnak le. Intracelluláris ellenanyagok alkal-

mazása fehérjefunkció gátlására a sejtben szintén ismert a szakterületen [lásd például Carlson, J.R., *Mol. Cell Biol.* 8, 2638-3646. old. (1988); Biocca, S. és mtsai., *EMBO J.* 9, 101-108. old. (1990); Werge, T.M. és mtsai., *FEBS Lett.* 274, 193-198. old. (1990); Carlson, J.R. és mtsai., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 7427-7428. old. (1993); Marasco, W.A. és mtsai., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 7889-7893. old. (1993); Biocca, S. és mtsai., *Biotechnology (NY)* 12, 396-399. old. (1994); Chen, S-Y. és mtsai., *Hum. Gene Ther.* 5, 595-601. old. (1994); Duan és mtsai., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 5075-5079. old. (1994); Chen S-Y. és mtsai., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 5932-5936. old. (1994); Beerli, R.R. és mtsai., *J. Biol. Chem.* 269, 23931-23936. old. (1994); Beerli, R.R. és mtsai., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 204, 666-672. old. (1994); Mhashilkar, A.M. és mtsai., *EMBO J.* 14, 1542-1551. old. (1995); Richardson, J.H. és mtsai., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 3137-3141. old. (1995); Marasco és mtsai., WO 94/02610. számú nemzetközi közzétételi irat; és Duan és mtsai., WO 95/03832. számú nemzetközi közzétételi irat].

Egy megvalósítási mód szerint a találmány szerinti alkalmazásra szolgáló ellenanyag bispecifikus ellenanyag. Bispecifikus ellenanyagnak két különböző antigénre való kötőhelye van egyetlen ellenanyag-molekulán belül. Az antigénkötés lehet egyidejű vagy egymás utáni. A triómák és hibrid hibridómák sejtvonalak két példája, amelyek bispecifikus ellenanyagokat képesek szekretálni. Hibrid hibridóma vagy trióma által termelt bispecifikus ellenanyagok például tárja fel a 4 474 893. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat. Bispecifikus ellenanyagokat előállítottak kémiai úton [Staerz és mtsai., *Nature* 314, 628. old. (1985), és Perez és mtsai., *Nature* 316, 354. old. (1985)] és hibridóma technológiával [Staerz és Bevan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 1453. old. (1986) és Staerz és Bevan, *Immunol. Today* 7, 241. old. (1986)]. Bispecifikus ellenanyagokat tár fel az 5 959 084. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat is. Bispecifikus ellenanyagok fragmenseit tárja fel az 5 798 229. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat.

Bispecifikus szereket hozhatunk létre heterohibridómák készítésével is, különböző ellenanyagokat termelő hibridómák vagy egyéb sejtek fuzionálásával, majd a mindkét ellenanyagot termelő és egybe összeépítő klónok azonosításával. Azokat teljes immunglobulin-láncok vagy részletei, mint például Fab- vagy Fv-szekvenciák kémiai vagy genetikai konjugálásával is előállíthatjuk. Az ellenanyag-komponens kötődhet PD-1-hez vagy B7-4-hez.

Anti-B7-4- vagy PD-1-ellenanyagot (például monoklonális ellenanyagot) alkalmazhatunk B7-4- vagy PD-1-polipeptid izolálására szokásos módszerekkel, mint például affinitási kromatográfiával vagy immunprecipitációval. Anti-B7-4- vagy PD-1-ellenanyagok elősegíthetik természetes B7-4- vagy PD-1-polipeptidek tisztítását sejtekből, és rekombináns úton gazdasejtekben előállított B7-4- vagy PD-1-polipeptidek tisztítását. Ezenkívül anti-B7-4- vagy PD-1-ellenanyagot alkalmazhatunk B7-4- vagy PD-1-fehérje detektálására (például seji lizátumában vagy sejt felülszójában). A detektálását elősegíthetjük az ellenanyagnak detektálható anyaghoz történő kapcsolásával (például fizikai kötésével). Ennek megfelelően egy megvalósítási mód szerint a találmány szerinti anti-B7-4- vagy PD-1-ellenanyagot detektálható anyaggal jelölünk. Detektálható anyagok példái közé tartoznak különféle enzimek, prosztetikus csoportok, fluoreszcens anyagok, lumineszcens anyagok és radioaktív anyagok. Alkalmas enzimek példái közé tartozik a tormaperoxidáz, alkalikus foszfatáz, β -galaktozidáz vagy acetilkolinészteráz; alkalmas prosztetikus csoportok példái közé tartozik sztreptavidin/biotin és avidin/biotin; alkalmas fluoreszcens anyagok példái közé tartozik az umbelliferon, fluorescein, fluorescein-



izotiocianát, rodamin, diklorotriazinilamin-fluoreszcein, danszil-klorid vagy fikoeritrin; lumineszcens anyag például a luminol; és alkalmas radioaktív anyagok például közé tartozik a ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S és ^3H .

A találmány egy még további megvalósítási módjának a tárgyat képezik anti-B7-4- vagy PD-1-ellenanyagok, amelyek az alábbi eljárással állíthatók elő:

(a) állatot immunogén B7-4- vagy PD-1-fehérjével vagy annak a B7-4- vagy PD-1-fehérjére jellemző immunogén részletével immunizálunk; és

(b) izoláljuk az állatból azokat az ellenanyagokat, amelyek specifikusan kötődnek B7-4- vagy PD-1-fehérjéhez.

IV. Rekombináns expressziós vektorok és gazdasejtek

B7-4- vagy PD-1-fehérjek családjába tartozó fehérjét (vagy annak részletét) kódoló nukleinsav-molekulák vektorok, előnyösen expressziós vektorok részei lehetnek. A leírás szerinti értelemben a „vektor” kifejezés alatt másik, hozzá kapcsolt nukleinsav-molekulát továbbítani képes nukleinsav-molekulát értünk. Vektor egy típusa „plazmid”, amely alatt cirkuláris kétszálú DNS-t értünk, amelybe további DNS-szegmenseket ligálhatunk. Vektor másik típusa a vírusvektor, ahol további DNS-szegmenseket ligálhatunk a virális genomba. Bizonyos vektorok képesek autonóm replikációra a gazdasejtben, amelybe be lettek juttatva (például bakteriális origót tartalmazó bakteriális vektorok és episzómális emlős vektorok). Más vektorok (például nem episzómális emlős vektorok) integrálódnak a gazdasejt genomjába gazdasejtbe való bejuttatás után, és ezáltal a gazdasejt genomjával együtt replikálódnak. Ezenkívül bizonyos vektorok képesek azon gének expressziójának irányítására, amelyhez működőképesen kapcsolva vannak. Ilyen vektorokat a leírás szerinti értelemben „expressziós vektoroknak” nevezzük. Általában a rekombináns DNS módszerekben hasznos expressziós vektorok gyakran plazmidok. A találmány szerint a „plazmid” és „vektor” kifejezéseket felcserélhető módon alkalmazhatjuk, mivel a plazmid a vektor leggyakrabban alkalmazott formája. Azonban a találmány tárgyat képezik expressziós vektorok olyan egyéb formái is, mint például virális vektorok (például replikáció-defektív retrovírusok, adenovírusok és adeno-asszociált vírusok), amelyek ekvivalens funkciót szolgálnak.

Rekombináns expressziós vektorok találmány szerinti nukleinsav-molekulát tartalmazhatnak PD-1- vagy B7-4-molekulának a nukleinsav-molekula indikátorsejtjében (indikátorsejtjeiben) történő expressziójára, például konstitutív vagy indukálható expressziójára alkalmas formában, ami azt jelenti, hogy a rekombináns expressziós vektorok egy vagy több, az expresszióra alkalmazandó gazdasejtek alapján kiválasztott szabályozó szekvenciát tartalmaznak, amely működőképesen kapcsolt az expresszálandó nukleinsav-szekvenciához. A rekombináns expressziós vektorban a „működőképes kapcsolt” kifejezés alatt azt értjük, hogy a jelentőséggel bíró nukleotidszekvencia oly módon van a szabályozó szekvenciá(k)hoz kapcsolva, ami lehetővé teszi a nukleotid-szekvencia expresszióját (például *in vitro* transzkripció/transzlációs rendszerben, vagy gazdasejtben, amikor a vektort bejuttatjuk a gazdasejtbe). A „szabályozó szekvencia” kifejezés magába foglal promótereket, enhancereket és más expressziós szabályozó elemeket (például poliadenilációs szignált). Ilyen szabályozó szekvenciákat ír le például Goeddel [Methods Enzymol. 185, 3-7. old. (1990)]. Szabályozó szekvenciák közé tartoznak azok, amelyek nukleotidszekvencia konstitutív expresszióját irányítják gazdasejt sok típusában, és azok, amelyek csak bizonyos gazdasejtben irányítják a nukleotidszekvencia expresszióját (például szövetspecifikus szabályozó szekvenciák). A szakember számára nyilvánvaló, hogy az expressziós vektor szerkezete olyan tényezőktől függhet, mint például a transzformálendő gazdasejt választása, a kívánt fehérje expressziójának a



szintje, és hasonlók. A találmány szerinti expressziós vektorokat gazdasejtekbe juttathatjuk be, ezáltal fehérjéket vagy peptidket állíthatunk elő, beleértve fúziós fehérjéket vagy peptidket, amelyeket találmány szerinti nukleinsavak kódolnak (például B7-4- vagy PD-1-családba tartozó fehérjék, B7-4- vagy PD-1-családba tartozó fehérjék mutáns formái, fúziós fehérjék, és hasonlók).

A találmány szerinti expressziós vektorokat B7-4- vagy PD-1-fehérjék prokarióta vagy eukarióta sejtekben történő expressziójára tervezhetjük. Például B7-4- vagy PD-1-fehérjéket baktériumsejtekben, mint például *E. coli*-ban, rovarsejtekben (bakulovírus expressziós vektorok alkalmazásával), élesztősejtekben vagy emlőssejtekben expresszáltathatunk. Alkalmas gazdasejteket tárgyal továbbá Goeddel (1990, mint fent). Más megoldásként a rekombináns expressziós vektort *in vitro* transzkribálhatjuk és transzlálhatjuk, például T7-promóter szabályozó szekvenciák és T7-polimeráz alkalmazásával.

Fehérjék prokarióta sejtekben történő expresszióját leggyakrabban *E. coli*-ban hajtjuk végre, akár fúziós, akár nem fúziós fehérjék expresszióját irányító konstitutív vagy indukálható promótereket tartalmazó vektorokkal. A fúziós vektorok néhány aminosavat adnak hozzá az általuk kódolt fehérjéhez, általában a rekombináns fehérje amino-terminális végéhez. Ilyen vektorok tipikusan három célt szolgálnak: 1) rekombináns fehérje expressziójának növelése; 2) a rekombináns fehérje oldhatóságának növelése; és 3) a rekombináns fehérje tisztításának segítése ligandumként hatva affinitási tisztításban. Fúziós expressziós vektorokban gyakran proteolitikus hasítási helyet építünk be a fúziós molekuláris és a rekombináns fehérje kapcsolódási helyén, hogy lehetővé tegyük a rekombináns fehérje elválasztását a fúziós molekulárisztól a fúziós fehérje tisztítását követően. Ilyen enzimek és felismerési szekvenciák közé tartozik a Faktor-Xa, trombin és enterokináz. Tipikus fúziós expressziós vektorok közé tartozik a pGEX [Pharmacia Biotech Inc; Smith, D.B. és Johnson, K.S., Gene 67, 31-40. old. (1988)], pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) és pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ), amelyek sorrendben glutation-S-transzferázt, maltóz-E-kötőfehérjét vagy Protein-A-t fuzionáltatnak a célzott rekombináns fehérjéhez.

Tisztított fúziós fehérjéket hasznosíthatunk B7-4- vagy PD-1-aktivitási vizsgálati eljárásokban (például az alább részletesen leírt közvetlen vizsgálati eljárásokban vagy kompetitív vizsgálati eljárásokban), vagy például B7-4- vagy PD-1-fehérjékre specifikus ellenanyagok létrehozására.

Alkalmas indukálható nem fúziós *E. coli* expressziós vektorok példái közé tartozik a pTrc [Amann és mtsai., Gene 69, 301-315. old. (1988)] és pET 11d [Studier és mtsai., Methods Enzymol. 185, 60-89. old. (1990)]. A célzott gén expressziója a pTrc-vektorról a gazda RNS-polimeráz transzkripciójától függ, hibrid trp-lac fúziós promóterről. A célzott gén expressziója a pET 11d-vektorról T7 gn10-lac fúziós promóterről történő, koexpresszált virális RNS-polimeráz (T7 gn1) által közvetített transzkripciótól függ. Ezt a virális promótert a BL21(DE3) vagy HMS174(DE3) gazdatörzsek biztosítják rezidens profágról, amely a T7 gn1-gént hordozza a lacUV 5 promóter transzkripció szabályozása alatt.

Egy stratégia a rekombináns fehérje expressziójának maximalizálására *E. coli*-ban a fehérje olyan gazdabaktériumban történő expressziója, amelynek csökkent a képessége a rekombináns fehérje proteolitikus hasítására [Gottesman, S., Methods Enzymol. 185, 119-128. old. (1990)]. Egy másik stratégia az expressziós vektorba inzertálandó nukleinsav nukleinsav-szekvenciájának megváltoztatása oly módon, hogy az egyes aminosavak egyedi kodonjai azok legyenek, amelyeket az *E. coli* preferenciálisan hasznosít [Wada és mtsai., Nucleic



Acids Res. 20, 2111-2118. old. (1992)]. A találmány szerinti nukleinsav-szekvenciák ilyen megváltoztatását szokásos DNS-szintézis módszerekkel hajthatjuk végre.

Egy másik megvalósítási mód szerint a B7-4 vagy PD-1 expressziós vektor élesztő expressziós vektor, *A. S. Cerevisiae* élesztőben történő expresszióra szolgáló vektorok példái közé tartozik a PYepSec1 [Baldari és mtsai., EMBO J. 6, 229-234. old. (1982)], PMFa [Kurjan és Herskowitz, Cell 30, 933-943. old. (1982)], pJRY88 [Schultz és mtsai., Gene 54, 113-123. old. (1987)], pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA) és picZ (Invitrogen Corporation, San Diego, CA).

Más megoldásként B7-4- vagy PD-1-polipeptidet rovarsejtekben expresszáltathatunk bakulovírus expressziós vektorok alkalmazásával. Fehérjék tenyésztett rovarsejtekben (például Sf9-sejtekben) történő expresszáltására beszerezhető bakulovírus vektorok közé tartozik a pAC-sorozat [Smith és mtsai., Mol. Cell Biol. 3, 2156-2165. old. (1983)] és a pVL-sorozat [Lucklow, V.A. és Summers, M.D., Virology 170, 31-39. old. (1989)].

Egy még további megvalósítási mód szerint találmány szerinti nukleinsavat emlőssejtben expresszálnak emlős expressziós vektor alkalmazásával. Emlős expressziós vektorok példái közé tartozik a pMex-NeoI, pCDM8 [Seed, B., Nature 329, 840. old. (1987)] és pMT2PC [Kaufman és mtsai., EMBO J. 6, 187-195. old. (1987)]. Amikor emlőssejtben alkalmazzuk, a vektor szabályozó funkcióját gyakran virális szabályozó elemek biztosítják. Például általánosan alkalmazott promóterek a polioma, Adenovirus-2, citomegalovírus és Simian Vírus 40 eredetűek. Egyéb alkalmas expressziós rendszerek tekintetében mind prokarióta, mind eukarióta sejtek esetén lásd a 16. és 17. fejezetet Sambrook, J. és mtsai. „Molecular Cloning: A Laboratory Manual” című könyvében [2. kiadás, kiad.: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989)].

Egy másik megvalósítási mód szerint a rekombináns emlős expressziós vektor képes a nukleinsav expressziójának preferenciális irányítására egy adott sejttípusban (például szövetspecifikus szabályozó elemeket alkalmazunk a nukleinsav expresszáltására). Szövetspecifikus szabályozó elemek ismertek a szakterületen. Alkalmas szövetspecifikus promóterek nem korlátozó példái közé tartoznak az albumin-receptor [májspecifikus; Pinkert és mtsai., Genes Dev. 1, 268-277. old. (1987)], nyirok-specifikus promóterek [Calame és Eaton, Adv. Immunol. 43, 235-275. old. (1988)], különösen T-sejt-receptorok [Wimoto és Baltimore, EMBO J. 8, 729-733. old. (1989)] és immunglobulinok [Banerji és mtsai., Cell 33, 729-740. old. (1983); Queen és Baltimore, Cell 33, 741-748. old. (1983)] promóterei, neuron-specifikus promóterek [például neurofilament promóter; Byrne és Ruddie, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 5473-5477. old. (1989)], hasnyálmirigy-specifikus promóterek [Edlund és mtsai., Science 230, 912-916. old. (1985)], és emlőmirigy-specifikus promóterek (például tejsavó-promóter; 4 873 316. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat és 264 166. számú európai szabadalmi irat). Fejlődési szakaszra specifikus promóterek szintén a találmány tárgykörébe tartoznak, például az egér *hox*-promóterei [Kessel és Gruss, Science 249, 374-379. old. (1990)] és az α -fetoprotein-promóter [Campes és Tilghman, Genes Dev. 3, 537-546. old. (1989)].

Ezenkívül ismertek a szakterületen indukálható szabályozási rendszerek emlőssejtekben történő alkalmazásra, például olyan rendszerek, amelyekben a génexpressziót nehézfém ionok szabályozzák [lásd például Mayo és mtsai., Cell 29, 99-108. old. (1982); Brinster és mtsai., Nature 296, 39-42. old. (1982); Searle és mtsai., Mol. Cell Biol. 5, 1480-1489. old. (1985), hőshock [lásd például Nouer és mtsai., „Heat Shock Response”, 167-



220. old., szerk.: Nouer, L. kiad.: CRC, Boca Raton, FL (1991)], hormonok [lásd például Lee és mtsai., *Nature* 294, 228-232. old. (1981); Hynes és mtsai., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 2038-2042. old. (1981); Klock és mtsai., *Nature* 329, 734-736. old. (1987); Israel és Kaufman, *Nucl. Acids Res.* 17, 2589-2604. old. (1989); és WO 93/23431. számú nemzetközi közzétételi irat), FK506-tal rokon molekulák (lásd például WO 94/18317. számú nemzetközi közzétételi irat) vagy tetraciklinek [Gossen, M. és Bujard, H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 5547-5551. old. (1992); Gossen, M. és mtsai., *Science* 268, 1766-1769. old. (1995); WO 94/29442. számú nemzetközi közzétételi irat és WO 96/01313. számú nemzetközi közzétételi irat). Ennek megfelelően egy másik megvalósítási mód szerint a találmány tárgya rekombináns expressziós vektor, amelyben B7-4- vagy PD-1-DNS működőképesen kapcsolt indukálható eukarióta promóterhez, ezáltal lehetővé téve B7-4- vagy PD-1-fehérje indukálható expresszióját eukarióta sejtekben.

A találmány tárgya továbbá rekombináns expressziós vektor, amely találmány szerinti DNS-molekulát tartalmaz az expressziós vektorba klónozva antiszensz irányítottságban. Azaz a DNS-molekula működőképesen van kapcsolva szabályozó szekvenciához oly módon, ami lehetővé teszi a B7-4- vagy PD-1-mRNS-sel antiszensz RNS-molekula expresszióját (a DNS-molekula transzkripciója által). Olyan antiszensz irányítottságban klónozott nukleinsavhoz működőképesen kapcsolt szabályozó szekvenciákat választhatunk ki, amelyek az antiszensz RNS-molekula folyamatos expresszióját irányítják számos sejttypusban, például virális promóterek és/vagy enhancerek, vagy olyan szabályozó szekvenciákat választhatunk meg, amelyek antiszensz RNS konstitutív, szövetspecifikus vagy sejttypus-specifikus expresszióját irányítják. Az antiszensz expressziós vektor rekombináns plazmid, fagemid vagy legyengített vírus formájában lehet, amelyben az antiszensz nukleinsav nagy hatásfokú szabályozó régió szabályozása alatt termelődik, amelynek az aktivitását azzal a sejttypussal határozhatjuk meg, amelybe a vektort bejuttatjuk. Génexpresszió antiszensz génekkel való szabályozásának tárgyalására lásd Weintraub, H. és mtsai. könyvét [„Antisense RNA as a molecular tool for genetic analysis” *Reviews – Trends in Genetics*, 1. kötet].

A találmány tárgyát képezik továbbá gazdasejtek, amelyekbe a találmány szerinti rekombináns expressziós vektor be lett juttatva. A „gazdasejt” és „rekombináns gazdasejt” kifejezéseket felcserélhető módon alkalmazzuk. Nyilvánvaló, hogy ezen kifejezések nem csak az adott sejtekre vonatkoznak, hanem ilyen sejtek utódjaira és potenciális utódjaira is. Mivel bizonyos módosulások történhetnek az egymást követő generációkban mutáció vagy környezeti hatások hatására, az ilyen utódsejtek valójában nem biztos, hogy azonosak a szülősejtekkel, de még mindig a találmány tárgykörébe tartoznak a leírás szerinti értelemben.

Gazdasejt bármilyen prokarióta vagy eukarióta sejt lehet. Például B7-4- vagy PD-1-fehérjét expresszáltathatunk bakteriális sejtben, mint például *E. coli*-ban, rovarsejtben, élesztőben vagy emlőssejtekben (mint például Kínai hörcsög petefészek sejtben [CHO] vagy COS-sejtekben). Egyéb alkalmas gazdasejtek ismertek a szakember számára.

A vektor-DNS-t hagyományos transzformációs vagy transzfekciós módszerekkel juttathatjuk be prokarióta vagy eukarióta gazdasejtekbe. A leírás szerinti értelemben a „transzformáció” és „transzfekció” kifejezések alatt különféle, a szakterületen ismert módszereket értünk idegen nukleinsav (például DNS) gazdasejtbe történő bejuttatására, beleértve a kalcium-foszfát vagy kalcium-klorid kicsapást, DEAE-dextrán-közvetített transzfekciót, lipofekciót vagy elektroporációt. Alkalmas eljárások gazdasejtek transzformálására vagy transzfekciálására megtalálhatók Sambrook és mtsai. „Molecular Cloning: A Laboratory Manual” című könyvé-

ben [2. kiadás, kiadó: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989)], és más laboratóriumi kézikönyvekben.

Emlőssejtek stabil transzfekciójáról ismert, hogy az alkalmazott expressziós vektortól és transzfekciós módszertől függően a sejteknek csak egy kis része integrálhatja az idegen DNS-t a genomjába. Annak érdekében, hogy azonosítsuk és szelektáljuk ezeket az integránsokat, szelektálható markert (például antibiotikumra való rezisztenciát) kódoló gént juttatunk be általában a gazdasejtbe a jelentőséggel bíró gén mellett. Előnyös szelektálható markerek közé tartoznak azok, amelyek drogokra, mint például G418-ra, higromicinre és metotrexátra való rezisztenciát okoznak. Szelektálható markert kódoló nukleinsavat ugyanazon a vektoron juttathatunk be gazdasejtbe, mint amelyik a B7-4- vagy PD-1-fehérjét kódolja, vagy különálló vektoron juttathatjuk be. A bejuttatott nukleinsavval stabilan transzfektált sejteket azonosíthatjuk drogszelekcióval (például az olyan sejtek, amelyek beépítették a szelektálható markergént, túlélnek, míg a többi sejt elpusztul).

A találmány szerinti gazdasejt, mint például prokarióta vagy eukarióta gazdasejt tenyészetben, alkalmazható B7-4- vagy PD-1-fehérje előállítására (azaz expresszálatására). Ennek megfelelően a találmány tárgyát képezik továbbá eljárások B7-4- vagy PD-1-fehérje előállítására a találmány szerinti gazdasejtek alkalmazásával. Egy megvalósítási mód szerint az eljárás szerint a találmány szerinti gazdasejteket (amelyekbe B7-4- vagy PD-1-fehérjét kódoló rekombináns expressziós vektort juttatunk be) alkalmas tápközegben tenyésztjük oly módon, hogy B7-4- vagy PD-1-fehérje termelődik. Egy másik megvalósítási mód szerint az eljárás tartalmazza B7-4- vagy PD-1-fehérje izolálását is a gazdasejtek tápközegéből.

Bizonyos gazdasejtek alkalmazhatók nem ember transzgenikus állatok előállítására is. Például egy megvalósítási mód szerint a gazdasejt megtermékenyített petesejt vagy embrionális törzssejt, amelybe B7-4 vagy PD-1 kódoló szekvenciákat juttatunk be. Ilyen gazdasejteket azután alkalmazhatunk nem ember transzgenikus állatok előállítására, amelyeknek exogén B7-4- vagy PD-1-szekvenciák lettek bejuttatva a genomjukba, vagy homológ rekombináns állatok előállítására, amelyekben B7-4- vagy PD-1-szekvenciák meg lettek változtatva. Ilyen állatok hasznosak B7-4- vagy PD-1-polipeptid funkciójának és/vagy aktivitásának tanulmányozására, és B7-4- vagy PD-1-aktivitás modulátorainak azonosítására és/vagy értékelésére. A leírás szerinti értelemben „transzgenikus állat” alatt nem ember állatot, előnyösen emlőst, előnyösebben rágcsálót, mint például patkányt vagy egeret értünk, amelyben az állat egy vagy több sejtje transzgént tartalmaz. Transzgenikus állat egyéb példái közé tartoznak nem ember főemlősök, juhok, kutyák, szarvasmarhák, kecskék, csirkék, kétéltűek és hasonlók. Egy transzgén exogén DNS, amely integrálódott egy sejt genomjába, amelyből transzgenikus állat fejlődik ki, és amely az érett állat genomjában marad, ezáltal irányítja kódolt génterminék termelését a transzgenikus állat egy vagy több sejtjében vagy szövetében. A leírás szerinti értelemben „homológ rekombináns állat” alatt nem ember állatot, előnyösen emlőst, előnyösebben egeret értünk, amelyben endogén B7-4- vagy PD-1-gén meg lett változtatva az endogén gén és az állat sejtjébe, például az állat embrionális sejtjébe bejuttatott exogén DNS-molekula közötti homológ rekombinációval, az állat kifejlődését megelőzően.

Transzgenikus állatot B7-4-et vagy PD-1-et kódoló nukleinsav-molekulának a megtermékenyített petesejt hím elömagjába történő bejuttatásával állíthatunk elő, például mikroinjekcióval, retrovírus-fertőzéssel, és engedjük a petesejt kifejlődését átlagos nőstény dajkaállatban. Az 1., 3., 10. vagy 11. azonosítószám szerinti B7-4- vagy PD-1-cDNS-szekvenciákat bejuttathatjuk transzgénként nem ember állat genomjába. Más megoldásként humán B7-4- vagy PD-1-gén nem humán homológját, mint például egér vagy patkány B7-4- vagy PD-1-



gént alkalmazhatunk transzgénként. Más megoldásként B7-4- vagy PD-1-génhomológot, mint például másik B7-4- vagy PD-1-családtagot izolálhatunk az 1., 3., 10. vagy 11. azonosítószám szerinti B7-4- vagy PD-1-cDNS-szekvenciákhoz (amelyeket részletesen a fenti 1. alfejezetben írtunk le) történő hibridizáció alapján, és alkalmazhatunk transzgénként. Intronos szekvenciákat és poliadenilációs szignálokat is beépíthetünk a transzgénbe, hogy növeljük a transzgén expressziójának hatékonyságát. Szövet-specifikus szabályozó szekvenciá(ka)t működőképesen kapcsolhatunk B7-4- vagy PD-1-transzgénhez B7-4- vagy PD-1-fehérje expressziójának adott sejtekbe történő irányítására. Transzgenikus állatok előállítására szolgáló eljárások embriomanipuláció és mikroinjekció útján hagyományossá váltak a szakterületen, és azokat például az alábbi irodalmi helyeken írják le: 4 736 866. és 4 870 009. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratok (mindkettő Leder és mtsai.), a 4 873 191. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat (Wagner és mtsai.) és Hogan, B., „Manipulating the Mouse Embryo”, kiad.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1986). Hasonló eljárásokat alkalmaznak egyéb transzgenikus állatok előállítására is. Transzgenikus alapító állatot azonosíthatunk B7-4- vagy PD-1-transzgén genomban való jelenléte alapján és/vagy B7-4- vagy PD-1-mRNS expressziója révén az állat szöveteiben vagy sejtjeiben. Transzgenikus alapító állatot azután alkalmazhatunk további, a transzgént hordozó állatok tenyésztésére. Ezenkívül B7-4- vagy PD-1-fehérjét kódoló transzgént hordozó transzgenikus állatokat tovább tenésztethetünk más transzgéneket hordozó más transzgenikus állatokkal.

Homológ rekombináns állat előállítására olyan vektort állítunk elő, amely B7-4- vagy PD-1-gén legalább egy részletét tartalmazza, amelybe deléciót, addíciót vagy szubsztitúciót építettünk be, hogy ezáltal megváltoztassuk, például funkcionálisan elrontsuk a B7-4- vagy PD-1-gént. A B7-4- vagy PD-1-gén lehet humán gén (például az 1., 3., 10. vagy 11. azonosítószámú szekvenciák), de előnyösebben humán B7-4- vagy PD-1-gén nem humán homológja (például az 1., 3., 10. vagy 11. azonosítószámú szekvenciákkal sztringens körülmények közötti hibridizációval izolált cDNS). Például egér B7-4- vagy PD-1-gént alkalmazhatunk az egér genomjában lévő endogén B7-4- vagy PD-1-gén megváltoztatására alkalmas homológ rekombinációs vektor konstruálására. Egy előnyös megvalósítási mód szerint a vektort oly módon tervezzük, hogy homológ rekombináció után az endogén B7-4- vagy PD-1-gén funkcionálisan elromoljon (azaz nem kódol többé funkcionális fehérjét; ezt „knock-out” vektornak is nevezzük). Más megoldásként a vektort oly módon tervezhetjük meg, hogy homológ rekombináció után az endogén B7-4- vagy PD-1-gén mutált legyen vagy másképpen megváltozzon, de még mindig funkcionális fehérjét kódoljon (például a leolvasással ellentétes irányban lévő szabályozó régiót megváltoztathatjuk, hogy ezáltal megváltoztassuk az endogén B7-4- vagy PD-1-fehérje expresszióját). A homológ rekombinációs vektorban a B7-4- vagy PD-1-gén megváltoztatott részletét az 5' és 3' végein a B7-4- vagy PD-1-gén további nukleinsav-szekvenciájával szegélyezzük, hogy lehetővé tegyük homológ rekombináció megtörténését a vektoron hordozott exogén B7-4- vagy PD-1-gén és az embrionális törzssejtben lévő endogén B7-4- vagy PD-1-gén között. A további szegélyező B7-4- vagy PD-1-nukleinsav-szekvencia elegendő hosszúságú az endogén génnel történő sikeres homológ rekombinációhoz. Tipikusan több kilobázisnyi szegélyező DNS-t (mind az 5', mind a 3' végen) építünk be a vektorba (lásd például Thomas, K.R. és Capecchi, M.R. közleményét [Cell 51, 503. old. (1987)] homológ rekombinációs vektorok leírására). A vektort embrionális törzssejt-vonalba juttatjuk be (például elektroporációval), és azokat a sejteket, amelyekben a bejuttatott B7-4- vagy PD-1-gén homológ módon rekombináldott az endogén B7-4- vagy PD-1-génnel, kisselektáljuk [lásd például Li, E. és mtsai., Cell 69, 915. old. (1992)]. A kisselektált sejteket azután állat (például egér) blasztocisztájába injektáljuk aggregációs

kinérák kialakítására [lásd például Bradley, A., „Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach”, 113-152. old., szerk.: Robertson, E. J., kiad: IRL, Oxford (1987)]. Azután kiméra embriót beültethetünk alkalmas átlérhes nőstény dajkaállatba, és az embriót kihordathatjuk. A csírasejtjeikben homológ módon rekombináldott DNS-t hordozó utódokat azután olyan állatok tenyésztésére alkalmazhatjuk, amelyekben az állat összes sejtje tartalmazza a homológ módon rekombináldott DNS-t a transzgén csíravonalon történő átadásával. Homológ rekombinációs vektorok és homológ rekombináns állatok konstruálására szolgáló eljárásokat részletesebben leírnak az alábbi irodalmi helyeken: Bradley, A., Curr. Opin. Biotechnol. 2, 823-829. old. (1991) és WO 90/11354. számú nemzetközi közzétételi irat (Le Mouellec és mtsai.); WO 91/01140. számú nemzetközi közzétételi irat (Smithies és mtsai.); WO 92/0968. számú nemzetközi közzétételi irat (Zijlstra és mtsai.); és WO 93/04169. számú nemzetközi közzétételi irat (Berns és mtsai.).

Az előzők mellett a szakember számára nyilvánvaló, hogy homológ rekombináció szakterületén ismert más megközelítési módok is alkalmazhatók a találmány szerint. Enzim-közvetített helyspecifikus integrációs rendszerek ismertek a szakterületen, és alkalmazhatók DNS-molekula integrálására egy második DNS-molekula előre meghatározott helyére. Ilyen enzim-közvetített integrációs rendszerek példái közé tartozik a Cre-rekombináza - lox-cél rendszer [például amint azt leírják Baubonis, W. és Sauer, B., Nucl. Acids Res. 21, 2025-2029. (1993); és Fukushima, S. és Sauer, B., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 7905-7909. old. (1992)] és az FLP-rekombináza - FRT-cél rendszer [például amint azt leírják Dang, D.T. és Perrimon, N., Dev. Genet. 13, 367-375. old. (1992); és Fiering, S. és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 8469-8473. old. (1993)]. Tetraciklin-szabályozott indukálható homológ rekombinációs rendszerek is alkalmazhatók, mint amilyet a WO 94/29442. számú nemzetközi közzétételi irat és WO 96/01313. számú nemzetközi közzétételi irat ír le.

Például egy másik megvalósítási mód szerint olyan nem ember transzgenikus állatokat állíthatunk elő, amelyek a transzgén szabályozott expresszióját lehetővé tevő kiválasztott rendszereket tartalmaznak. Ilyen rendszer egy példája a P1-bakteriofág cre/loxP rekombináza rendszere. A cre/loxP rekombináza rendszer leírására lásd például Lakso és mtsai. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 6232-6236. old. (1992)] közleményét. Rekombináza rendszer egy másik példája a *Saccharomyces cerevisiae* FLP rekombináza rendszere [O’Gorman és mtsai., Science 251, 1351-1355. old. (1991)]. Ha cre/loxP rekombináza rendszeri alkalmazunk a transzgén expressziójának szabályozására, mind a Cre-rekombinázt, mind a kiválasztott fehérjét kódoló transzgént tartalmazó állatokra van szükség. Ilyen állatokat „kettős” transzgenikus állatok létrehozásával biztosíthatunk, például két transzgenikus állat párosztatásával, az egyik kiválasztott kódoló transzgént tartalmaz, és a másik rekombinázt kódoló transzgént tartalmaz.

A találmány szerinti nem ember transzgenikus állat klónjait az alábbi közleményekben leírt eljárásokkal is előállíthatjuk: Wilmut, I. és mtsai., Nature 385, 810-813. old. (1997) és WO 97/007668. és WO 97/07669. számú nemzetközi közzétételi iratok. Röviden, transzgenikus állatból származó sejtet, például testi sejtet izolálhatunk és indukálhatunk, hogy kilépjen a sejtciklusból, és belépjen a G0-fázisba. A nyugalmi állapotban lévő sejtet azután fuzionálthatjuk például elektromos pulzusok alkalmazása útján ugyanazon a fajból származó állatból való magtalanított petesejtet, mint amelyből a nyugalmi állapotban lévő sejtet izoláltuk. A rekonstruált petesejtet azután tenyészthetjük oly módon, hogy morula vagy blasztociszta fejlődjön ki, és azt azután átlérhes nőstény dajkaállatba visszük át. Az ezen nőstény dajkaállattól született utódok annak az állatnak lesznek a klónjai, amelytől a sejtet, például testi sejtet izoláljuk.



V. Gyógyászati készítmények

B7-4- vagy PD-1-modulátorok (például B7-4-et vagy PD-1-et gátló vagy stimuláló szerek, beleértve a fent leírt B7-4- vagy PD-1-nukleinsav-molekulákat, fehérjéket, ellenanyagokat, vagy B7-4- vagy PD-1-aktivitás és/vagy expresszió modulátoraiként azonosított vegyületeket vagy B7-4 és PD-1 közötti kölcsönhatás modulátorait) beadásra alkalmas gyógyászati készítményekbe foglalhatunk be. Ilyen készítmények tipikusan a nukleinsav-molekulát, fehérjét vagy ellenanyagot tartalmazzák, és gyógyászatilag elfogadható hordozót. A leírás szerinti értelemben a „gyógyászatilag elfogadható hordozó” kifejezés alatt bármilyen és mindenféle oldószert, diszpergáló közeget, bevonatot, baktériumellenes és gombaellenes szereket, izotóniás és abszorpciót késleltető szereket és hasonlókat értünk, amelyek kompatibilisek gyógyászati beadással. Az ilyen közegek és szerek alkalmazása gyógyászatilag aktív szerekre jól ismert a szakterületen. Kivéve amilyen mértékben bármilyen hagyományos közeg vagy szer inkompatibilis a hatóanyaggal, annak alkalmazása a készítményekben a találmány tárgykörébe tartozik. Kiegészítő hatóanyagokat is belefoglalhatunk a készítményekbe.

A találmány szerinti gyógyászati készítményt úgy szereljük ki, hogy kompatibilis legyen a szándékolt beadási útjával. Beadási utak példái közé tartozik a parenterális, például intravénás, intradermális, szubkután, orális (például inhalálás), transzdermális (például topikális), transzmukózális és rektális beadás. Parenterális, intradermális vagy szubkután alkalmazásra használt oldatok és szuszpenziók az alábbi komponenseket tartalmazhatják: steril oldószer, mint például injektálásra való víz, sóoldat, olajok, polietilén-glikolok, glicerín, propilén-glikol vagy egyéb szintetikus oldószerek; baktériumellenes szerek, mint például benzil-alkohol vagy metil-parabének; antioxidánsok, mint például aszkorbinsav vagy nátrium-biszulfít; komplex-képző szerek mint például etiléndiamin-tetraecetsav; pufferek, mint például acetátok, citrátok vagy foszfátok, és tonitást módosító szerek, mint például nátrium-klorid vagy dextróz. A pH-t savakkal vagy bázisokkal, mint például sósavval vagy nátrium-hidroxiddal állíthatjuk. A parenterális készítményt ampullákba, eldobható fecskendőkbe vagy üvegből vagy műanyagból készült többdózisos fiolákba zárhatjuk be.

Injektálható alkalmazásra alkalmas gyógyászati készítmények közé tartoznak steril vizes oldatok (ahol vízoldható) vagy diszperziók, és steril porok steril injektálható oldatok vagy diszperziók rögtönzött előállítására. Intravénás beadásra alkalmas hordozók közé tartozik fiziológiás sóoldat, bakteriosztatikus víz, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) vagy foszfát pufferektel sóoldat (PBS). Mindenesetre a készítménynek sterilnek kell lennie, és oly mértékben folyékonynak, hogy könnyen fecskendezhető legyen. Stabilnak kell lennie a gyártás és tárolás körülményei között, és tartósítottnak kell lennie mikroorganizmusok, mint például baktériumok és gombák szennyezésével szemben. A hordozó lehet oldószer vagy diszperziós közeg, amely például vizet, etanolt, poliólt (például glicerint, propilén-glikolt és folyékony polietilén-glikolt és hasonlót) tartalmaz, és ezek alkalmas keverékeit. A megfelelő folyékony-ságot például bevonószert, mint például lecitin alkalmazásával, diszperzió esetén a szükséges részecskeméret fenntartásával és felületaktív anyagok alkalmazásával tarthatjuk fenn. A mikroorganizmusok hatásának megakadályozását különféle baktériumellenes és gombaellenes szerek, mint például parabének, klorobutanol, fenol, aszkorbinsav, timerozál és hasonló alkalmazásával érhetjük el. Sok esetben előnyös izotóniás szereket, például cukrokat, polialkoholokat, mint például mannitolt, szorbítolt, nátrium-kloridot belefoglalni a készítménybe. Az injektálható készítmény hosszan tartó abszorpcióját úgy érhetjük el, hogy a készítménybe abszorpciót késleltető szert foglalunk be, mint például alumínium-monosztearátot és zselatint.

Steril injektálható oldatokat a hatóanyag (például B7-4- vagy PD-1-fehérje vagy anti-B7-4- vagy PD-1-ellenanyag) szükséges mennyiségének alkalmas oldószerbe történő befoglalásával állíthatunk elő szükség szerint egy vagy több, fent felsorolt komponenssel kombinálva, majd steril szűrőssel. Általában diszperziókat a hatóanyagnak az alapvető diszperziós közeget és a fent felsoroltak közül való egyéb szükséges alkotóelemeket tartalmazó steril hordozóba történő befoglalásával állítunk elő. Steril injektálható oldatok készítésére szolgáló steril porok esetében az előállítás előnyös eljárásai vákuumszáritás és fagyaszitva-száritás, ami a hatóanyag és bármilyen további kívánt alkotóelem porát eredményezi azok korábban sterilre szűrt oldatából.

Orális készítmények általában inert hígítószer vagy éhető hordozót tartalmaznak. Azokat zselatinkapszulákba zárhatjuk, vagy tablettákra sajtoljuk. Orális terápiás beadás céljára a hatóanyagot kötőanyagokkal együtt szerelhetjük ki, és tabletták, pasztillák vagy kapszulák formájában alkalmazhatjuk. Orális készítményeket készíthetünk folyékony hordozó alkalmazásával is, szájvízként történő alkalmazásra, amely szerint a folyékony hordozóban lévő hatóanyagot orális alkalmazzák, és kiköpi vagy lenyeli. Gyógyászatiilag kompatibilis kötőszereket és/vagy adjuváns anyagokat alkalmazhatunk a készítmény részeként. A tabletták, pirulák, pasztillák és hasonló az alábbi alkotóelemek bármelyikét tartalmazhatják, vagy hasonló természetű anyagokat: kötőanyag, mint például mikrokristályos cellulóz, tragakant-gumi vagy zselatin; kötőszert, mint például keményítő vagy laktóz, bomlasztószert, mint például algasav, Primogel vagy kukoricakeményítő; kenőanyag, mint például magnézium-sztearát vagy Sterotes; síkosító szer, mint például kolloidális szilícium-dioxid; édesítőszer, mint például szukróz vagy szaharin; vagy ízesítőszer, mint például borsmenta, metil-szaliciát vagy narancs ízesítés.

Inhalálással történő beadásra a hatóanyagokat aeroszol-permet formájában juttatjuk be nyomás alatti lévő tartályból, vagy olyan tárolóedényből, amely alkalmas hajtóanyagot, például gázt, mint például széndioxidot tartalmaz, vagy porlasztókészülékéből.

A szisztémás beadás lehet transzmukózális vagy transzdermális is. Transzmukózális vagy transzdermális beadás esetén az áthatolandó határfelületre alkalmas áthatolószereket alkalmazunk a kiszerezésben. Ilyen áthatolószerek általánosan ismertek a szakterületen, és például közéjük tartoznak detergensok, epesók és fuzidinsav-származékok. Transzmukózális beadást orrpermetek vagy kúpok alkalmazásával végezhetünk. Transzdermális beadás esetén a hatóanyagot balzsamokká, kenőcsökké, gélekké vagy krémekké szerelhetjük ki, amint az általánosan ismert a szakterületen.

A vegyületeket kúpok (például hagyományos kúp alapanyagokkal, mint például kakaóvajjal vagy más gliceridekkel) vagy rektális beadásra való beöntés formájában is előállíthatjuk.

Egy megvalósítási mód szerint moduláló szereket olyan hordozókkal állítjuk elő, amelyek megvédik a hatóanyagot a testből való gyors eliminálástól, mint például szabályozott felszabadulású kiszerezésekkel, mint például implantátumokkal és mikroenkapszuláit bejuttató rendszerekkel. Biodegradálható, biokompatibilis polimereket is alkalmazhatunk, mint például etilén-vinilacetátot, poli-anhidrideket, poli-glikolsavat, kollagént, polioctoésztereket, és poli-tejsavat. Ilyen kiszerezések előállítására szolgáló eljárások nyilvánvalóak a szakember számára. Az anyagokat kereskedelmi forgalomban is beszerezhetjük az Alza Corporation és Nova Pharmaceuticals, Inc. cégektől. Liposzómás szuszpenziókat (beleértve fertőzött sejtekhez célzott liposzómákat vírális antigének elleni monoklonális ellenanyagokkal) is alkalmazhatunk gyógyászatiilag alkalmazható hordozókként. Ezeket a szakember számára ismert eljárások szerint állíthatjuk elő, például amint azt a 4 522 811. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat leírja.

Különösen előnyös az orális és parenterális készítményeket egységdózis formában kiszerezni a beadás könnyűsége és a dózis egységessége végett. A leírás szerinti értelemben egységdózis alakok alatt a kezelendő alanynak megfelelő egységes dózishoz alkalmas fizikailag elkülönült egységeket értünk; mindegyik egység előre meghatározott, számított mennyiségű hatóanyagot tartalmaz, amely kívánt terápiás hatást hoz létre, a szükséges gyógyászati hordozóval együtt. A találmány szerinti egységdózis alakok specifikációját a hatóanyag egyedi jellemzői és az elérendő adott terápiás hatás diktálják, és azoktól közvetlenül függ, és ilyen egyének kezelésére szolgáló hatóanyag kiszérése szakterületének korlátaitól.

Ilyen vegyületek toxicitását és terápiás hatékonyságát szokásos gyógyászati eljárásokkal határozhatjuk meg sejtenyészetekben vagy kísérleti állatokban, például az LD50-érték (a populáció 50%-ában letális dózis) és az ED50-érték (a populáció 50%-ában terápiásan hatásos dózis) meghatározásával. A toxikus és terápiás hatás közötti dózisarány a terápiás index, és azt LD50/ED50 arányként fejezhetjük ki. Azon vegyületek, amelyek nagy terápiás indexet mutatnak, előnyösek. Míg alkalmazhatók olyan vegyületek, amelyek toxikus mellékhatásokat mutatnak, gondosan kell eljárni azon bejuttatási rendszerek megtervezésénél, amelyek ilyen vegyületeket céloznak az érintett szövet egy helyére annak érdekében, hogy minimalizáljuk a nem ferőzött sejtek sérülését és ezáltal csökkentjük a mellékhatásokat.

A sejtenyészési vizsgálati eljárásokból és állatkísérletekből nyert adatokat alkalmazhatjuk emberi alkalmazásra szolgáló adagolások kiszéréseben. Ilyen vegyületek adagolása előnyösen a keringési koncentrációban belül van, ami magában foglalja a kicsi vagy semmilyen toxicitású ED50-értéket. Az adagolás változhat ebben a tartományban az alkalmazott adagolási formától és az alkalmazott beadás útjától függően. A találmány szerinti eljárásban alkalmazott bármilyen vegyület esetén a terápiásan hatásos dózist kezdetben megbecsülhetjük sejtenyészési vizsgálati eljárásokból. Dózist kiszerezhetünk állati modellekben, hogy elérjük azt a keringési plazmakoncentráció-tartományt, amely magában foglalja az IC50-értéket (azaz a tesztvegyület koncentrációját, amely tünetek félmaximális gátlását okozza), amint azt sejtenyészetben meghatároztuk. Ilyen információt alkalmazhatunk az emberben hasznos dózisok pontosabb meghatározáshoz. A szinteket plazmában például nagyteljesítményű folyadékkromatográfiával mérhetjük.

A találmány szerinti nukleinsav-molekulákat vektorokba inzertálhatjuk, és génterápiás vektorokként alkalmazhatjuk. Génterápiás vektorokat például intravénás injekcióval, lokális beadással (5 328 470. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat) vagy sztereotaktikus injekcióval [lásd például Chen és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 3054-3057. old. (1994)] juttathatunk be alanyba. A génterápiás vektor gyógyászati készítménye a génterápiás vektort alkalmas oldószerben tartalmazhatja, vagy lassú felszabadulási mátrixból állhat, amelybe a gén-bejuttató eszköz bele van ágyazva. Más megoldásként, amikor a teljes gén-bejuttatási vektort előállíthatjuk intakt módon rekombináns sejtekből, például retrovírus vektorokból, a gyógyászati készítmény egy vagy több sejtet foglalhat magába, amely termeli a gén-bejuttatási rendszert.

A gyógyászati készítményeket tartályba, csomagba vagy adagolóeszközbe foglalhatjuk be, együtt a beadási utasításokkal.

VI. Találmány szerinti alkalmazások és eljárások

A B7-4- vagy PD-1-moduláló szerek, például a találmány szerinti nukleinsav-molekulák, fehérjék fehérje-analógok és ellenanyagok alkalmazhatók az alábbi eljárások közül egyben vagy többben: a) kezelési eljárás-

sok, például immunválasz serkentő jellegű vagy gátló jellegű szabályozása; b) szkrinelő vizsgálati eljárások; c) prediktív gyógyászat (például diagnosztikai vizsgálati eljárások, prognosztikai eljárások, követő klinikai vizsgálatok és farmakogenetika). A találmány szerinti nukleinsav-molekulákat alkalmazhatjuk például B7-4- vagy PD-1-fehérjék expresszáltatására (például rekombináns expressziós vektorral gazdaséjtben génterápiás alkalmazásokban), hogy B7-4- vagy PD-1-mRNS-t detektáljunk (például biológiai mintában), vagy genetikai változást B7-4- vagy PD-1-génben, és moduláljuk a B7-4- vagy PD-1-aktivitást, mint ahogyan alább részletesen leírjuk. A B7-4- vagy PD-1-fehérjéket alkalmazhatjuk B7-4- vagy PD-1-inhibitorok elégtelen vagy túlzott termelésével jellemzett rendellenességek kezelésére. Ezenfelül a B7-4- vagy PD-1-fehérjéket alkalmazhatjuk természetben előforduló B7-4- vagy PD-1-kötőpartnerek szkrinelésére, hogy olyan drogokra vagy vegyületekre szkrineljünk, amelyek B7-4- vagy PD-1-aktivitást modulálnak, valamint B7-4- vagy PD-1-fehérje elégtelen vagy túlzott termelésével, vagy a vad típusú B7-4- vagy PD-1-fehérjéhez viszonyítva csökkenő vagy abnormális B7-4- vagy PD-1-fehérje termelésével jellemzett rendellenességek kezelésére. Ezenkívül a találmány szerinti anti-B7-4- vagy PD-1-ellenanyagokat alkalmazhatjuk B7-4- vagy PD-1-fehérjék detektálására és izolálására, B7-4- vagy PD-1-fehérjék bioelérhetőségének szabályozására, és B7-4- vagy PD-1-aktivitás modulálására, például a B7-4 és PD-1 kölcsönhatásának modulálásával.

A. Kezelési eljárások:

A találmány tárgyát képezik mind profilaktikus, mind terápiás eljárások alany kezelésére, aki olyan betegséggel veszélyeztetett (vagy érzékeny rá), vagy olyan rendellenessége van, amely abnormális B7-4- vagy PD-1-expresszióval vagy aktivitással kapcsolatos.

1. Profilaktikus eljárások

Egy megvalósítási mód szerint a találmány tárgya eljárás abnormális B7-4- vagy PD-1-expresszióval vagy aktivitással kapcsolatos betegség vagy állapot megelőzésére alanyban, B7-4- vagy PD-1-polipeptid vagy olyan szer beadásával, amely modulálja B7-4- vagy PD-1-polipeptid expresszióját vagy B7-4 vagy PD-1 legalább egy aktivitását. Olyan betegség által veszélyeztetett alanyok, amit abnormális B7-4- vagy PD-1-expresszió vagy aktivitás okoz vagy ahhoz hozzájárul, azonosíthatók például a találmány szerinti diagnosztikai vagy prognosztikus eljárások bármelyikével vagy azok kombinációjával. Profilaktikus szer beadása történhet B7-4- vagy PD-1-abnormalitásra jellemző tünetek megnyilvánulását megelőzően, oly módon, hogy betegséget vagy rendellenességet megelőzünk, vagy más megoldásként annak előrehaladását késleltetjük. A B7-4- vagy PD-1-abnormalitás vagy állapot típusától függően például B7-4- vagy PD-1-polipeptidet, B7-4- vagy PD-1-agonistát vagy B7-4- vagy PD-1-antagonistát alkalmazhatunk az alany kezelésére. A megfelelő szert meghatározhatjuk a klinikai indikációk alapján, és azonosíthatjuk például találmány szerinti szkrinelő vizsgálati eljárások alkalmazásával.

2. Terápiás eljárások

Egy másik megvalósítási mód szerint a találmány tárgyát eljárások képezik B7-4- vagy PD-1-expresszió vagy aktivitás modulálására terápiás célból. A B7-4-ről demonstrálták, hogy gátolja aktivált immunsejtek kostimulációját és proliferációját, és hogy gátló jelet közvetít immunsejtekhez PD-1 útján. Ennek megfelelően a B7-4 vagy PD-1 aktivitását és/vagy expresszióját, valamint a B7-4 és PD-1 közötti kölcsönhatást modulálhatjuk az immunválasz modulálása érdekében. Nyilvánvaló, hogy azon megvalósítási módok szerinti, amelyekben B7-4 kostimuláns-receptorhoz kötődik, B7-4 serkentő jellegű szabályozása immunválaszok serkentő jellegű szabályo-

zását eredményezi, míg B7-4 gátló jellegű szabályozása immunválaszok gátló jellegű szabályozását eredményezi. Azon megvalósítási módok szerint, amelyekben B7-4 gátló-receptorhoz kötődik, B7-4-aktivitás serkentő jellegű szabályozása immunválaszok gátló jellegű szabályozását eredményezi, míg B7-4-aktivitás gátló jellegű szabályozása immunválaszok serkentő jellegű szabályozását eredményezi. Egy előnyös megvalósítási mód szerint B7-4 gátló-receptorokhoz kötődik. Egy különösen előnyös megvalósítási mód szerint B7-4 PD-1-hez kötődik.

A találmány szerinti modulációs eljárások magukban foglalják a sejt érintkezésbe hozását B7-4- vagy PD-1-poliipeptid modulátorával, például egy olyan szerrel, amely B7-4 vagy PD-1 aktivitását és/vagy expresszióját modulálja, vagy olyan szerrel, amely B7-4 és PD-1 kölcsönhatását modulálja.

B7-4- vagy PD-1-fehérje aktivitását moduláló szer találmány szerinti szer, mint például nukleinsav- vagy fehérje-molekula, B7-4- vagy PD-1-fehérje természetben előforduló célmolekulája (például PD-1 B7-4 esetében vagy B7-4 PD-1 esetében), B7-4- vagy PD-1-ellenanyag, B7-4- vagy PD-1-agonista vagy antagonist, B7-4- vagy PD-1-agonista vagy antagonist peptidomimetikumja, vagy más kismolekula.

B7-4 vagy PD-1 expresszióját moduláló szer például antiszensz nukleinsav-molekula, triplex oligonukleotid vagy ribozim, vagy rekombináns vektor B7-4- vagy PD-1-fehérje expresszálatására. Például B7-4- vagy PD-1-poliipeptid transzlációs iniciációs helyéhez közeli területtel komplementer oligonukleotidot szintetizálhatunk. Egy vagy több antiszensz oligonukleotidot adhatunk a sejt tápközegéhez, tipikusan 200 µg/ml koncentrációban, vagy páciensnek beadhatjuk B7-4- vagy PD-1-poliipeptid szintézisének megakadályozására. Az antiszensz oligonukleotidot felveszik a sejtek, és hibridizál B7-4- vagy PD-1-mRNS-hez a transzláció megakadályozására. Más megoldásként olyan oligonukleotid alkalmazhatunk, amely kötődik kétszálú DNS-hez triplex szerkezetet alkotva, hogy megakadályozzuk a DNS kitekeredését és transzkripcióját. Akármelyik eredményeképpen a B7-4- vagy PD-1-poliipeptid szintézise gátolt. Amikor a PD-1 expresszióját moduláljuk – előnyösen –, az ilyen moduláció más módon történik, mint a PD-1-gén kiütésével.

Azon szerek, amelyek modulálják az expressziót azon tény következtében, hogy szabályozzák a PD-1 vagy B7-4 mennyiségét sejten, szintén modulálják PD-1 vagy B7-4 összaktivitását sejten.

Egy megvalósítási mód szerint olyan szer, amely stimulálja B7-4 gátló aktivitását vagy PD-1 gátló aktivitását, B7-4 vagy PD-1 agonistája. Ilyen szerek példái közé tartozik aktív B7-4- vagy PD-1-fehérje és B7-4- vagy PD-1-poliipeptidet kódoló nukleinsav-molekula, amelyet bejuttatunk a sejtbe.

Egy másik megvalósítási mód szerint a szer gátolja B7-4 kostimuláns vagy gátló aktivitását vagy PD-1 gátló aktivitását és B7-4 vagy PD-1 agonistája. Ilyen szerek példái közé tartoznak antiszensz B7-4- vagy PD-1-nukleinsav-molekulák, anti-B7-4- vagy PD-1-ellenanyagok, B7-4- vagy PD-1-molekulák oldható, nemaktiváló formái, és B7-4- vagy PD-1-inhibitorok.

Ezen modulációs szereket *in vitro* adhatjuk be (például a sejteket érintkezésbe hozzuk a szerrel), vagy más megoldásként *in vivo* (például badjuk a szert az alanyának). Ekképpen a találmány tárgyát eljárások képezik olyan betegségben vagy rendellenességben szenvedő egyén kezelésére, amelyre jó hatással lenne B7-4- vagy PD-1-fehérje modulálása, például olyan rendellenesség kezelésére, amelyre jó hatással lenne az immunválasz serkentő jellegű vagy gátló jellegű szabályozása, vagy amelyet B7-4- vagy PD-1-fehérje- vagy nukleinsav-molekula abnormalis expressziója vagy aktivitása jellemez. Egy megvalósítási mód szerint az eljárás magában foglalja egy szer (például találmány szerinti szkrináló vizsgálati eljárással azonosított szer), vagy olyan szerek



kombinációjának beadását, amely modulálja (például serkentő jellegűen szabályozza vagy gátló jellegűen szabályozza) B7-4- vagy PD-1-expresszióját vagy aktivitását. Egy másik megvalósítási mód szerint az eljárás magában foglalja B7-4- vagy PD-1-fehérje- vagy nukleinsav-molekula beadását terápiaként, hogy kompenzálja B7-4 vagy PD-1 csökkent vagy abnormális expresszióját vagy aktivitását.

B7-4- vagy PD-1-aktivitás stimulálása kívánatos olyan esetekben, amelyekben B7-4 vagy PD-1 abnormálisan gátló jellegűen szabályozott és/vagy amelyben megnövekedett B7-4- vagy PD-1-aktivitásnak valószínűleg jó hatása van. Hasonlóképpen B7-4- vagy PD-1-aktivitás gátlása kívánatos olyan esetekben, amelyekben B7-4 vagy PD-1 abnormálisan serkentő jellegűen szabályozott és/vagy amelyben csökkent B7-4- vagy PD-1-aktivitásnak valószínűleg jó hatása van. Szakember számára nyilvánvaló, hogy olyan megvalósítási módok szerint, amelyben B7-4 kostimuláns receptorhoz kötődik, B7-4 stimulálásának és PD-1 stimulálásának ellentétes hatása van immunsejt kostimulálására, és ezáltal az immunválaszra. Egy ilyen esetben, amikor az egyik molekula aktivitásának stimulálása kívánatos, a másik molekula aktivitásának szuppresszálása kívánatos.

B7-4 gátló jellegű szabályozásában alkalmazható szemléltető szerek (B7-4-antagonisták) közé tartoznak (például): antiszensz molekulák, B7-4-et felismerő ellenanyagok, B7-4 és egyik természetben immunsejten előforduló receptorának (például oldható, monovalens B7-4-molekulák, és a jelen szkrináló vizsgálati eljárásokban azonosított B7-4-ligandumok vagy vegyületek oldható formái) kölcsönhatását gátló vegyületek. PD-1 gátló jellegű szabályozásában alkalmazható szemléltető szerek (PD-1-antagonisták) közé tartoznak (például): antiszensz molekulák, olyan ellenanyagok, amelyek kötődnek PD-1-hez, de nem továbbítanak gátló jelet az immunsejthez („nemaktiváló ellenanyagok”), és PD-1 oldható formái.

B7-4 serkentő jellegű szabályozásában alkalmazható szemléltető szerek (B7-4-agonisták) közé tartoznak (például): B7-4-poli-peptideket kódoló nukleinsav-molekulák, B7-4 multivalens formái, B7-4 expresszióját fokozó vegyületek, és B7-4-et expresszáló sejtek, stb. PD-1 serkentő jellegű szabályozásában alkalmazható szemléltető szerek (PD-1-agonisták) közé tartoznak (például): gátló jelet PD-1-en keresztül továbbító ellenanyagok, PD-1 expresszióját fokozó vegyületek, PD-1-et kódoló nukleinsav-molekulák, és B7-4 PD-1-en keresztül jelet továbbító formái.

3. Immunválasz gátló jellegű szabályozása B7-4 vagy PD-1 gátló jellegű szabályozásával

A találmánynak számos megvalósítási módja létezik B7-4-poli-peptid gátló funkciójának serkentő jellegű szabályozására vagy kostimuláns funkciójának gátló jellegű szabályozására, ezáltal immunválasz gátló jellegű szabályozására. A gátló jellegű szabályozás lehet már folyamatban lévő immunválasz inhíbeálása vagy gátlása, vagy magában foglalhatja immunválasz kiváltásának megakadályozását.

Aktívált immunsejtek funkcióit gátolhatjuk immunsejt-válaszok gátló jellegű szabályozásával vagy specifikus energia indukálásával immunsejtben, vagy mindkettővel.

Például B7-4 kostimuláns receptorral való kölcsönhatását gátló anti-B7-4-ellenanyagokat vagy B7-4-poli-peptideket (például B7-4-poli-peptid oldható, monovalens formáit, mint például B7-4-Ig-t) alkalmazhatunk kostimuláns jel gátlására, és ezáltal az immunválasz gátló jellegű szabályozására.

Ezenfelül azokban a megvalósítási módokban, amelyekben B7-4 gátló receptorhoz kötődik, B7-4 gátló receptorokhoz kötődő formáit, például sejtfelszínen lévő multivalens B7-4-et alkalmazhatjuk az immunválasz gátló jellegű szabályozására.



Hasonlóképpen a PD-1-útvonalat is stimulálhatjuk valamilyen szer alkalmazásával, hogy ily módon az immunválaszt gátló jellegűen szabályozzuk. B7-4 sejtfelszínen lévő stimuláló receptorral való kölcsönhatásának gátlása (például PD-1 és/vagy CTLA4 oldható formájának alkalmazásával), vagy PD-1 aktiválása (például PD-1-et keresztükötő aktiváló ellenanyag alkalmazásával) negatív jelet biztosíthat immunsejteknek.

A találmány egy megvalósítási módja szerint PD-1-aktivitást stimuláló aktiváló ellenanyag bispecifikus ellenanyag. Például ilyen ellenanyag PD-1-kötőhelyet tartalmazhat, és egy másik kötőhelyet, amely immunsejten lévő sejtfelszíni receptort céloz, például T-sejten, B-sejten vagy mieloid sejten. Egy megvalósítási mód szerint ilyen ellenanyag, amellyel, hogy PD-1-kötőhelyet tartalmaz, tartalmazhat olyan kötőhelyet is, amely olyan molekulához kötődik, amely közel van egy aktiváló vagy gátló receptorhoz, például B-sejt antigén-receptorhoz, T-sejt antigén-receptorhoz, vagy Fc-receptorhoz, annak érdekében, hogy a molekulát specifikus sejtpopulációhoz célozza. Például CD3-antigént, T-sejt-receptor-láncot, LFA-1-et, CD2-t, CTLA-4-et, immunglobulint, B-sejt-receptort, Ig- α -t, Ig- β -t, CD22-t vagy Fc-receptort alkalmazhatunk. Ilyen ellenanyagok (vagy egyéb bispecifikus szerek) ismertek a szakterületen, és például a leírás kitanítása szerint állíthatók elő. A bispecifikus ellenanyag ezen második antigénjének kiválasztása flexibilitást biztosít a gátlásra célzandó sejtpopuláció kiválasztásában.

Egy másik megvalósítási mód szerint PD-1 és sejten lévő aktiváló vagy gátló receptor ko-ligálása fokozhatja a PD-1-en keresztüli negatív jel kialakulását. Ilyen ko-ligálást például bispecifikus szer, mint például bispecifikus ellenanyag alkalmazásával valósíthatunk meg a leírás kitanítása szerint, amelynek van specifikitása mind PD-1-re, mind receptorral kapcsolódó molekulára. Egy másik megvalósítási mód szerint PD-1-en keresztül negatív jelet továbbító szer multivalens formáját alkalmazhatjuk PD-1-en keresztüli negatív jel továbbításának fokozására, például gyöngyön vagy felszínen prezentált szert. Egy másik megvalósítási mód szerint ilyen multivalens szer két specifikitást tartalmazhat PD-1 és receptor vagy receptorhoz kapcsolódó molekula ko-ligálásának elérésére (például anti-CD3-at és B7-4-et tartalmazó gyöngy).

B7-4 kostimuláns receptorral való kölcsönhatását gátló vagy inhibeáló szereket (például B7-4 oldható formáit vagy B7-4 elleni gátló ellenanyagokat), valamint B7-4-közvetített gátló jelet elősegítő szereket vagy PD-1-et aktiváló PD-1-agonisták (például PD-1-et aktiváló ellenanyagokat, vagy PD-1-et aktiváló kismolekulákat) azonosíthatunk azon képességük alapján, hogy gátolják immunsejtek proliferációját és/vagy effektor funkcióját, vagy anergiát indukálnak *in vitro* vizsgálati eljárásban adva. Például sejteket tenyészíthetünk olyan szer jelenlétében, amely stimulálja a szignáltranszdukciót aktiváló receptoron keresztül. Sejtaktiválás számos, szakterületen elismert adatát alkalmazhatjuk például sejtproliferáció vagy effektor funkció mérésére (például ellenanyag-termelés, citokintermelés, fagocitózis) az aktiváló szer jelenlétében. Teszt-szer ezen aktiválás gátlására való képességét könnyen meghatározhatjuk a szer azon képességének mérésével, hogy a mért proliferáció vagy effektor funkció csökkenését okozza.

A találmány egy megvalósítási módja szerint tolerancia indukálódik specifikus antigénnel szemben antigénnek PD-1-agonistával együtt történő beadására. Például toleranciát indukálhatunk specifikus fehérjékkel szemben. Egy megvalósítási mód szerint olyan allergénekre vagy idegen fehérjékre adott immunválaszokat gátolhatunk, amelyek esetén az immunválasz nemkívánatos. Például Faktor-VIII-at kapó páciensek gyakran termelnek ellenanyagokat ezen véralvadási faktor ellen. B7-4-közvetített kostimuláns jelet gátló szer, vagy PD-1-



közvetített gátló jelet stimuláló szer rekombináns Faktor-VIII-cal történő együttes beadása (vagy fizikai kapcsolása, például keresztkötéssel) gátló jellegű szabályozást eredményezhet.

Egy megvalósítási mód szerint egy első B7-4-peptidet egy másik B-limfocita-antigén (például B7-1 vagy B7-2) aktivitásával rendelkező peptidhez fuzionáltatva tartalmazó fúziós fehérjét alkalmazhatunk B7-4 immunsejten lévő kostimuláns receptorral való kölcsönhatásának gátlására immunválasz gátló jellegű szabályozására. Más megoldásként két különálló peptidet (például B7-4-poliipeptid B7-2-vel és/vagy B7-1-gyel), vagy gátló ellenanyagok kombinációját (például ellenanyagok B7-4-poliipeptid ellen, anti-B7-2 és/vagy anti-B7-1 monoklonális ellenanyagokkal) kombinálhatunk egyetlen készítményként, vagy adhatunk be külön-külön (egyidejűleg vagy egymás után) immunsejt-közvetített immunválasz gátló jellegű szabályozására alanyban. Ezenkívül egy vagy több, B7-4-poliipeptid aktivitású peptid terápiásan aktív mennyiségét, B7-1-gyel és/vagy B7-1-aktivitással, alkalmazhatjuk együtt más gátló jellegű szabályozó reagensekkel immunválasz befolyásolására. Egyéb immunmoduláló reagensek példái közé tartoznak kostimuláns jelet gátló ellenanyagok (például CD28, ICOS ellen), gátló jelet CTLA-4-en keresztül aktiváló ellenanyagok és/vagy egyéb immunsejt-markerek elleni ellenanyagok (például CD40 ellen, CD40-ligandum ellen vagy citokinek ellen), fúziós fehérjék (például CTLA-4-Fc, PD-1-Fc), és immunszuppresszív drogok (például rapamicin, ciklosporin-A vagy FK506).

A B7-4- és/vagy PD-1-peptidek hasznosak lehetnek olyan terápiás szerek előállítására, amelyek sejtek elpusztításával gátolják az immunsejt-funkciót. Például B7-4- vagy PD-1-poliipeptid részleteit toxinhoz kapcsolhatjuk citotoxikus szert készítve, amely képes azon sejtek elpusztítását megindítani, amelyhez kötődik.

Citotoxikus szerek készítésére a találmány szerinti poliipeptideket köthetjük, vagy működőképesen kapcsolhatjuk toxinokhoz, szakterületen ismert módszerek alkalmazásával, például keresztkötéssel vagy rekombináns DNS módszerekkel. Immuntoksinok előállítása általában jól ismert a szakterületen (lásd például a 4 340 535. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratot és a 44 167. számú európai szabadalmi iratot, mindkettő hivatkozás útján a kitanítás részét képezi). Diszulfid-kötést tartalmazó kapcsolómolekulák számos típusa ismert, amelyeket sikeresen alkalmazhatunk a toxin-molekularész poliipeptiddel való konjugálására. Egy megvalósítási mód szerint térben „akadályozott” diszulfid-kötést tartalmazó kapcsolómolekulák előnyösek, a nagyobb *in vivo* stabilitásuk miatt, miáltal megakadályozzák a toxin-molekularész felszabadulását a hatás helyén történő kötődést megelőzően.

Sokféle toxin ismert, amelyet a találmány szerinti poliipeptidekhez vagy ellenanyagokhoz konjugálhatunk. A példák közé tartoznak: számos hasznos növényi, gomba vagy akár baktérium eredetű toxin, amelyek közé tartoznak, például, különféle A-láncú toxinok, különösen ricin A-lánc, riboszóma inaktíváló fehérjék, mint például szaporin vagy gelonin, α -szarcin, aszpergillin, restriktocin, ribonukleázok, mint például méhlepény ribonukleáz, angiogenin, diftéria-toxin és *Pseudomonas*-exotoxin, stb. A találmány szerinti alkalmazásra előnyös toxin-molekularész toxin A-lánc, amelyet kezeltünk szénhidrát-oldalláncok módosítására vagy eltávolítására, deglikozilált-A-lánc (5 776 427. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat).

Ilyen citotoxikus szerek (például B7-4-ricin, egyedül vagy B7-2-ricinnel vagy B7-1-ricinnel együtt) egyikének vagy kombinációjának infúziója páciensbe immunsejtek pusztulását eredményezheti, különösen azon tény fényében, hogy aktivált immunsejtek B7-4-ligandumok nagyobb mennyiségét expresszálják. Például mivel PD-1 indukálódik aktivált limfociták felszínén, PD-1 elleni ellenanyagot alkalmazhatunk ezen specifikus sejtek kimerítésének célzására FcR-függő mechanizmussal vagy lemosás útján citotoxikus drog (például ricin, szaporin



vagy kalikeamicin) konjugálásával az ellenanyaghoz. Egy megvalósítási mód szerint az ellenanyag-toxin bispecifikus ellenanyag lehet. Ilyen bispecifikus ellenanyagok hasznosak specifikus sejtpopuláció célzására, például csak bizonyos sejttípusokon található markerek, például TCR, BCR vagy FcR molekula alkalmazásával.

B7-4-polipeptid kostimuláns funkcióinak gátló jellegű szabályozása vagy megakadályozása, vagy B7-4 vagy PD-1 gátló funkciójának (például PD-1 negatív jelző funkciójának stimulálása) aktiválása hasznos immunválasz gátló jellegű szabályozására, például szövet-, bőr vagy szerv-átültetés, graft-gazda-elleni betegség (GVHD) vagy autoimmun betegségek, mint például szisztémás lupusz eritematózus és szklerózis multiplex esetén. Például immunsejt-funkció gátlása csökkent szövetpusztulást eredményez szövetátültetés során. Tipikusan szövetátültetés során a transzplantátum kilökődését annak immunsejtek általi idegenként való felismerése váltja ki, amit a transzplantátumot elpusztító immunreakció követ. Olyan molekula beadása, amely gátolja B7-4-molekula kölcsönhatását immunsejteken lévő kostimuláns receptorral (receptorokkal) (mint például B7-4- vagy PD-1-polipeptid oldható, monomer formája), egyedül vagy másik gátló jellegű szabályozó szerrel együtt az átültetést megelőzően vagy azzal egy időben gátolhatja kostimuláns jel kialakulását. Ezenkívül B7-4 kostimuláns jelek gátlása, vagy B7-4 vagy PD-1 gátló jel elősegítése elegendő lehet immunsejtek anergizálására, ezáltal tolerancia indukálására az alanyban. Hosszú távú tolerancia indukálása B7-4-közvetített kostimuláns jel gátlásával elkerülheti ezen gátlószerek ismételi beadásának szükségességét.

Elégséges immunuszupresszió vagy tolerancia alanyban való elérésére kívánatos lehet más molekulák kostimuláns funkcióját is gátolni. Például kívánatos lehet B7-1 és B7-4, B7-2 és B7-4, vagy B7-1 és B7-2 és B7-4 funkciójának gátlása ezen antigének mindegyikének aktivitásával rendelkező peptidek vagy ezen antigének elleni gátló ellenanyagok kombinációjának (külön-külön vagy együtt egyetlen készítményben) beadásával az átültetést megelőzően vagy azzal egy időben. Más megoldásként kívánatos lehet B7-4 vagy PD-1 gátló aktivitásának elősegítése és B7-1 és/vagy B7-2 kostimuláns aktivitásának gátlása. Egyéb, találmány szerinti gátló jellegű szabályozó eljárásokban alkalmazható gátló jellegű szabályozó szerek közé tartoznak például CTLA4-en keresztül gátló jelet továbbító szerek, CTLA4 oldható formái, CTLA4-en keresztüli gátló jelet aktiváló ellenanyagok, egyéb immunsejt-markerek elleni gátló ellenanyagok vagy egyéb ligandumpárok oldható formái [például CD40 és CD40-ligandum közötti kölcsönhatást megzavaró szerek (például anti-CD40-ligandum ellenanyagok)], citokinek elleni ellenanyagok, vagy immunuszupresszív drogok. Egy másik megvalósítási mód szerint legalább két különböző B7-4-ellenanyag kombinációját adhatjuk be optimális gátló aktivitás elérésére.

Például B7-4-polipeptid kostimuláció gátlása vagy B7-4 vagy PD-1 gátló funkció aktiválása is hasznos lehet autoimmun betegség kezelésére. Sok autoimmun betegség olyan immunsejtek nem megfelelő aktiválásának az eredménye, amelyek saját szövettel reagálnak, és amelyek a betegségek patológiájában résztvevő citokinek és auto-ellenanyagok termelését segítik elő. Autoreaktív immunsejtek aktiválódásának megakadályozása csökkentheti vagy megszüntetheti a betegség tüneteit. Immunsejtek kostimulációját B7-molekulák receptor-ligandum kölcsönhatásának megzavarásával gátló reagensok beadása kostimuláns receptorokkal hasznos immunsejt-aktiválás gátlására, és a betegség lefolyásában esetleg részt vevő auto-ellenanyagok vagy citokinek termelésének megakadályozására. Ezenfelül B7-4 vagy PD-1 gátló funkcióját elősegítő szerek autoreaktív immunsejtek antigén-specifikus toleranciáját indukálhatják, ami a betegség hosszú távú enyhüléséhez vezethet. Reagensok hatékonyságát autoimmun rendellenességek megelőzésében vagy csillapításában emberi autoimmun betegségek számos jól jellemzett állati modelljének alkalmazásával határozhatjuk meg. Példák közé tartozik az egér kísérle-



tes autoimmun encefalitisz, szisztémás lupusz eritematózus MRL/lpr/lpr-egérben vagy NBZ hibrid egérben, egér autoimmun kollagén artritisz, diabétesz mellitusz NOD-egérben és BB-patkányokban, és egér kísérletes miaszténia gravisz [lásd „Fundamental Immunology”, 840-856. old., szerk.: Paul, kiad.: Raven Press, New York (1989)].

Immunejt-aktiválás gátlása hasznos terápiásan allergia és allergiás reakciók kezelésében, például IgE-termelés gátlásával. B7-4 vagy PD-1 gátló funkcióját elősegítő szer beadhatunk allergiás alanyban immunsejt-közvetített allergiás válasz gátlására az alanyban. PD-1-polipeptid aktiválása szintén hasznos lehet allergiák kezelésében. Immunejtek B7-4-kostimulációjának gátlását vagy B7-4 vagy PD-1 gátló útvonal stimulációját kísérhetjük allergénnek történő kitételrel, megfelelő MHC-molekulákkal együtt. Allergiás reakciók lehetnek szisztémás vagy lokális természetűek, az allergén bejutásának útjától és az IgE törzsejteken és bazofileken való elhelyezkedésének mintázatától függően. Ezáltal immunsejt-közvetített allergiás választ gátolhatunk lokálisan vagy szisztémásan B7-4 kostimuláns receptorral való kölcsönhatását gátló szer gátló formájának vagy B7-4 vagy PD-1 gátló funkcióját elősegítő szer beadásával.

Immunejt-aktiválás B7-4-kostimuláns aktivitás vagy PD-1 gátló aktivitás stimulálása útján történő gátlása is fontos lehet terápiásan immunsejtek vírusos fertőzése esetén. Például szerzett immunhiányos szindróma (AIDS) esetén a vírusos replikációt az immunejt-aktiválás stimulálja. B7-4/kostimuláns-receptor kölcsönhatás gátlása vagy B7-4 vagy PD-1 gátló funkció stimulációja a vírusos replikáció gátlását eredményezheti, és ezáltal enyhítheti az AIDS lefolyását. Immunválasz gátló jellegű szabályozása B7-4-aktivitás vagy B7-4-nek természetes kötőpartnerével (kötőpartnerével), például PD-1-gyel való kölcsönhatása stimulálása útján hasznos lehet terhesség fenntartásának elősegítésében is. A B7-4 normálisan magas szinten expresszálódik a méhlepény trofoblasztjaiban, az anya és a magzat közötti kapcsolatot alkotó sejtek rétegében, és szerepet játszhat a magzat anyai kilökődésének megakadályozásában. Az embrió vagy magzat immunológiai kilökődése miatti spontán abortusz veszélyének kitétt nőket (például akiket B7-4-aktivitásra való szkríneléssel azonosítottunk, amint azt a „Prognosztikai vizsgálati eljárások” fejezetben leírjuk, akiknek volt korábbi spontán abortusza vagy akiknek nehézsége volt a fogamzással) kezelhetünk B7-4-aktivitást vagy B7-4-nek természetes kötőpartnerével (kötőpartnerével), például PD-1-gyel való kölcsönhatását stimuláló szerekkel.

Immunválasz gátló jellegű szabályozása B7-4-aktivitás vagy B7-4-nek természetes kötőpartnerével (kötőpartnerével), például PD-1-gyel való kölcsönhatása stimulálása útján hasznos lehet autológ szövetek autoimmun rohamának kezelésében is. Például B7-4 normálisan magas szinten expresszálódik a szívben, és megvédi a szívet autoimmun rohamtól. Ezt bizonyítja az a tény, hogy a Balb/C knock-out egér súlyos autoimmun rohamot mutat a szívben trombózissal. Ezáltal azon állapotokat, amelyeket autoimmun roham okoz vagy súlyosbít (például ebben a példában szívbetegség, miokardiális infarktus vagy ateroszklerózis), csillapíthatunk vagy javíthatunk B7-4-aktivitás vagy B7-4-nek természetes kötőpartnerével, például PD-1-gyel való kötődésének növelésével. Tehát a találmány oltalmi körébe tartozik autoimmun roham, mint például autoimmun betegségek (valamint olyan állapotok, mint például a szívbetegség, miokardiális infarktus és ateroszklerózis) által súlyosított állapotok modulálása B7-4-aktivitás vagy B7-4-nek B7-4-vel való kölcsönhatásának stimulálásával.

4. Immunválasz serkentő jellegű szabályozása

B7-4 kostimuláns aktivitás serkentő jellegű szabályozása vagy PD-1 vagy B7-4 gátló aktivitásának gátlása immunválasz serkentő jellegű szabályozására szintén hasznos terápiában. Immunválasz serkentő jellegű

szabályozása lehet létező immunválasz fokozása vagy kezdeti immunválasz kiváltása. Például immunválasz fokozása B7-4 kostimuláns aktivitás stimulálása vagy PD-1 vagy B7-4 gátló aktivitás gátlása révén hasznos mikróbákkal, mint például baktériumokkal, vírusokkal vagy parazitákkal történő fertőzések esetében. Például egy megvalósítási mód szerint B7-4 olyan formája, amely kostimuláns jelet segít elő immunsejtben [például B7-4-peptid multivalens formában (például oldható multivalens forma vagy sejt felszínén expresszált forma)], vagy olyan szer, amely gátolja B7-4 kölcsönhatását gátló receptorral, vagy olyan szer, amely gátolja gátló jel továbbítását PD-1-en keresztül, például nem aktiváló ellenanyag PD-1 ellen terápiásan hasznos lehet olyan esetekben, amikor ellenanyag- és sejt-közvetített immunválaszok – vírus gyorsabb vagy alaposabb kiürülését eredményezve – jótékony hatású lenne. Ezek közé tartozna vírusos bőrbetegségek, mint például herpesz vagy övsömör, amely esetekben ilyen szert helyileg adhatunk a bőrre. Ezenfelül szisztémás vírusbetegségeket, mint például influenzát, náthát és encefalitist enyhíthetünk ilyen szerek szisztémás beadásával.

Bizonyos esetekben kívánatos lehet továbbá egyéb szereket beadni, amelyek serkentő jellegűen szabályozzák az immunválaszt, például más B7-4-családtagok formáit, amelyek jelet továbbítanak kostimuláns receptoron keresztül, az immunválasz további fokozása érdekében.

Más megoldásként immunválaszt fokozhatunk fertőzött betegben immunsejtek eltávolításával a betegből, az immunsejtek *in vitro* érintkezésbe hozásával B7-4 olyan formájával, amely kostimuláns jelet segít elő immunsejtben, vagy olyan szerrel, amely gátolja gátló jel továbbítását protein D-en keresztül, és az *in vitro* stimulált immunsejtek visszajuttatásával a páciensbe. Egy másik megvalósítási mód szerint immunválasz fokozására szolgáló eljárás magában foglalja fertőzött, például vírussal fertőzött sejtek izolálását páciensből, azok transzfektálását B7-4 olyan formáját kódoló nukleinsav-molekulával, amely kostimuláns receptorhoz kötődik, oly módon, hogy a sejt expresszája a felszínén a B7-4-molekulát vagy egy részletét, és a transzfektált sejtek visszajuttatását a páciensbe. A transzfektált sejtek képesek *in vivo* kostimuláns jelet továbbítani immunsejtekbe, és ezáltal aktiválni azokat.

B7-4 olyan formái, amelyek kostimuláns jelet segítenek elő immunsejtben, vagy olyan szer, amely gátolja B7-4 kölcsönhatását gátló receptorral, vagy olyan szer, amely gátolja gátló jel továbbítást PD-1-en keresztül, alkalmazható profilaktikusan oltóanyagokban különféle polipeptidek ellen, mint például kórokozókból származó polipeptidek ellen. Kórokozó, például vírus elleni immunitást indukálhatunk vírusfehérjével megfelelő adjuvánsban történő immunizálással B7-4 olyan formájával együtt, amely kostimuláns jelet segít elő immunsejtben, vagy olyan szerrel, amely gátolja B7-4 kölcsönhatását gátló receptorral, vagy olyan szerrel, amely gátolja gátló jel továbbítást PD-1-en keresztül. Más megoldásként olyan géneket tartalmazó vektort alkalmazhatunk vakcinálásra, amelyek kórokozó-antigént és B7-4 kostimuláns receptorokhoz kötődő formáját kódolják. Nukleinsav-oltóanyagokat különféle utakon adhatunk be, például injekcióval (például intramuszkuláris, intradermális vagy DNS-sel bevont aranyrészecskék bioliztikus injekciójával az epidermiszbe gényágyával, amely részecskegyorsítót vagy sűrített gázt alkalmaz a részecskék bőrbe juttatására [Hayness és mtsai., J. Biotechnol. 44, 37. old. (1996)]). Más megoldásként nukleinsav-oltóanyagokat nem invazív módokon adhatunk be. Például tiszta vagy lipiddel kiszerezett DNS-t juttathatunk be a légúti rendszerbe vagy máshová célzhatjuk, például Peyer-féle plakkokba a DNS orális bejuttatásával [Schubbert, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 961. old. (1997)]. Legyenigített mikroorganizmusokat alkalmazhatunk nyálkahártya-felszínekre történő beadásra [Sizemore és mtsai., Science 270, 29. old. (1995)].

Egy megvalósítási mód szerint B7-4-polipeptid kostimuláns jelet továbbító formáját I-es osztályba tartozó MHC-fehérjékkel együtt adhatjuk be, például oly módon transzfektált sejttel, amely B7-4-polipeptidet és I-es osztályba tartozó MHC-fehérje α -láncát és β 2-mikroglobulint koexpresszálja, a T-sejtek aktiválását, és fertőzés elleni immunitást eredményezve. Például azon kórokozók, amelyek ellen oltóanyagok hasznosak, közé tartozik a hepatitisz B, hepatitisz C, Epstein-Barr vírus, citomegalovírus, HIV-1, HIV-2, tuberkulózis, malária és schistosomiasis.

Egy másik alkalmazás szerint B7-4 kostimuláns funkciójának serkentő jellegű szabályozása vagy fokozása hasznos daganat-immunitás indukálásában. B7-4-antigént kódoló nukleinsav-molekulával transzfektált daganatsejteket (például szarkóma, melanóma, limfóma, leukémia, neuroblasztóma, karcinóma) adhatunk be alanyban daganatspecifikus tolerancia elhárításra alanyban. Adott esetben a daganatsejteket transzfektálhatjuk B7-polipeptidek (például B7-1, B7-2, B7-4) kombinációjának expresszáltatására. Például páciensből levett daganatsejteket transzfektálhatunk *ex vivo* olyan expressziós vektorral, amely B7-4 expresszióját irányítja egyedül, vagy B7-1- és/vagy B7-2-aktivitású peptiddel együtt. A transzfektált daganatsejteket visszajuttatjuk a páciensbe, ami a peptideknek a transzfektált sejtek felszínén történő expresszióját eredményezi. Más megoldásként gén-terápiás módszereket alkalmazhatunk daganatsejt transzfekció végett való célzására *in vivo*.

Ezenfelül olyan daganatsejteket, amelyek nincsenek I-es MHC-osztályba vagy II-es MHC-osztályba tartozó molekulák, vagy amelyek nem expresszálnak elegendő I-es MHC-osztályba vagy II-es MHC-osztályba tartozó molekulát, transzfektálhatunk olyan nukleinsavval, amely I-es osztályba tartozó MHC-fehérje α -láncát és β 2-mikroglobulin fehérje, vagy II-es osztályba tartozó MHC-fehérje α -láncát és II-es osztályba tartozó MHC-fehérje β -láncát egészét vagy részletét (például citoplazmatikus doméntől csontolt részletét) kódolja, ezáltal I-es MHC-osztályba vagy II-es MHC-osztályba tartozó fehérjét expresszál a sejtfelszínen. A megfelelő I-es osztályba tartozó MHC és II-es osztályba tartozó MHC expresszáltatása B-limfocita-antigén (például B7-1, B7-2, B7-4) aktivitásával rendelkező peptiddel együtt T-sejt-közvetített immunválaszt indukál a transzfektált daganatsejt ellen. Adott esetben II-es osztályba tartozó MHC-vel kapcsolatos fehérje, mint például az invariáns lánc expresszióját gátló antiszensz konstrukciót kódoló gént is ko-transzfektálhatunk B7-4-polipeptidet kódoló DNS-sel, elősegítve daganattal kapcsolatos antigének prezentálását, és daganatspecifikus immunitást indukálva. B7-negatív egér daganatsejt B7-1 expressziójáról kimutatták, hogy T-sejt-közvetített, daganatkárosító károsítással kísért specifikus immunitást, és daganatos próba elleni hosszán tartó védelmet indukál [Chen, L. és mtsai., Cell 71, 1093-1102. old. (1992); Townsend, S.E. és Allison, J.P., Science 259, 368-370. old. (1993); Baskar, S. és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 5687-5690. old. (1993)]. Ezáltal immunsejt-közvetített immunválasz indukálása ember alanyban elegendő lehet daganatspecifikus tolerancia elhárítására az alanyban.

Egy másik megvalósítási mód szerint az immunválaszt stimulálhatjuk jel továbbításával B7-4-hez kötődő kostimuláns receptoron keresztül, vagy jeltovábbítás gátlásával B7-4-hez kötődő gátló receptoron, például PD-1-en keresztül, oly módon, hogy a már létező toleranciát elhárítjuk. Például olyan antigének elleni immunválaszt, amelyek ellen az alany nem képes szignifikáns immunválaszt kifejleszteni, például autológ antigén, mint például daganatspecifikus antigének elleni immunválaszt indukálhatunk olyan szer beadásával, amely gátolja PD-1 gátló aktivitását, vagy B7-4 kötőkéességét gátló ligandumhoz. Például egy megvalósítási mód szerinti oldható PD-1-et vagy oldható B7-4-et (például PD-1-Fc-t vagy B7-4-Fc-t) alkalmazhatunk immunválasz fokozására, például daganatsejt ellen. Egy megvalósítási mód szerint autológ antigént, mint például daganatspecifikus

antigént együtt adhatunk be olyan szerrel, amely gátolja PD-1 gátló aktivitását vagy B7-4 kötőképeségét gátló ligandumhoz. Egy másik megvalósítási mód szerint immunválaszt stimulálhatunk antigén (például autológ antigén) ellen neurológiai rendellenesség kezelésére. Egy másik megvalósítási mód szerint PD-1-antagonistákat alkalmazhatunk adjuvánsként idegen antigének elleni válaszok erősítésére aktív immunizálási folyamatban.

Egy még további megvalósítási mód szerint B7-4 olyan formájának termelését gátolhatjuk, amely gátló receptorhoz kötődik vagy amely vetélkedik B7-4-vel kostimuláns receptorhoz történő kötésben (például B7-4 olyan formája, amely PD-1-hez vagy természetben előforduló oldható molekulához kötődik), például antiszensz RNS alkalmazásával, annak érdekében, hogy serkentő jellegűen szabályozzuk az immunválaszt. Például egy megvalósítási mód szerint gátló B7-4-molekulák daganatsejtek általi termelését gátolhatjuk annak érdekében, hogy növeljük a daganatellenes immunitást.

Egy megvalósítási mód szerint immunsejteket veszünk le alanytól, és *ex vivo* tenyésztünk B7-4 olyan formájának a jelenlétében, amely kostimuláns molekulához kötődik, vagy olyan szer jelenlétében, amely gátolja B7-4 vagy PD-1 gátló jelét, hogy szaporítsuk az immunsejtek populációját. Egy további megvalósítási mód szerint az immunsejteket azután beadjuk alanynak. Immunsejteket stimulálhatunk proliferációra *in vitro*, például elsődleges jelet és kostimuláns jelet adva az immunsejteknek, amint az ismert a szakterületen. B7-4-fehérjék különféle formái, vagy olyan szerek, amelyek kötődnek kostimuláns receptorhoz, vagy gátolják a jelátvitelt PD-1-en keresztül, szintén alkalmazhatók immunsejtek proliferációjának stimulálására. Egy megvalósítási mód szerint immunsejteket *ex vivo* tenyésztünk a WO 94/29436. számú nemzetközi közzétételi iratban leírt eljárás szerint. A kostimuláns molekula lehet oldható, sejtmembránhoz kapcsolódó, vagy szilárd felszínhez, mint például gyöngyökhöz kapcsolódó.

B. B7-4 és/vagy PD-1 modulációja által modulált citokinek azonosítása

A találmány szerinti B7-4- és PD-1-molekulákat alkalmazhatjuk olyan citokinek azonosításra, amelyek immunsejtekben termelődnek, vagy termelődésük fokozott vagy gátolt B7-4- és/vagy PD-1-aktivitás modulációja hatására. PD-1-et expresszáló immunsejteket szuboptimálisan stimulálhatunk *in vitro* elsődleges aktivációs jellel, például T-sejteket stimulálhatunk forbolészterrel, anti-CD3-ellenanyaggal vagy előnyösen II-es osztályba tartozó MHC-molekulához kapcsolódó antigénnel, és a kostimuláns jelet adhatunk nekik, például B7-4-családba tartozó antigén stimuláló formája által, például B7-4-poli-peptidet kódoló nukleinsavval transzfektált, és a peptidet a felszínén expresszáló sejt által, vagy a peptid oldható formájával. A tápközegbe felszabadított ismert citokinek ELISA-val azonosíthatjuk, vagy a citokint gátló ellenanyag azon képessége alapján, hogy gátolja immunsejtek proliferációját vagy a citokinnel indukált más sejttípusok proliferációját. Például IL-4 ELISA reagenskészlet beszerezhető a Genzyme cégtől (Cambridge, MA), mint ahogyan IL-7-et gátló ellenanyag is. IL-9 és IL-12 elleni gátló ellenanyagok beszerezhetők a Genetics Institute cégtől (Cambridge, MA). Azután meghatározhatjuk B7-4 és PD-1 kölcsönhatása stimulálásának vagy gátlásának hatását a citokin-profilra.

A fent leírt *in vitro* immunsejt-kostimulációs vizsgálati eljárást alkalmazhatjuk olyan új citokinek azonosítására szolgáló eljárásban is, amelyek modulálhatók a B7-4 és/vagy PD-1 általi modulációval. Például míg a CD28/CTLA4-út vonal stimulálása látszólag fokozza az IL-2-szekréciót, az ICOS-út vonal stimulálása látszólag fokozza az IL-10-szekréciót [Hutloff és mtsai., Nature 397, 236. old. (1999)]. Ha egy kostimuláció hatására indukálódó adott aktivitást, például immunsejt-proliferációt nem lehet gátolni ismert citokinek elleni gátló ellenanyagok hozzáadásával, az aktivitás ismeretlen citokin hatásának lehet az eredménye. A kostimulációt követően



ezt a citokint megfigyélhetjük a tápközegekből hagyományos eljárásokkal, és az aktivitását mérhetjük immunsejt-proliferációt indukáló képessége alapján.

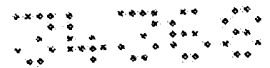
Olyan citokinek azonosítására, amelyek szerepet játszanak tolerancia indukálásában, fent leírt *in vitro* T-sejt-kostimulációs vizsgálati eljárást alkalmazhatunk. Ebben az esetben T-sejteknek elsődleges jelet adnánk és érintkezésbe hoznánk azokat kiválasztott citokinnel, de nem adnánk kostimuláns jelet. Az immunsejtek moosása és pihentetése után a sejteket ismét próbára tennénk mind elsődleges jellel, mind kostimuláns jellel. Ha az immunsejtek nem reagálnak (például proliferálnak vagy citokineket termelnek), akkor toleránsakká váltak, és a citokin nem akadályozta meg tolerancia indukálását. Azonban ha az immunsejtek reagálnak, a citokin megakadályozta tolerancia indukálását. Azok a citokinek, amelyek képesek megakadályozni tolerancia indukálását, célozhatók *in vivo* gátlásra olyan reagensekkel, amelyek B-limfocita antigéneket gátolnak, mint hatékonyabb mód tolerancia indukálására transzplantátumot kapók, vagy autoimmun betegségben szenvedő páciensekben. Például beadhatunk citokint gátló ellenanyagot alanyunk olyan szerrel együtt, amely elősegíti B7-4 vagy PD-1 gátló aktivitását.

C. B7-4- vagy PD-1-polipeptid expresszióját moduláló molekulák azonosítása

A találmány szerinti fehérjékkel és peptidokkal termeltetett ellenanyagokat alkalmazhatjuk olyan molekulákra való szkrinelő vizsgálati eljárásban, amelyek modulálják B7-4- vagy PD-1-polipeptid expresszióját sejteken. Például B7-4- vagy PD-1-polipeptid expressziójának megváltozásában kulmináló intracelluláris jel-továbbító útvonalakat (például aktivációs jelekre adott válaszokat) moduláló molekulákat azonosíthatunk egy vagy több B7-4- vagy PD-1-polipeptid sejtfelszínen történő expressziójának vizsgálatával. Csökkent immunfluoreszcens festődés megfelelő ellenanyaggal a molekula jelenlétében azt jelezne, hogy a molekula intracelluláris jeleket gátol. Olyan molekulák, amelyek B7-4- vagy PD-1-polipeptid expresszióját serkentő jellegűen szabályozzák, megnövekedett immunfluoreszcens festődést eredményeznek. Más megoldásként molekula hatását polipeptid expressziójára meghatározhatjuk sejtbeli mRNS-szintek detektálásával találmány szerinti próba alkalmazásával. Például olyan sejtet, amely B7-4- vagy PD-1-polipeptidet expresszál érintkezésbe hozhatunk tesztelendő molekulával, és a sejt mRNS-szintjeinek növekedését vagy csökkenését szokásos módszerekkel detektálhatjuk, mint például Northern hibridizációval vagy mRNS vagy összes poli(A)⁺RNS hagyományos dot-blotjával, detektálható markerrel jelölt cDNS-próba alkalmazásával. B7-4- vagy PD-1-polipeptid expresszióját moduláló molekulák terápiásan hasznosak immunválasz akár serkentő jellegű szabályozására, akár gátló jellegű szabályozására, egyedül, vagy oldható gátló vagy stimuláló reagensekkel együtt, amint az fent leírtuk. Például B7-4 expresszióját gátló molekulát beadhatunk egy második szerrel együtt, például immunszuppresszánszt vagy olyan molekulát, amely gátolja PD-1 expresszióját beadhatunk immunstimulánssal, például adjuvánssal. B7-4- vagy PD-1-moduláló képességükre tesztelhető szemléltető molekulák közé tartoznak citokinek, mint például IL-4, γ INF, IL-10, IL-12, GM-CSF és prosztaglandinok.

D. Szkrinelő vizsgálati eljárások

A találmány tárgya eljárás (amit a leírás szerint „szkrinelő vizsgálati eljárásnak” is nevezünk) modulátorok, azaz potenciális vagy teszt vegyületek vagy szerek (például peptidok, peptidomimetikumok, kismolekulák vagy más drogok) azonosítására, amelyek kötődnek B7-4- vagy PD-1-fehérjékhez, stimuláns vagy gátló hatásuk van, például B7-4- vagy PD-1-expresszióra vagy B7-4- vagy PD-1-aktivításra.



Egy megvalósítási mód szerint a találmány tárgyát eljárások képezik olyan potenciális vagy teszt vegyületekre történő szkrinelésre, amelyek kötődnek B7-4- vagy PD-1-fehérjéhez vagy polipeptidhez, vagy biológiai-lag aktív részletéhez, vagy modulálják annak az aktivitását, például modulálják B7-4- vagy PD-1-polipeptid azon képességét, hogy kölcsönhat rokon kötőpartnerével vagy kölcsönható molekulájával (például intracelluláris kölcsönható molekulával). A találmány szerinti tesztvegyületeket a szakterületen ismert számos kombinatorikus könyvtár eljárás bármelyikének alkalmazásával állíthatjuk elő, beleértve: biológia könyvtárakat; térben címezhető párhuzamos szilárdfázisú vagy oldatfázisú könyvtárakat; dekonvolúciót igénylő szintetikus könyvtárakat; az 'egy gyöngy - egy könyvtár' eljárást; és affinitási kromatográfiás szelekciót alkalmazó szintetikus könyvtár eljárásokat. A biológiai könyvtár megközelítési mód peptidkönyvtárakra korlátozódik, míg a másik négy megközelítési mód alkalmas vegyületek peptid, nempeptid oligomer és kismolekulás könyvtárai esetén [Lam, K.S. és mtsai., *Anticancer Drug Des.* 12, 145. old. (1997)].

Molekuláris könyvtárak szintézisére szolgáló eljárások példái megtalálhatók a szakirodalomban, például az alábbi irodalmi helyeken: DeWitt és mtsai., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 6909-2042. old. (1993); Erb és mtsai., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 11422. old. (1994); Zuckermann és mtsai., *J. Med. Chem.* 37, 2678. old. (1994); Cho és mtsai., *Science* 261, 1303. old. (1993); Carrell és mtsai., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33, 2059. old. (1994); Carrell és mtsai., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33, 2061. old. (1994); és Gallop és mtsai., *J. Med. Chem.* 37, 1233. old. (1994).

Vegyületek könyvtárait prezentálhatjuk oldatban [például Houghten és mtsai., *Biotechniques* 13, 412-421. old. (1992)], vagy gyöngyökön [Lam és mtsai., *Nature* 354, 82-84. old. (1991)], chipen [Fodor, *Nature* 364, 555-556. old. (1993)], baktériumokon [Ladner, 5 223 409. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat] spórákon [Ladner, 5 223 409. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat], plazmidokon [Cull és mtsai., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 1865-1869. old. (1992)] vagy fagon [Scott és Smith, *Science* 249, 386-390. old. (1990); Devlin, *Science* 249, 404-406. old. (1990); Cwirla és mtsai., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 6378-6382. old. (1990); Felici, *J. Mol. Biol.* 222, 301-310. old. (1991); Ladner, mint fent].

Egy másik megvalósítási mód szerint a vizsgálati eljárás sejtes alapú vizsgálati eljárás, amely szerint B7-4-célmolekulát (intracelluláris kölcsönható molekulát vagy PD-1-receptort) vagy PD-1-célmolekulát (például B7-4-ligandumot vagy intracelluláris kölcsönható molekulát) expozíciós sejtet érintkezésbe hozunk tesztvegyülettel, és meghatározzuk a tesztvegyület képességét B7-4- vagy PD-1-célmolekula aktivitásának modulálására (például stimulálására vagy gátlására). Tesztvegyület B7-4- vagy PD-1-célmolekula aktivitásának modulálására való képességének meghatározását elvégezhetjük például a B7-4- vagy PD-1-fehérje kötőképességének meghatározásával a B7-4- vagy PD-1-célmolekulához. B7-4- vagy PD-1-fehérje kötőpartneréhez való kötő- vagy kölcsönható képességének meghatározását elvégezhetjük például közvetlen kötés mérésével.

Közvetlen kötési vizsgálati eljárásban a B7-4- vagy PD-1-fehérjét (vagy a megfelelő célmolekulájukat) radioizotóphoz vagy enzimatis jelhez kapcsolhatjuk oly módon, hogy B7-4- vagy PD-1-fehérje B7-4- vagy PD-1-célmolekulához való kötődését meghatározhatjuk a komplexben lévő jelölt fehérje detektálásával. Például B7-4- vagy PD-1-molekulákat, például B7-4- vagy PD-1-fehérjéket jelölhetünk ^{125}I -vel, ^{35}S -sel, ^{14}C -vel vagy ^3H -val, akár közvetlenül, akár közvetve, és a radioizotópot detektáljuk radioaktív sugárzás közvetlen számlálásával vagy szintillációs számlálással. Más megoldásként B7-4- vagy PD-1-molekulákat enzimatisan jelölhetünk



például tormaperoxidázzal, alkalikus foszfátazzal vagy luciferázzal, és az enzimatis jelet detektáljuk megfelelő szubsztát terméké történő átalakításának meghatározásával.

Szintén a találmány oltalmi körébe tartozik vegyület B7-4 vagy PD-1 és célmolekulája közötti kölcsönhatás modulálására való képességének meghatározása, bármelyik kölcsönható fél jelölése nélkül. Például mikrofiziométer alkalmazhatunk B7-4 vagy PD-1 és célmolekulája közötti kölcsönhatás detektálására akár B7-4 vagy PD-1, akár célmolekula jelölése nélkül [McConnell, H.M. és mtsai., Science 257, 1906-1912. old. (1992)]. A leírás szerinti értelemben „mikrofiziométer” (például *Cytosensor*) alatt analitikai készüléket értünk, amely azt a sebességet méri, amellyel a sejt savanyítja a környezetét, fényérzékeny potenciometriás szenzor („light-addressable potentiometric sensor”, LAPS”) alkalmazásával. Ezen savanyítási sebesség változásait alkalmazhatjuk vegyület és receptor közötti kölcsönhatás indikátoraként.

Egy előnyös megvalósítási mód szerint B7-4- vagy PD-1-fehérje B7-4- vagy PD-1-célmolekulához való kötő- vagy kölcsönható képességének meghatározását elvégezhetjük a B7-4, PD-1 vagy a megfelelő célmolekula aktivitásának meghatározásával. Például B7-4, PD-1 vagy a megfelelő célmolekula aktivitását meghatározhatjuk sejtbeli második hírvívó (például tirozín-kináz aktivitás) indukálásának detektálásával, megfelelő szubsztát katalitikus/enzimatis aktivitásának detektálásával, jelzőgén (amely célnyagra reagáló szabályozó elemet tartalmaz működőképesen kapcsolva detektálható markert, például kloramfenikol-acetil-tranzsferázt kódoló nukleinsavhoz) indukálásának detektálásával, vagy B7-4, PD-1 vagy a megfelelő célmolekula által szabályozott sejttes válasz detektálásával. Például B7-4- vagy PD-1-fehérje B7-4- vagy PD-1-célmolekulához való kötő- vagy kölcsönható képességének meghatározását elvégezhetjük, például, vegyület azon képességének mérésével, hogy modulálja immunsejtek kostimulációját vagy gátlását proliferációs vizsgálati eljárásban, vagy zavarja B7-4- vagy PD-1-poliipeptid kötőképeségét B7-4- vagy PD-1-poliipeptid egy részletét felismerő ellenanyagokhoz.

Egy még további megvalósítási mód szerint találmány szerinti vizsgálati eljárás sejtmentes vizsgálati eljárás, amelyben B7-4- vagy PD-1-fehérjét vagy biológiailag aktív részletét érintkezésbe hozunk tesztvegyülettel, és meghatározzuk a tesztvegyület kötőképeségét a B7-4- vagy PD-1-fehérjéhez vagy annak biológiailag aktív részletéhez. A tesztvegyület kötődését a B7-4- vagy PD-1-fehérjéhez akár közvetlenül, akár közvetve határozzuk meg, amint azt fent leírtuk. Egy előnyös megvalósítási mód szerint a vizsgálati eljárásban a B7-4- vagy PD-1-fehérjét vagy biológiailag aktív részletét érintkezésbe hozzuk ismert vegyülettel, amely kötődik B7-4-bez vagy PD-1-bez, ily módon vizsgálati keveréket hozunk létre, érintkezésbe hozzuk a vizsgálati keveréket tesztvegyülettel, és meghatározzuk a tesztvegyület képeségét B7-4- vagy PD-1-fehérjével való kölcsönhatásra, ahol a tesztvegyület B7-4- vagy PD-1-fehérjével való kölcsönhatása képeségének meghatározását úgy végezzük, hogy meghatározzuk a tesztvegyület B7-4- vagy PD-1-fehérjéhez, vagy annak biológiailag aktív részletéhez való preferenciális kötőképeségét az ismert vegyülethez viszonyítva.

Egy másik megvalósítási mód szerint találmány szerinti vizsgálati eljárás sejtmentes vizsgálati eljárás, amelyben B7-4- vagy PD-1-fehérjét vagy biológiailag aktív részletét érintkezésbe hozunk tesztvegyülettel, és meghatározzuk a tesztvegyület képeségét a B7-4- vagy PD-1-fehérje vagy annak biológiailag aktív részlete aktivitásának modulálására, például stimulálására vagy gátlására. Tesztvegyület B7-4- vagy PD-1-célmolekula aktivitásának modulálására való képeségének meghatározását elvégezhetjük például a B7-4- vagy PD-1-fehérje kötőképeségének meghatározásával a B7-4- vagy PD-1-célmolekulához, a közvetlen kötés meghatározására fent leírt eljárások egyikével. B7-4- vagy PD-1-fehérje B7-4- vagy PD-1-célmolekulához való kötőképeségé-



nek meghatározását elvégezhetjük olyan technológiával is, mint például a valós idejű Biomolekuláris Kölcsönhatás Elemzés („Biomolecular Interaction Analysis”, BIA) [Sjolander, S. és Urbaniczky, C., Anal. Chem. 63, 2338-2345. old. (1991) és Szabo és mtsai., Curr. Opin. Struct. Biol. 5, 699-705. old. (1995)]. A leírás szerinti értelemben a „BIA” kifejezés alatt biospecifikus kölcsönhatás valós idejű tanulmányozására szolgáló technológiát értünk, a kölcsönható felek bármelyikének jelölése nélkül (például BIAcore). A felszíni plazmon-rezonancia („surface plasmon resonance”, SPR) optikai jelenség változásait alkalmazhatjuk valós idejű reakciók jelzésére biológiai molekulák között.

Egy még további megvalósítási mód szerint a sejtmentes vizsgálati eljárásban B7-4- vagy PD-1-fehérjét vagy biológiailag aktív részletét érintkezésbe hozzuk ismert vegyülettel, amely kötődik B7-4-hez vagy PD-1-hez, ily módon vizsgálati keveréket hozunk létre, érintkezésbe hozzuk a vizsgálati keveréket tesztvegyülettel, és meghatározzuk a tesztvegyület képességét B7-4- vagy PD-1-fehérjével való kölcsönhatásra, ahol tesztvegyület B7-4- vagy PD-1-fehérjével való kölcsönhatása képességének meghatározását úgy végezzük, hogy meghatározzuk a tesztvegyület B7-4- vagy PD-1-fehérjéhez való preferenciális kötő- vagy moduláló képességét.

A találmány szerinti sejtmentes vizsgálati eljárások alkalmazhatók fehérjék oldható és/vagy membránkötött formáinak (például B7-4- vagy PD-1-fehérjék vagy biológiailag aktív részleteik, vagy olyan kötőpartnerek, amelyekhez B7-4 vagy PD-1 kötődik) alkalmazására. Olyan sejtmentes vizsgálati eljárások esetén, amelyben fehérje membránkötött formáját alkalmazzuk (például sejt felszíni B7-4- vagy PD-1-receptort), kívánatos lehet szolubilizálószer alkalmazni oly módon, hogy a fehérje membránkötött formája oldatban fennmaradjon. Ilyen szolubilizálószer példái közé tartoznak nemionos detergensok, mint például n-oktilglukozid, n-dodecylglukozid, n-dodecilmaltózid, oktanoil-N-metilglukamid, dekanoil-N-metilglukamid, Triton® X-100, Triton® X-114, Thesit®, izoridecypoli(etilén-glikol-éter), 3-[(3-kolamidopropil)dimetilammonio]-1-propán-szulfonát (CHAPS), 3-[(3-kolamidopropil)dimetilammonio]-2-hidroxi-1-propán-szulfonát (CHAPSO), vagy N-dodecil-N,N-dimetil-3-ammonio-1-propán-szulfonát.

A fenti találmány szerinti vizsgálati eljárások közül egynél több megvalósítási mód szerint kívánatos lehet akár a B7-4- vagy PD-1-fehérjét, akár a megfelelő célmolekulát immobilizálni, ily módon meggyorsítani a fehérjék egyikének vagy mindegyikének komplexált formájának elválasztását a nem komplexált formáktól, valamint alkalmassá tenni a vizsgálati eljárást automatizálásra. Tesztvegyület kötését B7-4- vagy PD-1-fehérjéhez, vagy B7-4- vagy PD-1-fehérje kölcsönhatását célmolekulával potenciális vegyület jelenlétében és hiányában bármilyen, a reaktánsok befogadására alkalmas edényben elvégezhetjük. Ilyen edények példái közé tartoznak mikrotiterlemezek, kémcsövek, és mikrocentrifuga csövek. Egy megvalósítási mód szerint fúziós fehérjét biztosíthatunk, amely olyan domént ad, amely lehetővé teszi az egyik vagy mindkét fehérje hordozóhoz való kötődését. Például glutation-S-transzferáz/B7-4 vagy PD-1 fúziós fehérjéket vagy glutation-S-transzferáz/célszövet fúziós fehérjéket adszorbeálhatunk *glutation-Sepharose* gyöngyökre (Sigma Chemical, St. Louis, MO), vagy glutationnal módosított mikrotiterlemezekre, amelyeket azután kombinálhatunk a tesztvegyülettel, vagy a tesztvegyülettel és vagy az adszorbeálható célvegyületekkel, vagy B7-4- vagy PD-1-fehérjével, és a keveréket olyan körülmények között inkubáljuk, amely elősegíti a komplex-képződést (például fiziológias só és pH körülmények). Az inkubálást követően a gyöngyöket vagy mikrotiterlemez-mérőhelyeket mossuk a nem kötődött komponensek eltávolítására, gyöngyök esetében a hordozót immobilizáljuk, a komplexet meghatározzuk akár közvetlenül, akár közvetve, például amint azt fent leírtuk. Más megoldásként a komplexet disszociálthatjuk a hor-

dozóról, és a B7-4- vagy PD-1-kötés vagy aktivitás szintjét meghatározhatjuk szokásos módszerek alkalmazásával.

Fehérjék hordozókra történő immobilizálására szolgáló egyéb eljárásokat is alkalmazhatunk a találmány szerinti szkrinelő vizsgálati eljárásokban. Például akár B7-4- vagy PD-1-fehérjét, akár B7-4- vagy PD-1-célmolekulát immobilizálhatunk biotin és sztreptavidin konjugálásával. Biotinilált B7-4- vagy PD-1-fehérjét vagy célmolekulát biotin-NHS-ből (N-hidroxiszukcinimid) állíthatunk elő a szakterületen jól ismert módszerek alkalmazásával (például biotiniláló reagenskészlet, Pierce Chemicals, Rockford, IL), és immobilizálhatunk sztreptavidinnel bevont 96-mérőhelyes mikrotiterlemez mérőhelyeiben (Pierce Chemical). Más megoldásként B7-4- vagy PD-1-fehérjével vagy célmolekulákkal reagáló, de B7-4- vagy PD-1-fehérje célmolekulához való kötését nem zavaró ellenanyagokat kapcsolhatunk mikrotiterlemez mérőhelyeihez, és nem kötődött célmolekulát vagy B7-4- vagy PD-1-fehérjét ejthetünk csapdába a mérőhelyekben ellenanyag-konjugációval. A GST-immobilizált komplexekre fent leírtak mellett ilyen komplexek detektálására szolgáló eljárások közé tartoznak komplexek immunológiai detektálása B7-4- vagy PD-1-fehérjével vagy célmolekulával reagáló ellenanyagok alkalmazásával, valamint enzimes vizsgálati eljárások, amelyek B7-4- vagy PD-1-fehérjéhez vagy célmolekulához kapcsolt enzimaktivitás detektálásán alapulnak.

Egy alternatív megvalósítási mód szerint a tesztvegyület B7-4- vagy PD-1-fehérje aktivitását moduláló képességének meghatározását a tesztvegyület olyan molekula aktivitását moduláló képességének meghatározásával végezhetjük el, amely a B7-4 reakcióláncában később funkcionál, például olyan molekulával, amely amely kölcsönhat B7-4-gyel, vagy olyan molekulával, amely PD-1 reakcióláncában később funkcionál, például kölcsönhat PD-1 citoplazmatikus doménjával. Például második hírvívők szintjét határozhatjuk meg, kölcsönható molekulának megfelelő célmolekulán való aktivitását határozhatjuk meg, vagy a kölcsönható molekula megfelelő célmolekulához való kötését határozhatjuk meg, amint azt korábban leírtuk.

Egy másik megvalósítási mód szerint B7-4- vagy PD-1-expresszió modulátorait azonosítjuk olyan eljárásban, amely szerint sejteket érintkezésbe hozunk potenciális vegyülettel, és meghatározzuk B7-4- vagy PD-1-mRNS vagy fehérje expresszióját a sejtben. B7-4- vagy PD-1-mRNS vagy fehérje expressziójának szintjét potenciális vegyület jelenlétében összehasonlítjuk B7-4- vagy PD-1-mRNS vagy fehérje expressziójának szintjével potenciális vegyület hiányában. A potenciális vegyületet azután azonosíthatjuk B7-4- vagy PD-1-expresszió modulátoraként ezen összehasonlítás alapján. Például amikor B7-4- vagy PD-1-mRNS vagy fehérje expressziója nagyobb (például statisztikusan szignifikánsan nagyobb) a potenciális vegyület jelenlétében, mint annak hiányában, a potenciális vegyületet B7-4- vagy PD-1-mRNS vagy fehérje expresszió stimulátoraként azonosítjuk. Más megoldásként amikor B7-4- vagy PD-1-mRNS vagy fehérje expressziója kisebb (például statisztikusan szignifikánsan kisebb) a potenciális vegyület jelenlétében, mint annak hiányában, a potenciális vegyületet B7-4- vagy PD-1-mRNS vagy fehérje expresszió inhibitoraként azonosítjuk. B7-4- vagy PD-1-mRNS vagy fehérje expressziójának a szintjét a leírás szerinti, B7-4- vagy B7-4- vagy PD-1-mRNS vagy fehérje detektálására leírt eljárásokkal határozhatjuk meg.

A találmány egy még további megvalósítási módja szerint a B7-4- vagy PD-1-fehérjéket, előnyösen membránkötött formában, alkalmazhatjuk „csali fehérjeként” („bait protein”), kéthibrides vizsgálati eljárásban vagy háromhibrides vizsgálati eljárásban [lásd például 5 283 317. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat]; Zervos és mtsai., *Cell* 72, 223-232. old. (1993); Madura és mtsai., *J. Biol. Chem.* 268, 12046-12054.



old. (1993); Bartel és mtsai., *Biotechniques* 14, 920-924. old. (1993); Iwabuchi és mtsai., *Oncogene* 8, 1693-1696. old. (1993); és Brent, WO 94/10300. számú nemzetközi közzétételi irat], egyéb fehérjék („B7-4 vagy PD-1 kötőfehérjék” vagy „B7-4- vagy PD-1-bp”) azonosítására, amelyek kötődnek PD-1-hez vagy B7-4-hez, vagy kölcsönhatnak azzal, és részt vesznek a B7-4- vagy PD-1-aktiválásban. Ilyen B7-4 vagy PD-1 kötőfehérjék valószínűleg részt vesznek B7-4- vagy PD-1-fehérjék vagy B7-4- vagy PD-1-célmolekulák jeleinek továbbításában is, mint – például – B7-4- vagy PD-1-közvetített jeletovábbítási útvonal korábbi vagy későbbi elemei. Más megoldásként ilyen B7-4 vagy PD-1 kötőfehérjék B7-4 vagy PD-1 inhibitorok is lehetnek.

A kéthibrides rendszer a legtöbb transzkripció faktor moduláris természetén alapul, amelyek elválasztható DNS-kötő és aktivációs doméneket tartalmaznak. Röviden, a vizsgálati eljárásban két különböző DNS-konstrukciót alkalmazunk. Az egyik konstrukcióban a B7-4- vagy PD-1-fehérjét kódoló gén fuzionáltatva van ismert transzkripció faktor (például GAL-4) DNS-kötő doménjéhez. A másik konstrukcióban DNS-szekvenciák könyvtárából származó DNS-szekvencia, amely azonosítatlan fehérjét („préda” vagy „minta”) kódol, van fuzionáltatva az ismert transzkripció faktor aktivációs doménjét kódoló génhez. Ha a „csali” és a „préda” fehérjék képesek kölcsönhatni *in vivo*, B7-4-függő komplexet alkotva, a transzkripció faktor DNS-kötő és aktivációs doménjei közel kerülnek egymáshoz. Ez a közelség lehetővé teszi jelzőgén (például LacZ) transzkripcióját, amely működőképesen van kapcsolva a transzkripció faktorra érzékeny transzkripció szabályozó helyhez. A jelzőgén expresszióját detektálhatjuk, és a működőképes transzkripció faktort tartalmazó sejtkolonliákat izolálhatjuk, és alkalmazhatjuk a klónozott gén előállítására, amely a B7-4- vagy PD-1-fehérjével kölcsönható fehérjét kódolja.

A találmány tárgyát képezik továbbá a fenti szkrínelő vizsgálati eljárásokkal azonosított új szerek. Ennek megfelelően a találmány oltalmi körébe tartozik a találmány szerint azonosított szer további alkalmazása megfelelő állati modellben. Például találmány szerint azonosított szert (például B7-4- vagy PD-1-modulálószert, antiszensz B7-4- vagy PD-1-nukleinsav-molekulát, B7-4- vagy PD-1-specifikus ellenanyagot vagy B7-4- vagy PD-1-kötőpartnert) alkalmazhatunk állati modellben ilyen szerrel történő kezelés hatékonyságának, toxicitásának vagy mellékhatásainak meghatározására. Más megoldásként találmány szerint azonosított szert alkalmazhatunk állati modellben ilyen szer hatásmechanizmusának meghatározására. Ezenkívül a találmány tárgyát képezik a fenti szkrínelő vizsgálati eljárásokkal azonosított új szerek alkalmazása találmány szerinti kezelésekre.

F. Detektáló vizsgálati eljárások

A találmány szerinti cDNS-szekvenciák részleteit vagy fragmenseit (és a megfelelő teljes génszekvenciákat) számos módon alkalmazhatjuk polinukleotid reagensként. Például ezen szekvenciák alkalmazhatók: (i) a megfelelő génjeik térképezésére kromoszómán; és ezáltal genetikai betegséggel kapcsolatos génrégiók helyének meghatározására; (ii) egy egyén azonosítására kisméretű biológiai mintából (szövet-típezés); és (iii) biológiai minta törvényszéki azonosításának segítésére. Ezen alkalmazásokat az alábbi alfejezetekben írjuk le.

1. Kromoszóma-térképezés

Ha egyszer egy gén szekvenciáját (vagy szekvenciájának egy részletét) izoláltuk, ezt a szekvenciát alkalmazhatjuk a gén elhelyezkedésének térképezésére a kromoszómán. Ezt az eljárást kromoszóma-térképezésnek nevezik. Ennek megfelelően találmány szerinti B7-4-nukleotidszekvenciák részleteit vagy fragmenseit alkalmazhatjuk B7-4-gének elhelyezkedésének térképezésére a kromoszómán. B7-4-szekvenciák



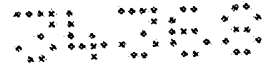
térképezése a kromoszómákra fontos első lépés ezen szekvenciák megfeleltetésének betegséggel kapcsolatos génekkel.

Röviden, B7-4-géneket térképezhetünk a kromoszómákra B7-4-nukleotidszekvenciákból származó (előnyösen 15-25 bázispár hosszúságú) PCR-láncindítók előállításával. B7-4-szekvenciák számítógépes elemzését alkalmazhatjuk olyan láncindítók megjelölésére, amelyek nem ívelnek át egy exonnál nagyobb részt a genomális DNS-ben, ezáltal nem komplikálják az amplifikációs eljárást. Ezen láncindítókat azután alkalmazhatjuk egyedi humán kromoszómákat tartalmazó szomatikus sejthibridek PCR-szkrinelésére. Csak a B7-4-szekvenciáknak megfelelő humán gént tartalmazó hibridek eredményeznek amplifikált terméket.

Szomatikus sejthibrideket különböző állatokból származó szomatikus sejtek fuzionálásával állítunk elő (például humán és egér sejtekből). Ahogy a humán és egér sejtek hibridjei növekednek és osztódnak, fokozatosan véletlenszerű sorrendben elvesztik a humán kromoszómákat, de megtartják az egér kromoszómákat. Olyan tápközeget alkalmazásával, amelyben az egér sejtek nem képesek növekedni, mert hiányzik belőlük egy bizonyos enzim, de a humán sejtek képesek, az az egy humán kromoszóma marad meg, amely tartalmazza a szükséges enzimet kódoló gént. Különböző tápközegek alkalmazásával hibrid sejtvonalak sorozatát lehet létrehozni. A sorozat minden egyes sejtvonala vagy egyetlen humán kromoszómát, vagy kis számú humán kromoszómát tartalmaz, és egér kromoszómák teljes készletét, lehetővé téve egyedi gének könnyű térképezését specifikus humán kromoszómákra [D'Eustachio, P. és mtsai., Science 220, 919-924. old. (1983)]. Humán kromoszómáknak csak fragmentumait tartalmazó szomatikus sejthibrideket is elő lehet állítani transzlokációkat és deléciókat tartalmazó humán kromoszómákkal.

Szomatikus sejthibridek PCR-térképezése gyors eljárás adott szekvencia adott kromoszómához történő hozzárendelésére. Három vagy több szekvencia hozzárendelését végezhetjük el naponta egyetlen PCR-készülékkel. B7-4-nukleotidszekvenciákat alkalmazva oligonukleotid-láncindítók tervezésére, elérhetjük az elhelyezkedés megállapítását specifikus kromoszómák fragmenteinek sorozatával. Egyéb, szekvenciának a kromoszómájához történő térképezésére hasonlóképpen alkalmas térképezési stratégiák közé tartozik az *in situ* hibridizáció [Fan, Y. és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 6223-6227. old. (1990)], előzetes szkrinelés jelölt, áramlással szelektált kromoszómákkal, és előzetes szelekció hibridizációval kromoszóma-specifikus cDNS-klónárákhoz.

DNS-szekvencia fluoreszcens *in situ* hibridizációját (FISH) alkalmazhatjuk továbbá metafázisos kromoszóma-kenethez egy lépésben történő pontos kromoszóma-elhelyezkedés megadására. Kromoszóma-keneteket olyan sejtek alkalmazásával készíthetünk, amelyek osztódását vegyszerrel, mint például kolcemiddel (amely elrontja a mitotikus orsót) gátoltuk a metafázisban. A kromoszómákat röviden kezelhetjük tripszinnel, és azután Giemsa-val festhetjük. Világos és sötét sávok mintázata alakul ki minden egyes kromoszómán, így módon a kromoszómákat egyedileg azonosíthatjuk. A FISH módszert akár 500-600 bázis rövid DNS-szekvenciákkal is alkalmazhatjuk. Azonban 1000 bázisnál hosszabb klónoknak nagyobb a valószínűsége, hogy egyszerű jeldetektáláshoz elegendő jelerősséggel kötődnek egyedi kromoszómális helyhez. Előnyösen 1000 bázis, előnyösebben 2000 bázis elegendő jó eredmény eléréséhez ésszerű idő alatt. Ezen módszer összefoglalására lásd Verma és mtsai., "Human Chromosomes: A Manual of Basic Techniques" című könyvét [kiad.: Pergamon Press, New York (1988)].



Kromoszóma-térképezésre szolgáló reagenseket alkalmazhatunk egyedileg egyetlen kromoszóma vagy a kromoszómán lévő egyetlen hely jelzésére, vagy reagensek sorozatát alkalmazhatjuk több hely és/vagy több kromoszóma jelzésére. A gének nem kódoló régióinak megfelelő reagenseket előnyben részesítjük térképezési célokra. A kódoló szekvenciák valószínűbb, hogy konzerváltak a géncsaládokon belül, ezáltal növelik a kereszthibridizáció az esélyét kromoszóma-térképezés során.

Ha egyszer egy szekvenciát egy pontos kromoszómahelyre térképeztünk, a szekvencia fizikai elhelyezkedését a kromoszómán korrelálhatjuk genetikai térképezési adatokkal. (Ilyen adatokat például McKusick, V., „Mendelian Inheritance in Man” című könyvében találhatunk, amely hozzáférhető on-line a Johns Hopkins University „Welch Medical Library” könyvtárában). Egy ugyanazon kromoszómális régióra térképezett gén és betegség közötti összefüggést azután kapcsolódási elemzéssel azonosíthatunk (fizikailag egymás melletti gének együttes öröklődése), amit például Egeland, J. és mtsai. [Nature 325, 783-787. old. (1987)] írnak le.

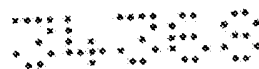
Ezenkívül B7-4-génnel kapcsolatos betegségben érintett és nem érintett egyének közötti DNS-szekvencia-különbségeket is meghatározhatunk. Ha egy mutációt figyelünk meg az érintett egyének némelyikében vagy mindegyikében, de nem a nem érintett egyénekben, akkor a mutáció valószínűleg az adott betegség okosági összetevője. Érintett és nem érintett egyének összehasonlítása általában magában foglalja először a kromoszómák szerkezeti változásainak, mint például deléciók vagy transzlokációk felderítését, amelyek kromoszóma-keneten láthatók vagy detektálhatók PCR alkalmazásával a DNS-szekvencia alapján. Végezetül számos egyén génjének teljes szekvenálását hajthatjuk végre mutáció jelenlétének igazolására, és a mutációk polimorfizmusoktól való megkülönböztetésére.

2. Szövet-tipizálás

A találmány szerinti B7-4-szekvenciákat alkalmazhatjuk egyének azonosítására is kisméretű biológia mintákból. Például az Amerikai Egyesült Államok hadserege restrikciós fragmens hosszúsági polimorfizmus (RFLP) alkalmazását mérlegeli a személyzetének azonosítására. Ebben a módszerben egy egyén genomiális DNS-ét egy vagy több restrikciós enzimmal emésztik, és Southern-bloton tesztelik próbával, azonosításra szolgáló egyedi csíkokat eredményezve. Ennek a módszernek nincsenek meg a „dögcédulák” jelenlegi hátrányai, amelyek elveszhetnek, felcserélhetők vagy ellophatók, a pozitív azonosítást megnehezítve. A találmány szerinti szekvenciák hasznosak RFLP céljára szolgáló további markerekként (amit az 5 272 057. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratban írnak le).

Ezenkívül a találmány szerinti szekvenciákat alkalmazhatjuk alternatív módszer biztosítására egy egyén genomja kiválasztott részleteinek valódi bázisonkénti DNS-szekvenciájának meghatározására. Ezáltal a találmány szerinti B7-4-nukleotidszekvenciákat alkalmazhatjuk a szekvenciák 5' és 3' végéről való két PCR-láncindító előállítására. Ezen láncindítókat azután alkalmazhatjuk egy egyén DNS-ének amplifikálására, és azt követően megszekvenálhatjuk azt.

Egyénekből származó megfelelő DNS-szekvenciák sorozatai, ezen a módon előállítva, egyedi egyéni azonosítást biztosíthatnak, mivel minden egyének egyedi készlete lehet ilyen DNS-szekvenciákból az allélikus különbségek következtében. A találmány szerinti szekvenciákat alkalmazhatjuk ilyen azonosítási szekvenciák előállítására egyénekből és szövetből. A találmány szerinti B7-4-nukleotidszekvenciák egyedileg reprezentálják a humán genom részleteit. Előfordul allélikus variáció ezen szekvenciák kódoló régiójában valamilyen mértékben, és nagyobb mértékben a nem kódoló régiókban. Úgy becsülik, hogy emberi egyének közötti allélikus vari-



áció előfordulásának gyakorisága körülbelül 1 minden 300 bázisra. A találmány szerinti szekvenciák mindegyikét, valamilyen mértékben, alkalmazhatjuk standardként, amellyel egy egyéntől származó DNS-t összehasonlíthatunk azonosítási célból. Mivel nagyobb számú polimorfizmus fordul elő a nem kódoló régiókban, kevesebb szekvencia szükséges egyének megkülönböztetésére. Az 1. vagy 3. azonosítószámú szekvenciák nem kódoló szekvenciái kényelmes pozitív egyéni azonosítást biztosíthatnak talán 10-10000 láncindítóval, amelyek mindegyike 100 bázis hosszúságú nem kódoló amplifikált szekvenciát eredményez. Ha előre megjelölt kódoló szekvenciákat alkalmazunk, pozitív egyéni azonosításra szolgáló láncindítók megfelelőbb száma 500-2000 lenne.

Ha találmány szerinti B7-4-nukleotidszekvenciákból származó reagensek sorozatát alkalmazzuk egyedi azonosítási adatbázis létrehozására egy egyén esetén, ugyanazokat a reagenseket alkalmazhatjuk később az egyénből származó szövet azonosítására. Az egyedi azonosítási adatbázis alkalmazásával elvégezhetjük az egyén, élő vagy halott, pozitív azonosítását rendkívül kis méretű szövetmintákból.

3. Részleges B7-4-szekvenciák alkalmazása törvényszéki biológiában

DNS-alapú azonosítási módszereket alkalmazhatunk törvényszéki biológiában is. A törvényszéki biológia bűntények helyszínén talált biológiai bizonyítékok genetikai tipizálását alkalmazó tudományos terület, például bűntett elkövetőjének pozitív azonosításának eszközeként. Ilyen azonosításhoz PCR-technológiát alkalmazhatunk nagyon kis biológiai mintákból, mint például bűntett helyszínén talált szövetekből, például hajból vagy bőrből, vagy testnedvekből, például vérből, nyálból vagy ondóból származó DNS-szekvenciák amplifikálására. Az amplifikált szekvenciát azután összehasonlíthatjuk standarddal, ezáltal lehetővé téve a biológiai minta eredetének azonosítását.

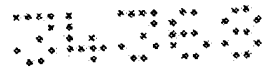
A találmány szerinti szekvenciákat alkalmazhatjuk polinukleotid reagensek, például PCR-láncindítók biztosítására, amelyek a humán genom specifikus lókuszt célozzák, amelyek fokozhatják a DNS-alapú törvényszéki azonosítás megbízhatóságát, például egy másik „azonosítási marker” (azaz egy másik, az adott egyénre nézve egyedi DNS-szekvencia) biztosításával. Mint ahogyan fent említettük, a bázisszekvencia információt alkalmazhatjuk azonosításra, mint restrikciós enzimmel létrehozott fragmensek által alkotott mintázatok pontos alternatíváját. A nem kódoló régiókra célzott szekvenciák különösen megfelelőek erre az alkalmazásra, mivel nagyobb számú polimorfizmus fordul elő a nem kódoló régiókban, könnyebbé téve egyének megkülönböztetését ezen módszer alkalmazásával. Polinukleotid-reagensek példái közé tartoznak a B7-4-nukleotidszekvenciák vagy azok legalább 20 bázispár hosszúságú, előnyösen legalább 30 bázispár hosszúságú részletei.

A találmány szerinti B7-4-nukleotidszekvenciákat alkalmazhatjuk továbbá polinukleotid-reagensek, például jelölt vagy jelölhető próbák biztosítására, amelyeket alkalmazhatunk például *in situ* hibridizációs módszerben, specifikus szövet, például agyszövet azonosítására. Ez nagyon hasznos lehet olyan esetekben, amikor a törvényszéki patológus ismeretlen eredetű szövetet áll szemben. Ilyen B7-4-próbák sorozatát alkalmazhatjuk szövet faj és/vagy szervtípus szerint azonosítására.

Hasonló módon ezen reagensek, például B7-4-láncindítók vagy próbák alkalmazhatók szövettenyésztet szkrinelésére kontaminációra (azaz különböző típusú sejtek jelenlétére való szkrinelésre egy tenyésztetben).

G. Prediktív gyógyászat

A találmány tárgyát képezi a prediktív gyógyászat területe is, amelyben diagnosztikai vizsgálati eljárásokat, prognosztikai vizsgálati eljárásokat és követő klinikai vizsgálatokat alkalmazunk prognosztikus (prediktív) célokra, ezáltal egyén profilaktikus kezelésére. Ennek megfelelően egy megvalósítási mód szerint a talál-



mány tárgyát képezik diagnosztikai eljárások B7-4- vagy PD-1-fehérje és/vagy nukleinsav-expresszió, valamint B7-4- vagy PD-1-aktivitás meghatározására biológiai minta (például vér, szérum, sejtek, szövet) összefüggésében, ily módon meghatározva, hogy egy egyén szenved-e olyan betegségben vagy rendellenességben, vagy veszélyeztetett-e olyan betegség kialakulására, amely abnormalis B7-4- vagy PD-1-aktivitással vagy expresszióval kapcsolatos. A találmány tárgyát képezik továbbá prognosztikus (prediktív) vizsgálati eljárások is annak meghatározására, hogy egy egyén veszélyeztetett-e B7-4- vagy PD-1-fehérjével, nukleinsav-expresszióval vagy aktivitással kapcsolatos betegség kialakulására. Például vizsgálhatunk mutációkat a B7-4- vagy PD-1-génben a biológiai mintában. Ilyen vizsgálati eljárásokat alkalmazhatunk prognosztikus vagy prediktív célból, hogy ezáltal profilaktikusan kezeljünk egyént B7-4-fehérjével, nukleinsav-expresszióval vagy aktivitással jellemzett vagy kapcsolatos rendellenesség kezdetét megelőzően. A találmány szerinti vizsgálati eljárásokat, mint például az előbbi diagnosztikai vizsgálati eljárásokat vagy a következő vizsgálati eljárásokat alkalmazhatjuk spontán abortuszra való hajlam detektálására is.

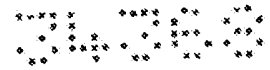
Egy másik megvalósítási mód szerint a találmány tárgya szerek (például drogok, vegyületek) B7-4-aktivitásra gyakorolt hatásának követése klinikai vizsgálatokban.

Ezeket és egyéb szereket további részletességgel leírunk az alábbi fejezetekben.

1. Diagnosztikai vizsgálati eljárások

Biológiai mintában B7-4- vagy PD-1-fehérje vagy nukleinsav jelenlétének vagy hiányának detektálására szolgáló szemléltető eljárás szerint tesztalanytól biológiai mintát veszünk le, és a biológiai mintát érintkezésbe hozzuk B7-4- vagy PD-1-fehérje vagy nukleinsav (például mRNS, genomális DNS) detektálására képes, B7-4- vagy PD-1-fehérjét kódoló vegyülettel vagy szerrel, oly módon, hogy B7-4- vagy PD-1-fehérje vagy nukleinsav jelenlétét detektáljuk a biológiai mintában. Előnyös szer B7-4- vagy PD-1-mRNS vagy genomális DNS detektálására B7-4- vagy PD-1-mRNS-hez vagy genomális DNS-hez hibridizálni képes jelölt nukleinsav-próba. A nukleinsav-próba lehet például humán B7-4- vagy PD-1-nukleinsav, mint például az 1., 3., 10. vagy 11. azonosítószámú szekvencia vagy annak részlete, mint például legalább 15, 30, 50, 100, 250 vagy 500 nukleotid hosszúságú oligonukleotid, amely elegendő ahhoz, hogy sztringens körülmények között specifikusan hibridizáljon B7-4- vagy PD-1-mRNS-hez vagy genomális DNS-hez. Egyéb, találmány szerinti diagnosztikai vizsgálati eljárásokban történő alkalmazásra alkalmas próbákat bemutatunk a leírásban.

B7-4- vagy PD-1-fehérje detektálására előnyös szer B7-4- vagy PD-1-fehérjéhez kötődni képes ellenanyag, előnyösen ellenanyag detektálható jellel. Ellenanyagok lehetnek poliklonálisak, vagy előnyösebben monoklonálisak. Intakt ellenanyagot alkalmazhatunk, vagy annak fragmensét [például Fab-t vagy F(ab')₂-t]. A „jelölt” kifejezés alatti próba vagy ellenanyag vonatkozásában próba vagy ellenanyag közvetlen jelölését értjük detektálható anyagnak próbához vagy ellenanyaghoz történő kapcsolásával (azaz fizikai kötésével), valamint a próba vagy ellenanyag közvetett jelölését egy másik, közvetlenül jelölt reagens reaktivitása útján. Közvetett jelölés példái közé tartozik elsődleges ellenanyag detektálása fluoreszcensen jelölt másodlagos ellenanyag alkalmazásával, és DNS-próba végjelölése biotinnal oly módon, hogy az detektálható fluoreszcensen jelölt sztreptavidinnel. A „biológiai minta” kifejezés alatt alanyból izolált szöveteket, sejteket és biológiai folyadékokat értünk, valamint alanyban jelen lévő szöveteket, sejteket és folyadékokat. Azaz a találmány szerinti detektálási eljárást alkalmazhatjuk B7-4- vagy PD-1-mRNS, fehérje vagy genomális DNS detektálására biológiai min-



tában *in vitro*, valamint *in vivo*. Például B7-4-mRNS *in vitro* detektálására szolgáló módszerek közé tartoznak Northern hibridizációk és *in situ* hibridizációk. B7-4- vagy PD-1-fehérje detektálására szolgáló *in vitro* módszerek közé tartoznak enzimes immunoszorbens vizsgálati eljárások (ELISA), Western-blotok, immunprecipitációk és immunfluoreszcencia. B7-4 vagy PD-1 genomiális DNS detektálására szolgáló *in vitro* eljárások közé tartoznak Southern-hibridizációk. Ezenkívül B7-4- vagy PD-1-fehérje detektálására szolgáló *in vivo* módszerek közé tartozik jelölt B7-4- vagy PD-1-ellenanyag bejuttatása alanyba. Például az ellenanyagot jelölhetjük radioaktív markerrel, amelynek a jelenlétét és elhelyezkedését szokásos leképezési módszerekkel detektálhatjuk az alanyban.

Egy megvalósítási mód szerint a biológiai minta fehérjemolekulákat tartalmaz a tesztalanyból. Más megoldásként a biológiai minta mRNS-molekulákat tartalmazhat a tesztalanyból, vagy genomiális DNS-molekulákat a tesztalanyból. Előnyös biológiai minta alanyból hagyományos eszközökkel izolált szérumból.

Egy másik megvalósítási módban az eljárások szerint továbbá kontroll alanytól származó kontroll biológiai mintát veszünk le, a kontroll mintát érintkezésbe hozzuk B7-4- vagy PD-1-fehérje, mRNS vagy genomiális DNS) detektálására képes vegyülettel vagy szerrel, oly módon, hogy B7-4- vagy PD-1-fehérje, mRNS vagy genomiális DNS jelenlétét detektáljuk a biológiai mintában, és összehasonlítjuk B7-4-fehérje, mRNS vagy genomiális DNS jelenlétét a kontroll mintában a B7-4-fehérje, mRNS vagy genomiális DNS jelenlétével a tesztmintában.

A találmány tárgyát képezik reagenskészletek is B7-4 vagy PD-1 jelenlétének detektálására biológiai mintában. Például a reagenskészlet tartalmazhat B7-4- vagy PD-1-fehérje vagy mRNS biológiai mintában történő detektálására képes jelölt vegyületet vagy szert; a mintában lévő B7-4 vagy PD-1 mennyiségének meghatározására szolgáló eszközt; és a mintában lévő B7-4 vagy PD-1 mennyiségének standarddal történő összehasonlítására szolgáló eszközt. A vegyületet vagy szert alkalmas tartályba csomagolhatjuk. A reagenskészlet tovább tartalmazhat utasításokat a reagenskészlet alkalmazására B7-4- vagy PD-1-fehérje vagy nukleinsav detektálására.

2. Prognosztikus vizsgálati eljárások

A leírás szerinti diagnosztikai eljárásokat továbbá hasznosíthatjuk abnormális B7-4- vagy PD-1-expresszióval és aktivitással kapcsolatos betegségben vagy rendellenességben szenvedő, vagy annak kialakulására veszélyeztetett alanyok azonosítására. Például a találmány szerinti vizsgálati eljárásokat, mint például a megelőző diagnosztikai vizsgálati eljárásokat vagy a következő vizsgálati eljárásokat hasznosíthatjuk B7-4- vagy PD-1-expresszióval és aktivitással kapcsolatos rendellenességben szenvedő, vagy annak kialakulására veszélyeztetett alany azonosítására. Ezáltal a találmány tárgya eljárás abnormális B7-4- vagy PD-1-expresszióval és aktivitással kapcsolatos betegség vagy rendellenesség azonosítására, amely szerint tesztmintát veszünk le alanytól és B7-4- vagy PD-1-fehérjét vagy nukleinsavat (például mRNS-t vagy genomiális DNS-t) detektálunk, és amely szerint B7-4- vagy PD-1-fehérje vagy nukleinsav jelenléte diagnosztikus abnormális B7-4- vagy PD-1-expresszióval és aktivitással kapcsolatos betegségben vagy rendellenességben szenvedő, vagy annak kialakulására veszélyeztetett alanyra. A leírás szerinti értelemben a „tesztminta” kifejezés alatt jelentőséggel bíró alanytól levett biológiai mintát értünk. Például tesztminta lehet biológiai folyadék (például szérum), sejtminta vagy szövet.

Ezenkívül a találmány szerinti prognosztikus vizsgálati eljárásokat alkalmazhatjuk annak meghatározására, hogy alanynak beadhatunk-e szert (például agonistát, antagonistát, peptidomimetikumot, fehérjét, nukleinsavat, kismolekulát, vagy más drogjelöltet) abnormális B7-4- vagy PD-1-expresszióval vagy aktivitással kapcs-

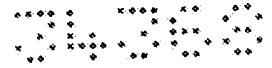


latos betegség vagy rendellenesség kezelésére. Ezáltal a találmány tárgyát képezik eljárások annak megállapításra, hogy alanyt hatékonyan kezelhetünk-e abnormális B7-4- vagy PD-1-expresszióval vagy aktivitással kapcsolatos betegség kezelésére szolgáló szerrel, amely szerint tesztmintát veszünk le és B7-4- vagy PD-1-fehérje vagy nukleinsav-expressziót vagy aktivitást detektálunk (például B7-4-fehérje vagy nukleinsav-expresszió vagy aktivitás nagysága diagnosztikus olyan alanyra, akinek abnormális B7-4- vagy PD-1-expresszióval vagy aktivitással kapcsolatos betegség kezelésére a szert beadhatjuk).

A találmány szerinti eljárásokat alkalmazhatjuk genetikai változások detektálására is a B7-4- vagy PD-1-génben, ily módon meghatározzuk, hogy megváltozott génnel rendelkező alany veszélyeztetett-e B7-4- vagy PD-1-génnel kapcsolatos betegségre nézve. Előnyös megvalósítási módok szerint az eljárások magukban foglalják, alanyból származó sejtmintában, genetikai változás jelenlétének vagy hiányának a detektálását, amit az jellemez, hogy legalább egy változás befolyásolja B7-4- vagy PD-1-fehérjét kódoló gén integritását vagy a B7-4- vagy PD-1-gén hibás expresszióját. Például ilyen genetikai változásokat detektálhatunk az alábbiak közül legalább egy jelenlétének megállapításával: 1) egy vagy több nukleotid deléciója B7-4- vagy PD-1-génből; 2) egy vagy több nukleotid addíciója B7-4- vagy PD-1-génhez; 3) egy vagy több nukleotid szubsztitúciója B7-4- vagy PD-1-génben; 4) B7-4- vagy PD-1-gén kromoszómális átrendeződése; 5) B7-4- vagy PD-1-gén mRNS-transzkriptuma szintjének megváltozása; 6) B7-4- vagy PD-1-gén abnormális módosulása, mint például a genomális DNS metilációs mintázatának megváltozása; 7) B7-4- vagy PD-1-gén mRNS-transzkriptumában nem vad típusú splicing-mintázatának jelenléte; 8) B7-4- vagy PD-1-fehérje nem vad típusú szintje; 9) B7-4- vagy PD-1-gén allélikus elvesztése; és 10) B7-4- vagy PD-1-fehérje nem megfelelő poszttranszlációs módosítása. A leírás szerinti értelemben nagyszámú vizsgálati módszer ismert a szakterületen, amelyet alkalmazhatunk B7-4- vagy PD-1-gén megváltozásának detektálására. Előnyös biológiai minta alanyból hagyományos eszközökkel izolált szövet vagy szérumminta, például szívizomszövet-minta.

Bizonyos megvalósítási módok szerint a megváltozás detektálása magában foglalja próba/láncindító alkalmazását polimeráz láncreakcióban (PCR) (lásd például 4 683 195. és 4 683 202. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratokat), mint például horgonyzó PCR és RACE PCR, vagy, más megoldásként, ligációs láncreakcióban (LCR) [lásd például Landegran és mtsai., *Science* 241, 1077-1080. old. (1988); és Nakazawa és mtsai., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 360-364. old. (1994)], amely utóbbi különösen hasznos pontmutációk detektálására a B7-4- vagy PD-1-génben [lásd például Abrahava és mtsai., *Nucleic Acids Res.* 23, 675-682. old. (1995)]. Ezen eljárás szerint sejtmintát gyűjtünk páciensből, nukleinsavat (például genomális, mRNS-t vagy mindkettőt) izolálunk a minta sejtjeiből, a nukleinsav-mintát érintkezésbe hozzuk egy vagy több láncindítóval, amely specifikusan hibridizál B7-4- vagy PD-1-génhez olyan körülmények között, hogy hibridizáció és a B7-4- vagy PD-1-gén amplifikációja végbemegy (ha jelen van), és detektáljuk amplifikációs termék jelenlétét vagy hiányát, vagy detektáljuk az amplifikációs termék méretét, és összehasonlítjuk kontroll minta hosszúságával. Előre látható, hogy PCR és/vagy LCR alkalmazása kívánatos lehet előzetes amplifikációs lépésként a mutációk detektálására alkalmazott találmány szerinti módszerek bármelyikével együtt.

Alternatív amplifikációs eljárások közé tartoznak: önfenntartó szekvenciareplikáció [Guatelli, J.C. és mtsai., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 1874-1878. old. (1990)]; transzkripció amplifikációs rendszer [Kwoh, D.Y. és mtsai., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 1173-1177. old. (1989)]; Q-béta-replikáz [Lizardi, P.M. és mtsai., *Biotechnology* 6, 1197. old. (1988)]; vagy bármely más nukleinsav-amplifikációs eljárás, majd az



amplifikált molekulák detektálása szakember számára jól ismert módszerek alkalmazásával. Ezen detekciós módszerek különösen hasznosak nukleinsav-molekulák detektálására, ha ilyen molekulák nagyon kis számban vannak jelen.

Alternatív megvalósítási mód szerint B7-4- vagy PD-1-gén mutációit azonosíthatjuk sejtmintából restrikciós enzim hasítási mintázatainak megváltozásaival. Például minta és kontroll DNS-t izolálunk, (adott esetben) amplifikálunk, egy vagy több restrikciós endonukleázzal emésztünk, és meghatározzuk a fragmensek hosszát gélelektroforézissel, és összehasonlítjuk. A fragmensek hosszának különbségei minta és kontroll DNS között jelzik a mutációkat a minta DNS-ben. Ezenkívül szekvenciaspecifikus ribozimokat (lásd például 5 498 531. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratot) alkalmazhatunk specifikus mutációk jelenlétének meghatározására ribozim hasítási hely kialakulásával vagy eltűnésével.

Más megvalósítási módok szerint B7-4 vagy PD-1 genetikai mutációit azonosíthatjuk minta és kontroll nukleinsavak, például DNS vagy RNS hibridizálásával oligonukleotid próbák százait vagy ezreit tartalmazó nagy sűrűségű array-khez [Cronin, M.T. és mtsai., Hum. Mutat. 7, 244-255. old. (1996); Kozal, M.J. és mtsai., Nat. Med. 2, 753-759. old. (1996)]. Például B7-4 vagy PD-1 genetikai mutációit azonosíthatjuk fényel előállított DNS-próbákat tartalmazó kétdimenziós array-ban, amint azt Cronin, M.T. és mtsai. (1996, mint fent) leírták. Röviden, próbák egy első hibridizációs array-ét alkalmazhatjuk DNS hosszú szakaszainak letapogatására mintában és kontrollban, báziseltérések azonosítására a szekvenciák között sorozatos átfedő próbák lineáris array-ének elkészítésével. Ez a lépés lehetővé teszi pontmutációk azonosítását. Ezt a lépést egy második hibridizációs array követi, amely lehetővé teszi specifikus mutációk jellemzését kisebb, specializált próba-array-k alkalmazásával, amelyek komplementerek a detektált mutációk összes variánsához. Mindegyik mutációs array párhuzamos próba-készleteket tartalmaz, az egyik komplementer a vad típusú génnel, és a másik komplementer a mutáns génnel.

Egy még további megvalósítási mód szerint a szakterületen ismert különféle szekvenáló reakciók bármelyikét alkalmazhatjuk a B7-4- vagy PD-1-gén közvetlen szekvenálására, és mutációk detektálására a minta B7-4- vagy PD-1-szekvenciáját a megfelelő vad típusú (kontroll) szekvenciához hasonlítva. Szekvenáló reakciók példái közé tartoznak azok, amelyek a Maxam és Gilbert [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 560. old. (1977)] vagy Sanger [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463. old. (1977)] által kifejlesztett módszereken alapulnak. A tárlmány tárgykörébe tartozik az is, hogy bármilyen automatizált szekvenáló eljárást alkalmazhatunk, amikor végrehajtjuk a diagnosztikai vizsgálati eljárásokat [Biotechniques 19, 448. old. (1995), beleértve tömegspektrometriás szekvenálást, lásd például WO 94/16101. számú nemzetközi közzétételi irat; Cohen és mtsai., Adv. Chromatogr. 36, 127-162. old. (1996); és Griffin és mtsai., Appl. Biochem. Biotechnol. 38, 147-159. old. (1993)].

A B7-4- vagy PD-1-génben lévő mutációk detektálására szolgáló egyéb eljárások közé tartoznak olyan eljárások, amelyekben hasítószer elleni védelmet alkalmazunk hibásan párosodott bázisok detektálására RNS/RNS vagy RNS/DNS heteroduplexekben [Myers és mtsai., Science 230, 1242. old. (1985)]. Általában a szakterületen „mismatch cleavage” néven ismert módszer heteroduplexek biztosításával kezdődik, amelyeket vad típusú B7-4- vagy PD-1-szekvenciát tartalmazó (jelölt) RNS vagy DNS hibridizálásával alkotunk szövetmintából előállított potenciálisan mutáns RNS-sel vagy DNS-sel. A kétszálú duplexeket azután olyan szerrel kezeljük, amely a duplex egyszálú régióit elhasítja, mint például ami a kontroll és minta szál közötti hibás páro-



sodás miatt létezhet. Például RNS/DNS duplexeket kezelhetünk RNázsal, és DNS/DNS hibrideket kezelhetünk S1-nukleázal hibásan párosodott régiók enzimátikus emésztésére. Más megvalósítási módok szerint DNS/DNS vagy RNS/DNS duplexeket hidroxilammal vagy ozmium-tetroxiddal és piperidinnel kezelhetünk hibásan párosodott régiók emésztése érdekében. A hibásan párosodott régiók emésztése után a kapott anyagot azután elválaszthatjuk méret szerint denaturáló poliakrilamid-gélen a mutáció helyének meghatározására. Lásd például Cotton és mtsai., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 4397. old. (1988); Saleeba és mtsai., *Methods Enzymol.* 217, 286-295. old. (1992). Egy előnyös megvalósítási mód szerint a kontroll DNS vagy RNS jelölve, lehet detektálás végetl.

Egy még másik megvalósítási mód szerint a hibásan párosodott hasítási reakcióban egy vagy több olyan fehérjét alkalmazunk, amely hibásan párosodott bázispárokat ismer fel kétszálú DNS-ben (úgynevezett „mismatch repair” enzimek), sejtek mintáiból előállított B7-4- vagy PD-1-cDNS-ekben lévő pontmutációk detektálására és térképezésére szolgáló definiált rendszerekben. Például *E. coli* mutY enzimje A-t hasít G/A hibás bázispárokból, és HeLa-sejtek timidin-DNS-glikoziláza T-t hasít G/T hibás bázispárokból [Hsu és mtsai., *Carcinogenesis* 15, 1657-1662. old. (1994)]. Egy szemléltető megvalósítási mód szerint B7-4-szekvencián alapuló próbát, például vad típusú B7-4- vagy PD-1-szekvenciát hibridizáltatunk tesztsejt(ek)ből származó cDNS-hez vagy más DNS-termékhez. A duplexet DNS mismatch repair enzimmal kezeljük, és a hasítási termékeket, ha vannak, detektálhatjuk elektroforézis protokollokkal, vagy hasonló módon. Lásd például az 5 459 039. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratot.

Más megvalósítási módok szerint elektroforetikus mobilitás megváltozását alkalmazhatjuk mutációk azonosítására B7-4- vagy PD-1-génben. Például egyszálú konformáció polimorfizmust („single strand conformation polymorphism”, SSCP) alkalmazhatunk mutáns és vad típusú nukleinsavak elektroforetikus mobilitása közötti különbségek detektálására [Orita és mtsai., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 2766. old. (1989); lásd még Cotton és mtsai., *Mutat. Res.* 285, 125-144. old. (1993); és Hayashi, *Genet. Anal. Tech. Appl.* 9, 73-79. old. (1992)]. Minta és kontroll B7-4- vagy PD-1-nukleinsavak egyláncú DNS-fragmenseit denaturálhatjuk és hagyhatjuk renaturálódni. Az egyláncú nukleinsavak másodlagos szerkezete változik a szekvenciától függően, ennek eredményeképpen az elektroforetikus mobilitás változása lehetővé teszi akár egyetlen bázis cseréjének a detektálását is. A DNS-fragmenseket jelölhetjük vagy jelölt próbákkal detektálhatjuk. A vizsgálati eljárás érzékenységi fokozhatjuk RNS (inkább mint DNS) alkalmazásával, amelyben a másodlagos szerkezet érzékenyebb a szekvencia változására. Egy előnyös megvalósítási mód szerint az eljárásban heteroduplex elemzést alkalmazunk kétszálú heteroduplex molekulák elválasztására az elektroforetikus mobilitás változásai alapján [Keen és mtsai., *Trends Genet.* 7, 5. old. (1991)].

Egy még további megvalósítási mód szerint mutáns vagy vad típusú fragmensek denaturálószeret tartalmazó poliakrilamid gélben való mozgását vizsgáljuk denaturáló gradiens gélelektroforézis (DGGE) alkalmazásával [Myers és mtsai., *Nature* 313, 495. old. (1985)]. Amikor DGGE-t alkalmazunk elemzési eljárásaként, a DNS-t módosíthatjuk, hogy biztosítsuk, hogy nem denaturálódjon teljesen, például megközelítőleg 40 bp magas olvadáspontú, GC-gazdag GC-kapocs PCR-rel történő hozzáadásával. Egy további megvalósítási mód szerint hőmérsékleti gradienst alkalmazunk a denaturáló gradiens helyett kontroll és minta DNS mobilitása közötti különbségek azonosítására [Rosenbaum és Reissner, *Biophys. Chem.* 265, 12753. old. (1987)].



Pontmutációk detektálására szolgáló egyéb módszerek nem korlátozó példái közé tartozik szelektív oligonukleotid hibridizáció, szelektív amplifikáció vagy szelektív láncindító-kiterjesztés. Például előállíthatunk oligonukleotid-láncindítókat, amelyekben ismert mutációt helyezünk el középen, és hibridizáljuk célzott DNS-hez olyan körülmények között, amelyek csak akkor teszik lehetővé a hibridizációt, ha tökéletes a párosodás [Saiki és mtsai., *Nature* 324, 163. old. (1986); Saiki és mtsai., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 6230. old. (1989)]. Ilyen allélspecifikus oligonukleotidok hibridizálnak PCR-amplifikált célzott DNS-hez vagy számos különböző mutációhoz, amikor az oligonukleotidokat a hibridizáló membránhoz kapcsoljuk és jelölt célzott DNS-sel hibridizáltatjuk.

Más megoldásként szelektív PCR-amplifikációtól függő allélspecifikus amplifikációs technológiát alkalmazhatunk a jelen találmánnyal együtt. Specifikus amplifikációra láncindítóként alkalmazott oligonukleotidok a molekula közepén hordozhatják a jelentőséggel bíró mutációt (tehát az amplifikáció differenciális hibridizációtól függ) [Gibbs és mtsai., *Nucleic Acids Res.* 17, 2437-2448. old. (1989)], vagy az egyik láncindító 3' végén, ahol, megfelelő körülmények között, hibás párosodás megakadályozhatja, vagy csökkentheti a polimeráz általi kiterjesztést [Prossner és mtsai., *Tibtech* 11, 238. old. (1993)]. Ezenfelül kívánatos lehet új restrikciós helyet beépíteni a mutáció régiójába, hasításon alapuló detektálás létrehozására [Gasparini és mtsai., *Mol. Cell Probes* 6, 1. old. (1992)]. Előre látható, hogy bizonyos megvalósítási módok szerint az amplifikációt amplifikációra szolgáló Taq-ligáz alkalmazásával is elvégezhetjük [Barany, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 189. old. (1991)]. Ilyen esetekben csak akkor történhet ligálás, ha tökéletes a párosodás az 5' szekvencia 3' végén, lehetővé téve ismert mutáció jelenlétének detektálását specifikus helyen, amplifikáció jelenlétének vagy hiányának megvizsgálásával.

A leírás szerinti eljárásokat például előre csomagolt diagnosztikai reagenskészletek alkalmazásával hajthatjuk végre, amelyek legalább egy, találmány szerinti próba nukleinsavat vagy ellenanyag reagenst tartalmaznak, amelyet kényelmesen alkalmazhatunk például klinikai körülmények között olyan páciensek diagnosztizálására, akik B7-4- vagy PD-1-génnel kapcsolatos betegség vagy rendellenesség tüneteit vagy családi történetét mutatják.

Ezenkívül bármilyen sejttípust vagy szövetet alkalmazhatunk a találmány szerinti prognosztikai vizsgálati eljárásokban, amelyben B7-4 vagy PD-1 expresszálódik.

VII. B7-4- vagy PD-1-modulálószerek beadása

A találmány szerinti B7-4- vagy PD-1-modulálószereket *in vivo* gyógyászati beadásra alkalmas, biológiailag kompatibilis formában adjuk be alanyoknak, immunsejt által közvetített immunválasz fokozására vagy szuppresszáására. „*In vivo* gyógyászati beadásra alkalmas, biológiailag kompatibilis forma” alatt a beadandó fehérje olyan formáját értjük, amelyben bármilyen toxikus hatásnál lényegesebb a fehérje terápiás hatása. Az alany kifejezés alatt élő organizmusokat értünk, amelyekben immunválasz kiváltható, például emlősszövet. Alanyok példái közé tartoznak emberek, kutyák, macskák, egerek, patkányok, és azok transzgenikus fajtái. Találmány szerinti szer beadása bármilyen gyógyászati formában történhet, beleértve szer gyógyászati aktív mennyiségét egyedül, vagy gyógyászati elfogadható hordozóval együtt.

A találmány szerinti terápia készítmények terápiásan aktív mennyiségének beadását a kívánt eredmény eléréséhez szükséges adagolásban és időszakra hatásos mennyiségként definiáljuk. Például B7-4- vagy PD-1-polipeptid terápiásan aktív mennyisége változhat olyan tényezők függvényében, mint például a betegség stádiuma.



ma, kor, nem, és az egyén testtömege, és a peptid képessége kívánt válasz kiváltására az egyénben. Az adagolási rendeket módosíthatjuk az optimális terápiás válasz biztosítására. Például számos megosztott dózist adhatunk be naponta, vagy a dózist arányosan csökkenthetjük a terápiás helyzet szükségleteinek megfelelően.

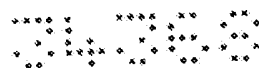
A B7-4- vagy PD-1-modulálószer (például peptidet, nukleinsav-molekulát, ellenanyagot, peptidomimetikumot vagy kismolekulát) hagyományos módon adhatjuk be, mint például injekcióban (például szubkután, intravénás, stb.), orális beadással, inhalálva, transzdermális beadással vagy rektális beadással. A beadás útjától függően a hatóanyagot bevonhatjuk anyaggal, hogy megvédjük a hatóanyagot enzimek, savak és egyéb természetes körülmények hatásától, amelyek inaktívválgatják a hatóanyagot. Például B7-4- vagy PD-1-modulálószer parenterális beadástól eltérő beadására kívánatos lehet a peptidet bevonni, vagy együtt beadni olyan anyaggal, ami megelőzi az inaktíválását.

B7-4- vagy PD-1-modulálószer megfelelő hordozóban, oldószerben vagy adjuvánsban adhatjuk be alanyoknak, együtt adhatjuk be enzim-inhibitorokkal, vagy megfelelő hordozóban, mint például liposzómában. Gyógyászati lag elfogadható oldószerek közé tartozik a sóoldat és vizes pufferoldatok. Az adjuváns kifejezést a legáltalább értelemben alkalmazzuk, és bármilyen immunstimuláns vegyületet magában foglal, mint például interferont. A találmány tárgykörébe tartozó adjuvánsok közé tartoznak rezorcinolok, nemionos felületaktív anyagok, mint például polioxietilén-oleil-éter és n-hexadecil-polietilén-éter. Enzim-inhibitorok közé tartozik pankreatikus tripszin inhibitor, diizopropil-fluorofoszfát (DEEP) és trazilol. Liposzómák közé tartoznak víz-olaj emulziók, valamint hagyományos liposzómák [Sterna és mtsai., *J. Neuroimmunol.* 7, 27. old. (1984)].

A hatóanyagot beadhatjuk parenterálisan vagy intraperitoneálisan is. Diszperziókat is készíthetünk glicerinben, folyékony polietilén-glikolokban, és azok keverékeiben, és olajokban. Tárolás és használat közönséges körülményei között ezen készítmények tartalmazhatnak tartósítószerket is mikroorganizmusok növekedésének megakadályozására.

Injektálható alkalmazásra alkalmas gyógyászati készítmények közé tartoznak steril vizes oldatok (ahol vízzoldható) vagy diszperziók, és steril porok steril injektálható oldatok vagy diszperziók rögtönzött előállítására. Mindenesetre a készítménynek sterilnek kell lennie, és oly mértékben folyékonynak, hogy könnyen fecskendezhető legyen. Stabílnak kell lennie a gyártás és tárolás körülményei között, és tartósítottnak kell lennie mikroorganizmusok, mint például baktériumok és gombák szennyezésével szemben. A hordozó lehet oldószer vagy diszperziós közeg, amely például vizet, etanolt, poliólt (például glicerint, propilén-glikolt és folyékony polietilén-glikolt és hasonlót) tartalmaz, és ezek alkalmas keverékeit. A megfelelő folyékonytságot például bevonószer, mint például lecitin alkalmazásával, diszperzió esetén a szükséges részecskeméret fenntartásával és felületaktív anyagok alkalmazásával tarthatjuk fenn. A mikroorganizmusok hatásának megakadályozását különféle baktériumellenes és gombaellenes szerek, mint például parabének, klorobutanol, fenol, aszkorbinsav, timerozál és hasonló alkalmazásával érhetjük el. Sok esetben előnyös izotóniás szereket, például cukrokat, polialkoholokat, mint például mannitolt, szorbitolt, nátrium-kloridot belefoglalni a készítménybe. Az injektálható készítmény hosszan tartó abszorpcióját úgy érhetjük el, hogy a készítménybe abszorpciót késleltető szert foglunk be, mint például alumínium-monosztearátot és zselatint.

Steril injektálható oldatokat a hatóanyag (például B7-4- vagy PD-1-polipeptid) szükséges mennyiségének alkalmas oldószerbe történő befoglalásával állíthatunk elő szükség szerint egy vagy több, fent felsorolt komponenssel kombinálva, majd steril szűréssel. Általában diszperziókat a hatóanyagnak az alapvető diszperzi-



ős közeget és a fent felsoroltak közül való egyéb szükséges alkotóelemeket tartalmazó steril hordozóba történő befoglalásával állítunk elő. Steril injektálható oldatok készítésére szolgáló steril porok esetében az előállítás előnyös eljárásai vákuumszáritás és fagyaszitva-száritás, ami a hatóanyag (például peptid) és bármilyen további kívánt alkotóelem porát eredményezi azok korábban sterilre szűrt oldatából.

Amikor a hatóanyag megfelelő módon védett, mint ahogyan fent leírtuk, a fehérjét orálisan adhatjuk be, például inert oldószerezrel vagy emészthető, chető hordozóval. A leírás szerinti értelemben a „gyógyászatiilag elfogadható hordozó” kifejezés alatt bármilyen és mindenféle oldószert, diszpergáló közeget, bevonatot, baktériumellenes és gombaellenes szereket, izotóniás és abszorpciót késleltető szereket és hasonlókat értünk. Az ilyen közegek és szerek alkalmazása gyógyászatiilag aktív szerekre jól ismert a szakterületen. Kivéve amilyen mértékben bármilyen hagyományos közeg vagy szer inkompatibilis a hatóanyaggal, annak alkalmazása a terápiás készítményekben a találmány tárgykörébe tartozik. Kiegészítő hatóanyagokat is belefoglalhatunk a készítményekbe.

Különösen előnyös parenterális készítményeket egységdózis formában kiszerezni a beadás könnyűsége és a dózis egységessége végett. A leírás szerinti értelemben egységdózis alakok alatt a kezelendő emlős alanynak megfelelő, egységes dózishoz alkalmas fizikailag elkülönült egységeket értünk; mindegyik egység előre meghatározott, számított mennyiségű hatóanyagot tartalmaz, amely kívánt terápiás hatást hoz létre a szükséges gyógyászati hordozóval együtt. A találmány szerinti egységdózis alakok specifikációját az alábbiak diktálják, és az azoktól közvetlenül függ: (a) a hatóanyag egyedi jellemzői és az elérendő adott terápiás hatás, és (b) ilyen, egyének kezelésére szolgáló hatóanyag kiszerezésének szakterületén inherens korlátok.

A találmány egy megvalósítási módja szerint a B7-4- vagy PD-1-fehérje elleni ellenanyag terápiásan hatásos mennyiségét adjuk be alanyoknak. A leírás szerinti értelemben ellenanyag terápiásan hatásos mennyisége (azaz hatásos dózisa) körülbelül 0,001-től 30 mg/testtömeg-kg-ig, előnyösen körülbelül 0,01-től 25 mg/testtömeg-kg-ig, előnyösebben körülbelül 0,1-től 20 mg/testtömeg-kg-ig, még előnyösebben körülbelül 1-től 10 mg/kg-ig, 2-től 9 mg/kg-ig, 3-től 8 mg/kg-ig, 4-től 7 mg/kg-ig vagy 5-től 6 mg/testtömeg-kg-ig változik. A szakember számára nyilvánvaló, hogy bizonyos tényezők befolyásolhatják az alany hatásos kezeléséhez szükséges adagolást, nem korlátozó jelleggel a betegség vagy rendellenesség súlyossága, korábbi kezelések, az alany általános egészségi állapota és/vagy kora, és egyéb jelenlévő betegségek. Ezenkívül alany kezelése ellenanyag terápiásan hatásos mennyiségével egyetlen kezelést foglalhat magában, vagy előnyösen kezelések sorozatát foglalhatja magában. Egy előnyös példa szerint alanyt körülbelül 0,1 és 20 mg/testtömeg-kg között változó ellenanyaggal kezelünk, hetente egyszer körülbelül 1-10 héten keresztül, előnyösen 2-8 héten keresztül, előnyösebben körülbelül 3-7 héten keresztül és még előnyösebben körülbelül 4, 5 vagy 6 héten keresztül. Az is nyilvánvaló, hogy a kezelésre alkalmazott ellenanyag hatásos dózisa növekedhet vagy csökkenhet egy adott kezelés folyamán. A dózis változása a találmány szerinti diagnosztikai vizsgálati eljárások eredményeinek eredménye lehet.

Szerek (például drogok vagy vegyületek) B7-4- vagy PD-1-fehérje expressziójára vagy aktivitására gyakorolt hatásának követését nem csak drog alapú kutatásokban, hanem klinikai vizsgálatokban is alkalmazhatjuk. Például szer találmány szerinti szkrinelő vizsgálati eljárással meghatározott, B7-4- vagy PD-1-génexpresszió, fehérjeszintek növelésére, vagy B7-4- vagy PD-1-aktivitás serkentő jellegű szabályozására gyakorolt hatékonyságát követhetjük olyan alanyok klinikai vizsgálataiban, akik csökkent B7-4- vagy PD-1-génexpressziót, fehérjeszinteket vagy gátló jellegűen szabályozott B7-4- vagy PD-1-aktivitást mutatnak. Más



megoldásként szer találmány szerinti szkrinelő vizsgálati eljárással meghatározott, B7-4- vagy PD-1-génexpresszió, fehérje szintek csökkentésére, vagy B7-4- vagy PD-1-aktivitás gátló jellegű szabályozására gyakorolt hatékonyságát követhetjük olyan alanyok klinikai vizsgálataiban, akik megnövekedett B7-4- vagy PD-1-génexpressziót, fehérjeszinteket vagy serkentő jellegűen szabályozott B7-4- vagy PD-1-aktivitást mutatnak. Ilyen klinikai vizsgálatokban B7-4- vagy PD-1-gén, és előnyösen a betegséggel járó más gének expresszióját vagy aktivitását alkalmazhatjuk adott sejt fenotípusa kimenő jeleként vagy markereként.

Például, és nem korlátozó jelleggel, olyan géneket azonosíthatunk (például találmány szerinti szkrinelő vizsgálati eljárás alkalmazásával), beleértve B7-4-et vagy PD-1-et, amelyeket modulálva vannak sejtekben B7-4- vagy PD-1- aktivitást moduláló szer (például vegyület, drog vagy kismolekula) által. Ezáltal szerek B7-4-gyel vagy PD-1-gyel kapcsolatos rendellenességekre gyakorolt hatásának tanulmányozására, például klinikai vizsgálatokban, sejteket izolálhatunk és RNS-t állíthatunk elő és elemezhetünk B7-4- vagy PD-1-, és egyéb, B7-4-gyel vagy PD-1-gyel kapcsolatos rendellenességekkel járó gének expressziójának szintjére. A génexpresszió szintjét (azaz génexpressziós mintázatot) mennyiségileg Northern-blot elemzéssel vagy RT-PCR-rel határozhatjuk meg a leírás szerint, vagy más megoldásként a termelt fehérje mennyiségének mérésével, a találmány szerinti eljárások egyikével, vagy B7-4- vagy PD-1- vagy egyéb gének aktivitása szintjének mérésével. Ily módon a génexpressziós mintázat markerként szolgálhat, jelezve a sejtek szerre adott fiziológiás válaszát. Ennek megfelelően ezt a választ meghatározhatjuk az egyén szerrel történő kezelése előtt, és különböző időpontokban a kezelés során.

Egy előnyös megvalósítási mód szerint a találmány tárgya eljárás alany szerrel (például találmány szerinti szkrinelő vizsgálati eljárással azonosított agonistával, antagonistával, peptidomimetikummal, fehérjével, peptiddal, nukleinsavval, kismolekulával vagy más drogjelölttel) történő kezelése hatékonyságának követésére, amely szerint (i) beadás előtti mintát veszünk le alanytól a szer beadását megelőzően; (ii) detektáljuk B7-4- vagy PD-1-fehérje, mRNS vagy genomális DNS expressziójának szintjét a beadás előtti mintában; (iii) egy vagy több beadás utáni mintát veszünk le az alanytól; (iv) detektáljuk a B7-4- vagy PD-1-fehérje, mRNS vagy genomális DNS expressziójának szintjét a beadás utáni mintákban; (v) összehasonlítjuk a beadás előtti mintában lévő B7-4- vagy PD-1-fehérje, mRNS vagy genomális DNS expressziójának vagy aktivitásának szintjét a beadás utáni mintában vagy mintákban lévő B7-4- vagy PD-1-fehérje, mRNS vagy genomális DNS expressziójával vagy aktivitásával; és (vi) ennek megfelelően megváltoztatjuk a szer beadását az alanynak. Például a szer megnövelt beadása lehet kívánatos B7-4 vagy PD-1 expressziójának vagy aktivitásának növelésére a detektáltnál magasabb szintre, azaz a szer hatékonyságának növelésére. Más megoldásként a szer csökkent beadása lehet kívánatos B7-4 vagy PD-1 expressziójának vagy aktivitásának csökkentésére a detektáltnál alacsonyabb szintre, azaz a szer hatékonyságának csökkentésére. Egy ilyen megvalósítási mód szerint B7-4- vagy PD-1-expressziót vagy aktivitást alkalmazhatunk a szer hatékonyságának indikátoraként, még megfigyelhető fenotípusos válasz hiányában is.

A találmányt tovább illusztráljuk az alábbi példákkal, amelyek nem tekintendők korlátozóknak. Az összes, ezen bejelentésben idézett hivatkozás, szabadalom és nyilvánosságra hozott szabadalmi bejelentés, valamint az ábrák és a szekvencialista hivatkozás útján a kitanítás részét képezi.

1. példa. B7-4-cDNS-molekulák izolálása

Humán B7-4 extracelluláris doménjének fehérjeszekvenciáját alkalmaztuk nyilvános adatbázisok keresésére homológ polipeptideket kódoló nukleinsav-molekulák után. Az EST-adatbázisban két átfedő szekvenciát



azonosítottunk, az AA292201 és AA399416 jelűt. Ezen szekvenciákat alkalmaztuk teljes hosszúságú B7-4-cDNS-ek izolálására humán aktivált keratinocitákból és méhlepény cDNS-klontárakból az alábbiak szerint.

5'-CAGCTATGGTGGTGCCGACTACAA-3' (5. azonosítószámú szekvencia) és 5'-AGGTGCTAGGGGACAGTGTAGACA-3' (6. azonosítószámú szekvencia) szekvenciájú oligonukleotidokat szintetizáltunk ezekből az EST-kből. Ezen oligonukleotidokat alkalmaztuk PCR-reakció indítására follikuláris limfómás eset lépjéből, aktivált B-sejtekből, INF- γ -val aktivált keratinocitákból, normális lépből és méhlepényből származó mRNS-ek reverz transzkripciójával készített cDNS-templát alkalmazásával. A reakciókörülmények az alábbiak voltak: 94°C, 1 perc; 94°C, 30 másodperc, 56°C, 30 másodperc, 68°C, 1 perc, 30 vagy 35 cikluson keresztül; 68°C, 3 perc, majd 4°C tartva. Az összes templát a várt méretű, 389 bázispár hosszúságú csíkot adta. Az INF- γ -val aktivált keratinocitákból származó 389 bázispár hosszúságú PCR-terméket agarózgélelektroforézissel megtisztítottuk, és 0,12 ng-ot alkalmaztunk templátként 0,05 mM biotin-21-dUTP-t és a fenti láncindítókat tartalmazó PCR-reakcióban. A reakciókörülmények az alábbiak voltak: 94°C, 1 perc; 94°C, 30 másodperc, 56°C, 30 másodperc, 68°C, 2 perc, 20 cikluson keresztül; 68°C, 5 perc, majd 4°C tartva. A biotinilált PCR-terméket *Nucleospin* oszlopon (Clontech) tisztítottuk, és próbaként alkalmaztuk a *ClonCapture cDNS selection* eljárásban (Clontech). 60 ng denaturált, biotinilált PCR-terméket inkubáltunk 2 mM CoCl₂, 1 X RecA-pufferrel, 1 μ g RecA-fehérjével, 1X ATP-vel 30 μ l végtérfogatban. A reakcióelegyet 37°C-on inkubáltuk 15 percen keresztül. A reakcióelegyhez 0,7 μ g aktivált keratinocita cDNS-klontárból származó és 0,4 μ g humán méhlepény cDNS-klontárból származó plazmid DNS-t adtunk, és folytattuk az inkubálást 20 percen keresztül. 50 ng EcoRV-vel emésztett lambda DNS-t adtunk a reakcióhoz és 5 percen keresztül inkubáltuk. 0,6 μ l 10% SDS-t és 5,6 μ g proteináz-K-t adtunk hozzá, és 37°C-on inkubáltuk 10 percen keresztül. A proteináz-K-t 1 μ l 0,1 M PMSF hozzáadásával inaktívtuk. Mágneses sztreptavidin-gyöngyöket előinkubáltunk 5 mg lazacsperma-DNS-sel 10 percen keresztül, és a gyöngyöket mágnessel befogtuk, a felülúszót eltávolítottuk, és a gyöngyöket újrakészítésszuspendáltuk 30 μ l kötőpufferben (1 mM EDTA, 1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5). A gyöngyöket hozzáadtuk a reakcióhoz, és a reakcióelegyet 30 percen keresztül inkubáltuk szobahőmérsékleten gyengéd kevertetéssel. A gyöngyöket mágnessel befogtuk, és a felülúszót eltávolítottuk. A gyöngyöket megmostuk 1 ml mosópufferrel (1 mM EDTA, 2 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5), mágnessel befogtuk és a felülúszót eltávolítottuk. A mosást háromszor megismételtük. 1 ml steril vizet adtunk a mosott gyöngyökhöz, 5 percen keresztül inkubáltuk 37°C-on, a gyöngyöket mágnessel befogtuk, és a felülúszót eltávolítottuk. A befogott DNS-t 0,1 ml elúciós puffer (1 mM EDTA, 0,1 N NaOH) hozzáadásával eluáltuk, 5 percen keresztül inkubáltuk szobahőmérsékleten, a gyöngyöket mágnessel befogtuk, és a felülúszót eltávolítottuk és új csőben félretettük. 22,5 μ l, hordozót és pH-semlegesítőket tartalmazó kicsapási elegyet adtunk hozzá 2,5-térfogat etanollal együtt. A plazmid-DNS-t centrifugálással koncentráltuk és vízben újra feloldottuk. A plazmid-DNS-t újra bejuttattuk *E. coli* DH10B/P3-sejtekbe elektroporációval, és 7,5 μ g/ml tetraciklint és 25 μ g/ml ampicillint tartalmazó LB-csészéken szelektáltuk. A kolóniákat áttemeltük *Nytran*-szűrőkre, és ³²P-vel jelölt, 5'-CAGCTATGGTGGTGCCGACTACAA-3' (7. azonosítószámú szekvencia), 5'-AGGTGCTAGGGGACAGTGTAGACA-3' (8. azonosítószámú szekvencia) és 5'-TCGCTTGTAGTCGGCACCACCATA-3' (9. azonosítószámú szekvencia) szekvenciájú oligonukleotidokkal hibridizáltuk. Mindegyik oligó az AA292201 szekvenciából származott. A végső mosás körülményei 2X SSC,



0,1% SDS, 55°C, 20 perc voltak. A két hibridizáló kolóniát felszedtük, és a cDNS-inzertek szekvenciáját meghatároztuk.

A szekvenálás B7-4-molekulák két formáját tárta fel. Az első forma, a szekretált B7-4 (B7-4S) olyan fehérjét kódol, amelynek rövid hidrofíli doménja van membránhorgony nélkül. Ezen forma nukleotid- és aminosav-szekvenciáját sorrendben az 1. és a 2. azonosítószámú szekvencia mutatjuk be. A második forma, a membrán B7-4 (B7-4M) olyan fehérjét kódol, amelynek transzmembrán és rövid citoplazmatikus doménja van. Ezen forma nukleotid- és aminosav-szekvenciáját sorrendben az 3. és a 4. azonosítószámú szekvencia mutatjuk be. A B7-4-család mindkét azonosított tagjának van szignálszekvencia-, IgV- és IgC-doménje, amint azt a 3. és 4. ábrán bemutatjuk. A B7-4M formának megközelítőleg 21% az aminosav-azonossága humán B7-1-hez, és körülbelül 20% az aminosav-azonossága humán B7-2-höz, amint azt az alapértelmezett Blosum62-mátrixszal, és 11-es 'existence' és 1-es 'extension' értékekkel kiszámítottuk (lásd <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), olyan körülmények között, ahol a B7-1-nek és B7-2-nek körülbelül 26% az azonosága.

2. példa. B7-4-mRNS expressziója: Northern-blot elemzés

A B7-4 oldható formája mRNS-ének a megjelölt mérete körülbelül 1,2 kb, bár más méretek is lehetségesek. A második forma mRNS-e körülbelül 3,8 kb méretű, 1,6 és 6,5 kb méretű kisebb jelentőségű mRNS-ekkel.

Elemztük B7-4-poliipeptidek expresszióját. RNS-t állítottunk elő guanidín-tiocianátos homogenizációval és cézium-kloridos centrifugálással. RNS egyenlő mennyiségeit (megközelítőleg 2 µg poli(A)⁺RNS-t) elektroforetizáltunk agarózgélben, blotoltunk, és hibridizáltunk ³²P-vel jelölt B7-4-cDNS olyan részlethez, amely közös a B7-4S és B7-4M formákban. Ezen B7-4-mRNS-ek magas szinten expresszálódnak méhlepényben, tüdőben és szívben, és közepes szinten expresszálódnak csecsemőmirigyben. Ezenfelül ezen B7-4-mRNS-ek alacsony szinten expresszálódnak vázizomban, vesében, hasnyálmirigyben, prosztatában, herében, petefészekben, vékonybélben, vastagbélben és perifériás vér fehérvérsejtjeiben. Továbbá azt találtuk, hogy nagyon gyengén expresszálódnak májban és agyban. B7-4-mRNS-ek nem expresszálódtak stimulálatlan monocitákban, de erősen indukálódtak IFN-γ hatására. Hasonlóképpen azt találtuk, hogy ezen polipeptidek expressziója indukálódott keratinocitákban TPA/IFN-γ által és dendritikus sejtekben IFN-γ által. Ezen B7-4-mRNS-ek nem expresszálódtak stimulálatlan B-sejtekben, de Ig-keresztkeződés indukálta őket.

Ezen B7-4-mRNS-ek expresszióját megvizsgáltuk különféle sejtvonalakban is. Azt találtuk, hogy nem expresszálódnak B-sejt-vonalakban, mint például Raji, Ramos, LBL, Nalm 6 és DHL-4 sejtvonalakban. Szintén nem expresszálódtak T-sejt-vonalakban, mint például Jurkat, Rex, CEM, HPB-ALL, Peer4 és H9 sejtvonalakban, vagy HTLV-1-gyel transzformált T-sejt-vonalakban, mint például SPP és MT2 sejtvonalban, vagy az U937 mieloid vonalban.

3. példa. B7-4-mRNS expresszió további jellemzése: Northern-blot elemzés

Egér és humán többszörös szöveti Northern blotokat (Clontech, Palo Alto, CA) próbáltunk ³²P-dCTP-vel radioaktívan jelölt cDNS-próbákkal *QuikHyb*-ben (Stratagene, La Jolla, CA) a gyártó utasításai szerint. A humán B7-4-próba az 1. azonosítószámú szekvencia kódoló régióját és 3' nem transzlálódó régióját felölelő cDNS 1 kb hosszúságú BamHI/NotI fragmensét tartalmazta. Az egér B7-4-próba a kódoló régió 300 bázispár hosszúságú cDNS-fragmensét tartalmazta. A kontroll aktin-próbák a Clontech cégtől származtak. A blotokat

kétszer mostuk szobahőmérsékleten 2X SSC, 0,1% SDS-ben, majd 0,2X SSC, 0,1% SDS-ben 65°C-on, és autordiográfiával vizsgáltuk.

A B7-4-mRNS magas szinten expresszáldott szívben, emberi méhlepényben és emberi magzati májban, és alacsonyabb szinten lépben, nyirokcsomókban, csecsemőmirigyben és egér májban.

A B7-4-mRNS expresszáldott különféle transzformált egér sejtvonalakban, köztük PU5-1.8, RAW 264.7, K-Balb, M-MSV-Balb/3T3, Hepa 1-6, R1.1, L1210, P38D1, P815 és NB41A3 sejtekben.

4. példa. B7-4-mRNS expresszió további jellemzése: Kvantitatív PCR, Genechip hibridizáció és RNS-blot elemzés

Megvizsgáltuk B7-4-mRNS expresszióját antigénprezentáló sejteken, és összehasonlítottuk B7-1 és B7-2 expressziójával a sejteken. Kvantitatív PCR-elemzés céljából sejtes RNS-t dezoxiribonukleázal kezeltünk, újraextraháltuk és cDNS első szállá alakítottuk át. A FAM(6-karboxifluoreszcein)-nel jelölt humán B7-4, B7-1, B7-2, és GAPDH próbákat a PE Biosystems cégtől szereztük be [B7-4: 5'-GCCGAAGTCATCTGGACAAG-3' (a 13. azonosítószámú szekvencia) és 5'-TCTCAGTGTGCTGGTCACAT-3' (14. azonosítószámú szekvencia) láncindítók, 5'-FAM-CACCACCACCAATTCCAAGA-3' (15. azonosítószámú szekvencia) próba; B7-1: 5'-ACGTGACCAAGGAAGTGAAAGAA-3' (16. azonosítószámú szekvencia) és 5'-TGCCAGCTCTTCAACAGAAACAT-3' (17. azonosítószámú szekvencia) láncindítók, 5'-FAM-TGGCAACGCTGTCTGTGGTCAC-3' (18. azonosítószámú szekvencia) próba; B7-2: 5'-GGGCCGCACAAGTTTTGAT-3' (19. azonosítószámú szekvencia) és 5'-GCCCTTGTCTTGTGATCTGAAGA-3' (20. azonosítószámú szekvencia) láncindítók, 5'-FAM-CGGACAGTTGGACCCTGAGACTTCACA-3' (21. azonosítószámú szekvencia) próba].

A PCR-reakciókat 96-mérőhelyes mikrotiterlemezben állítottuk össze a Perkin Elmer *TaqMan™ EZ kit*-ből való reagensek alkalmazásával, a gyártó utasításai szerint. Mind a négy elemzett génre standard görbékét állítottunk fel. PCR 40 ciklusát futtatuk le *ABI Prism 7700 Sequence Detector* készülékben, és a GAPDH-t alkalmaztuk a B7-4, B7-1 és B7-2 eredmények normalizálására.

Az Affymetrix Mu19KsubA chip-et alkalmaztuk *Genechip* hibridizációs elemzésre. Az egér B7-4 részletének szekvenciáját a „The Institute for Genomic Research” TC17781 jelű expresszált szekvenciácímke reprezentálja ezen a chip-en. Az RNS-izolálást, chip hibridizációt és letapogatást a [Byrne, M. C. és mtsai., *Curr. Prot. Mol. Biol. Suppl.* 49, 22.2.1-22.2.13. old. (2000)] irodalmi helyen leírtak szerint végeztük.

Az RNS-blot hibridizációhoz az 1,6 kb humán és 3,6 kb egér B7-4-cDNS-t *XbaI* enzimmel történő emésztéssel vágtuk ki, és γ -³²P-ATP-vel és DNS-polimeráz-I Klenow-fragmensével véletlenszerűen jelöltük. Az RNS-blotokat a [Freeman, G. J. és mtsai., *J. Immunol.* 149, 3795-3801. old. (1992)] cikkben leírtak szerint hibridizáltuk.

Humán dendrikus sejteket perifériás vérből állítottunk elő. Monocitákat *Ficoll*-gradiensén történő frakcionálás után izoláltunk. A nemadherens sejteket eltávolítottuk, és a fennmaradó sejteket 150 ng/ml humán GM-CSF-ben (R&D Systems) és 100 ng/ml humán IL-4-ben (R&D Systems) tenyésztettük 2 napon keresztül. A nemadherens dendrikus sejteket izoláltuk (CD80⁺ CD86⁺ HLA-DR⁺ CD54⁺ CD58⁺ CD1a⁺), és tenyésztettük egyedül GM-CSF-ben vagy aktiváltuk GM-CSF-sel, 2,5 µg/ml LPS-sel (Sigma Chemicals) és 10 ng/ml humán interferon-γ-val. Az aktiválás után 4 órával és 20 órával a sejteket begyűjtöttük, és RNS-t izoláltunk az *RNeasy kit* (Qiagen) alkalmazásával.



Egér csontvelői monocitákat immundepletáltunk granulocitáktól, limfocitáktól és Ia^+ -sejtektől mágnesesen aktivált sejtválogatással, és petri-csészékben tenyésztettük GM-CSF-fel és IL-4-gyel. A dendrikus sejteket nemadherens sejtekként gyűjtöttük be 7 nap tenyésztés után, és demonstráltuk, hogy azok 75-80%-ban $CD11c^+$, Ia^+ sejtek. A sejteket LPS-sel és humán interferon- γ -val aktiváltuk.

Humán vér monocitákban történő expresszió elemzése RNS-blot hibridizációval demonstrálta, hogy a B7-2 nem expresszálódik stimulálatlan monocitákban, de gyorsan serkentő jellegűen szabályozódik interferon- γ -kezelés hatására. Monociták kezelése egy másik gyulladást elősegítő citokinnel, tumornekrózis faktorral (TNF- α) alacsony szintű indukcióhoz vezetett, ahhoz hasonlóhoz, amit csak tápközzeggel kaptunk, feltehetően a műanyaghoz történő tapadás eredményeképpen. A 4,2 kb méretű fő B7-4-mRNS mellett egy 1,8 kb méretű kisebb B7-4-mRNS-t is megfigyeltünk interferon- γ -val kezelt monocitákban. Humán B-sejtek B7-4 expressziójának sejtfelszíni immunglobulin keresztkötés általi, de nem a Raji-sejtvonal általi aktiválását is megfigyeltük. Hasonlóképpen B7-1 nem expresszálódik stimulálatlan monociták által, de serkentő jellegűen szabályozott interferon- γ hatására, B7-4-expresszióhoz hasonló kinetikával. Ezzel ellentétben a B7-2-mRNS konstitutíven expresszálódik monocitákban, és a szintjét nem befolyásolja interferon- γ - vagy TNF- α -kezelés.

A B7-4-, B7-1-, és B7-2-mRNS expresszióját is megfigyeltük humán dendrikus sejtek által kvantitatív PCR-rel. Humán perifériás-vér-eredetű dendrikus sejteket kezeltünk granulocita-makrofág kolónia-stimuláló faktorral (GM-CSF) egyedül, vagy GM-CSF-fel, lipopoliszachariddal (LPS) és interferon- γ -val aktiváltuk azokat. Az LPS- és interferon- γ -aktiválás eredményeképpen a B7-4-mRNS gyorsan indukálódott, 16-szorosra növekedve 4 óra alatt, és 34-szeresre 20 óra alatt, a nemindukált sejtekhez viszonyítva. A B7-1- és B7-2-mRNS-ek is indukálódtak aktiválás hatására: A B7-1 21-szeresre indukálódott 4 óra alatt, és 22-szeresre 20 óra alatt. A B7-2 kis indukálást mutatott 4 óránál; azonban az expresszió 5-szörösre indukálódott 20 óra alatt. LPS-sel és interferon- γ -val kezelt csontvelő-eredetű dendrikus sejtek B7-4 expresszióját *Genechip*TM hibridizáció alkalmazásával vizsgáltuk. A B7-4-expressziója ezekben a sejtekben a humán dendrikus sejtekben megfigyelthez hasonló mintázatot követ: a B7-4-mRNS 5-szörösére indukálódott az indukálatlan sejtekhez hasonlítva 6 és 20 órával az indukálás után. Ezen adatok azt demonstrálják, hogy a B7-4 expresszálódik antigénprezentáló sejtek és limfociták által, és B7-1-hez és B7-2-höz hasonló módon indukálódik dendrikus sejteken. Humán keratinociták forbolészterrel és interferon- γ -val történő kezelése szintén indukálta a B7-4-et.

Egér szövetekben egy körülbelül 3,7 kb méretű B7-4-mRNS-transzkriptumot detektáltunk northern-blot elemzéssel. Az egér B7-4-mRNS eloszlása nagyon hasonlít a humán B7-4-ére, magas szintű expresszióval szívben, csecsemőmirigyben és tüdőben, és alacsony szinttel vesében, lépben és májban.

5. példa. B7-4 kromoszómális elhelyezkedése

A B7-4-gének kromoszómális elhelyezkedését monokromoszómális blottal határoztuk meg a Quantum cégtől (Toronto, Canada) kereskedelmi forgalomban kapható reagenskészlet alkalmazásával. A blotokat olyan szekvenciával próbáltuk, amely felismeri mind a B7-4S-, mind a B7-4M-szekvenciát. Ezen eljárás alkalmazásával a B7-4-poliptideket a 9. humán kromoszómára lokalizáltuk, míg a B7-1-et és B7-2-t a 3. humán kromoszómára lokalizáltuk. A butirofilineket, amelyek korlátozott mértékű aminosav-azonosságot mutatnak a B7-4-családdal, a fő hisztokompatibilitási komplexhez lokalizáltuk a 6. kromoszómára. A B7-4 kromoszómális lokalizációját B7-4-specifikus lánccindítók alkalmazásával igazoltuk a Quantum Technologies cégtől (Canada) beszerezhető monokromoszómális szomatikus hibrid DNS-templátok PCR-jével.



6. példa. B7-4-molekulák kötődése T-sejtes ligandumokhoz vagy ellenanyagokhoz

COS-sejteket transzfektáltunk vektor DNS-sel (pcDNA1) vagy B7-4M-cDNS-t tartalmazó expressziós plazmiddal. 72 óra elteltével a transzfektált COS-sejteket leválasztottuk 0,5 mM EDTA-t tartalmazó PBS-ben történő inkubálással 30 percen keresztül 37°C-on.

Teszteltük B7-4M-et expresszáló COS-sejtek kötőképességét különféle T-sejt-receptorokhoz és ellenanyagokhoz. B7-4M-mel transzfektált COS-sejtek CD28Ig, CTLA4-Ig és kontroll Ig kötődésének FACS-elemzése azt mutatta, hogy sem a CD28Ig, sem a CTLA4-Ig nem kötődött B7-4-hez (8. ábra). B7-4-et expresszáló COS-sejtek IgG-hez és egér ICOS-his fúziós fehérjéhez való kötőképességét is teszteltük. Nem detektáltuk humán B7-4 kötődését egér ICOS-hoz (9. ábra). Amint azt a 10. ábrán bemutatjuk, a FACS-elemzés BB1 (anti-B7-1 és anti B7-3) kötését tárta fel B7-4-tel transzfektált COS-sejtekhez, de IgM vagy 133-ellenanyagok (anti B7-4) kötését nem.

7. példa. T-sejt-proliferáció kostimulációja B7-4-molekulákkal

Teszteltük B7-4-polipeptidok képességét humán T-sejt-proliferáció kostimulációjára. Humán CD28⁺ T-sejteket izoláltunk immunmágneses gyöngyökkel történő depléciával, B-sejtek, természetes ölősejtek és makrofágok elleni monoklonális ellenanyagok alkalmazásával, amint azt korábban leírták [Gimmi, C.D., és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 6586-6590. old. (1993)]. B7-4-gyel és vektorral tB7-4-gyel és vektorral transzfektált COS-sejteket 72 órával a transzfekeció után begyűjtöttünk, 1 óráan keresztül inkubáltunk 25 µg/ml mitomicin-c-vel, majd azután alaposan mostunk. 10⁵ naív T-sejtet lemezhez kötött anti-CD3 monoklonális ellenanyaggal stimuláltunk, plusz 20000 mitomicin-c-vel kezelt COS-sejtet transzfektáltunk a jelzett DNS-konstrukciókkal.

A T-sejt-proliferációt a 72 órás inkubáció utolsó 12 órájka alatt beépült ³H-timidin (1 µCi) mennyiségével mértük. Amint azt a 11. és 12. ábrán bemutatjuk, a B7-4-et expresszáló COS-sejtek képesek T-sejt-proliferáció kostimulációjára.

8. példa. B7-4 elleni egér ellenanyagok előállítás

A teljes egér vagy humán B7-4-cDNS-t tartalmazó emlős expressziós vektorokat (pEF6 vagy pcDNA3.1 [Invitrogen]) állítottunk elő. A cDNS/vektor konstrukciót 0,9%-os sóoldatban oldottuk fel 1 mg/ml koncentrációban (nem TE-ben vagy PBS-ben).

Az immunizálás előtt 78 µl, 0,9%-os sóoldatban feloldott 1 mg/ml kardiotoxint (Sigma #C-1777) injektáltunk az immunizálandó egerek mindegyik hátsó lábának elülső tibiális izmába. Azután az összes egeret nyugton hagytuk 5 napon keresztül.

Az egerek elaltatása után 50 µl 1 mg/ml koncentrációjú tisztított B7-4-cDNS/vektor konstrukciót (0,9%-os sóoldatban) injektáltunk mindegyik regenerálódó elülső tibiális izomba.

Az ellenanyag-titereket megközelítőleg 6 nappal az immunizálás után mértük szokásos eljárások alkalmazásával, például ELISA vizsgálati eljárásban. A cDNS-immunizálást minden 2-4 hétben megismételtük három cikluson keresztül (amíg az ellenanyag-titer >1:10000 lett). Azután az egereknek megerősítő oltásokat adtunk PDL-1-gyel transzfektált CHO-sejtekkel.



A megfelelő ellenanyag-titerrel rendelkező egerekből izolált lépsejteket begyűjtöttük. A lépsejteket azután SP2-0 fúziós partnerekhez fuzionáltattuk hibridómákat létrehozva. A hibridómákat és ellenanyagokat szokásos eljárások alkalmazásával manipuláljuk [lásd például „Antibodies: A Laboratory Manual”, szerk.: Harlow, E. és Lane, D., kiad.: Cold Spring Harbor Laboratory (1988), amely hivatkozás útján a kitanítás részét képezi].

A szkrináló vizsgálati eljárásokban kisselektált ellenanyagok között volt a 2A3, 10D9, 5A9 és 11D12 jelű. Azt találtuk, hogy ezen ellenanyagok kötődtek humán B7-4-gyel transzfektált COS- és CHO-sejtekhez, és nem kötődtek kontroll transzfektált sejtekhez vagy egér B7-4-gyel transzfektált sejtekhez. Az ellenanyagokat alkalmazzuk B7-4 jelenlétének detektálására különféle sejtpopulációkon. B7-4-expressziót figyeeltünk meg, többek között, szívszöveten, daganatsejteken (beleértve bizonyos tüdő-daganatsejteket, bizonyos petefészek-daganatsejteket, bizonyos emlő-daganatsejteket, bizonyos epitéliális daganatsejteket és bizonyos pikkelysejtes karcinómákat), méhlepényen és csecsemőmirigy-epitéliumon.

9. példa. B7-4 elleni teljesen humán ellenanyagok előállítása

Ebben a példában B7-4 vagy PD-1 elleni teljesen humán ellenanyagokat készítünk humán immunglobulin-génekre transzgenikus egerekben. A transzgenikus egereket szokásos eljárások szerint készítjük, például a „Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual” [szerk.: Hogan, és mtsai., kiad.: Cold Spring Harbor Laboratory] című könyv szerint, amely hivatkozás útján a kitanítás részét képezi, vagy kereskedelmi forgalomban szerezzük be azokat. Az embrionális törzssejteket közzétett eljárások szerint manipuláljuk [„Teratocarcinomas and embryonic stem cells: a practical approach”, szerk.: Robertson, E. J., kiad.: IRL Press, Washington, D.C. (1987); Zijlstra és mtsai., Nature 342, 435-438. old. (1989); és Schwartzberg és mtsai., Science 246, 799-803. old. (1989); amelyek mindegyike hivatkozás útján a kitanítás részét képezi]. A DNS-klónozási eljárásokat a „Molecular Cloning: A Laboratory Manual” [2. kiadás, szerk. Sambrook, J. és mtsai., kiad.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.], című könyv szerint hajtjuk végre, amely hivatkozás útján a kitanítás részét képezi. Az oligonukleotidokat például Applied Bio Systems oligonukleotidszintetizátoron szintetizáljuk a gyártó által megadott specifikáció szerint, vagy kereskedelmi forgalomban szerezzük be azokat.

A transzgenikus egereket tisztított vagy rekombináns B7-4 vagy PD-1 alkalmazásával, vagy B7-4- vagy PD-1 extracelluláris doménjának legalább egy immunogén részletét tartalmazó fúziós fehérjével immunizáljuk. Megközelítőleg 400 µg B7-4-et vagy PD-1-et injektálunk intraperitoneálisan minden egyes egérbe 100 µl foszfát pufferelt sóoldatban (PBS). Szérummintákat gyűjtünk megközelítőleg 6 nappal később retroorbitális szinusz vértetetésével.

A B7-4 vagy PD-1 elleni ellenanyag reaktivitást és specifitást közvetett enzimes immunológiai vizsgálati eljárással (ELISA) állapítjuk meg. Számos immunglobulin-szupercsaládba tartozó molekulát tesztelünk kontrollként (például CTLA4-et és CD28-at) a B7-4 vagy PD-1 elleni ellenanyagok ellenanyag-specifitásának elemzésére. B7-4-hez vagy PD-1-hez kötődő humán változó régiót tartalmazó ellenanyagokat detektálunk humán IgM- és humán IgG-αlosztályra specifikus enzimkonjugátumokkal, amelyek nem keresztreagálnak egér immunglobulinokkal. Röviden, PVC mikrotiterlemezeket vonunk be B7-4-gyel vagy PD-1-gyel a mérőhelyek PBS-ben lévő 5 µg/ml B7-4-gyel történő bevonásával éjszakán keresztül 37°C-on. A szérummintákat PBS, 5% szérum, 0,5% Tween-20 pufferben hígítjuk, és 1 órán keresztül inkubáljuk a mérőhelyekben szobahőmérsékleten, majd anti-humán-IgG-Fc-t és IgG-F(ab')-tormaperoxidázt vagy IgM-Fc-tormaperoxidázt adunk hozzá ugyanabban az



oldószerben. 1 óra után szobahőmérsékleten az enzimaktivitást ABTS-szubsztrát (Sigma, St. Louis, MO) hozzáadásával állapítjuk meg, és leolvassuk 30 perc elteltével 415-490 nm-en. Teszteljük az ugyanazon egerektől származó, immunizálás előtti szérummintákban ugyanazon célantigének elleni humán ellenanyagok titerét is.

A megfelelő ellenanyag-titerrel rendelkező egerekből izolált lépsejteket begyűjtjük. A lépsejteket megfelelő fúziós partnerekhez (például mielóma sejtekhez) fuzionáltatjuk hibridómákat létrehozva. A hibridómákat és ellenanyagokat szokásos eljárások alkalmazásával manipuláljuk [lásd például „Antibodies: A Laboratory Manual”, szerk.: Ed Harlow és David Lane, kiad.: Cold Spring Harbor Laboratory (1988), amely hivatkozás útján a kitanítás részét képezi].

Az egér ellenanyag egér VH- és VL-doménjeinek komplementaritást meghatározó szekvenciáit alkalmazhatjuk humán immunglobulinok szerkezetébe történő átültetésre annak érdekében, hogy B7-4 vagy PD-1 elleni humanizált ellenanyagot hozzunk létre [Riechmann és mtsai., Nature 332, 323. old. (1988); Verhoeven és mtsai., Science 239, 1534. old. (1988)].

10. példa. B7-4-gyel vagy PD-1-gyel reagáló humán egyláncú Fv-k létrehozása

Monoklonális ellenanyagot szekretáló hibridómák előállításának alternatívájaként anti-B7-4- vagy PD-1-ellenanyagokat (ellenanyagok egyláncú Fv-szerű részletei) azonosítottunk és izoláltunk a Cambridge Antibody Technology, Ltd., (Melbourn, UK) cégtől származó humán M13-bakteriofágon prezentált humán immunglobulin szekvenciák kombinatorikus könyvtárának szkrínelésével [Winter és mtsai., Annu. Rev. Immunol. 12, 433. old. (1994); Hoogenboom és mtsai., Immunotechnology 4, 1. old. (1998)]. PD-1.Fc-t vagy B7-4.Fc-t alkalmaztunk tehát B7-4- vagy PD-1-poliipeptidhez kötődő immunglobulin-könyvtárak izolálására. Fágprezentációs könyvtárak előállítására és szkrínelésére szolgáló reagenskészletek kereskedelmi forgalomban kaphatók, és szokásos eljárásokat alkalmaztunk az scFv létrehozására [Helfrich és mtsai., J. Immunol. Methods 237, 131-145. old. (2000); Cardoso és mtsai., Scand. J. Immunol. 51, 337-344. old. (2000)]. A PD-1.Fc-t vagy B7-4.Fc-t műanyag-ra immobilizáltuk, és specifikus scFv-t expresszáló fágokat szelektáltunk „panning”-gal és dúsítás több menetével [Griffiths és mtsai., EMBO J. 12, 725. old. (1993)].

11. példa. B7-4 receptorának azonosítása

Humán PD-1 extracelluláris régió humán immunglobulin-gamma-1 vagy egér Ig-gamma2a csukló-CH2-CH3-doménekhez történő fúzióját tartalmazó fehérjéket (az FcR és komplement kölcsönhatását gátló mutációkkal) alkalmaztunk PD-1-hez kötődő ligandumok keresésére. A keresés részeként gamma-interferonnal stimulált monociták sejtfelszínének festődését találtuk. A B7-4 indukálódott monocitákban gamma-interferonnal történő stimulálás után, amint azt northern-hibridizációval megfigyeltük.

Teszteltük PD-1-Fc (humán Ig-gamma1) kötődését B7-4 expressziós vektorral transziensen transzfektált COS-sejtek felszínéhez. A COS-sejteket vagy B7-4M-mel vagy B7-1-gyel transzfektáltuk *LipofectAMINE* transzfekciós reagens alkalmazásával. 48 óra elteltével a sejteket humán PD-1-Fc-vel, egér PD-1-Fc-vel, CTLA4-Fc-vel, Flt4-Fc-vel vagy IgG-vel festettük, majd anti-IgG-hez konjugált fikoeritrinnel (PE). A sejteket azután áramlási citometriával elemztük. Amint azt a 13. ábrán bemutatjuk, B7-4-et expresszáló COS-sejtek kötötték mind a humán PD-1-Fc-t, mind az egér PD-1-Fc-t, de nem kötötték a CTLA4-Fc-t, Flt4-Fc-t vagy humán IgG-t. Pozitív kontrollként demonstráltuk, hogy B7-1-et expresszáló COS-sejtek kötötték a CTLA4-Fc-t, de nem kötötték a PD-1-Fc-t vagy IgG-t.



Ezenfelül transzfektált COS-sejtek egysejtes rétegének *in situ* vizsgálati eljárását végeztük el. Az egysejtes rétegeket PD-1-Fc-vel, CTLA4-Fc-vel vagy humán IgG1-gyel próbáltuk, és kötést detektáltunk az Fc-részlet ellen termeltetett, alkalikus foszfátázzal konjugált másodlagos ellenanyaggal. A kötést 5-bromo-4-kloro-3-indolil-foszfát kromogén szubsztráttal és nitro-blue-tetrazóliummal és fénymikroszkópiával tettük láthatóvá. Ezzel párhuzamosan B7-4-gyel transzfektált sejtekről azt találtuk, hogy PD-1-Fc-t kötnek, és nem kötik a CTLA4-Fc-t (humán Ig-gamma-1) vagy Flt4-Fc-t, ami egér Flt4 extracelluláris régiója humán Ig-gamma-1-hez kötve. Ezzel párhuzamosan PD-1-Fc nem kötődött kontrollal transzfektált, B7-1-gyel vagy B7-2-vel transzfektált COS-sejtek felszínéhez.

Egy másik kísérletben nem detektáltuk PD-1-Fc kötődését B7-1 vagy B7-2 oldható formáihoz, de detektáltuk B7-4-hez való kötődést, BIACORE-alapú vizsgálati eljárás alkalmazásával. Ezzel párhuzamosan hCTLA4-ról kimutattuk, hogy kötődik B7-1-hez és nem kötődik B7-4-hez. A PD-1-Fc-t vagy CTLA4-Fc-t immobilizáltuk, és a körülmények lényegében megegyeztek Fitz és mtsai. [Oncogene 15, 613. old. (1997)] leírásával. Teljes hosszúságú B7-4M-mel vagy B7-4-Fc-vel transzfektált COS-sejtek koncentrált tápközegét injektáltuk és mértük valós idejű „Biomolecular Interaction Analysis” (BIA) módszerrel [Sjolander, S. és Urbaniczky, C., Anal. Chem. 63, 2338-2345. old. (1991) és Szabo és mtsai., Curr. Opin. Struct. Biol. 5, 699-705. old. (1995)]. Azt találtuk, hogy a humán B7-4 kötődik humán és egér PD-1-hez, és ezt a kötést gátolja az együtt injektált PD-1-Fc-vel való kompetíció, de nem a CTLA4-Fc-vel való kompetíció. Ezen kísérletek nem csak az oldható B7-4-Fc fúziós fehérje immobilizált PD-1-Fc-hez történő kötődését demonstrálják, hanem demonstrálják B7-4 oldható formájának jelenlétét is B7-4M-mel transzfektált sejtek kondicionált tápközegében, feltehetőleg kibocsátás eredményeképpen.

A 14. ábra azt illusztrálja, hogy a PD-1 képes, és Flt4 (vaszkuláris endotéliális növekedési faktor-C receptora) nem képes kompetitíven gátolni PD-1 kötődését B7-4-hez. Humán PD-1-gamma2a fúziós fehérje kötődését mutatjuk be B7-4M-et expresszáló COS-sejtekhez az A részabrában. A kötődést FE-hez kapcsolt anti-gamma-2a-specifikus reagenssel detektáltuk. IgG1-hez kapcsolt humán PD-1 adtunk az alábbi koncentrációkban: 50 µg/ml, 6,25 µg/ml, 100 µg/ml, vagy 25 µg/ml, és azt találtuk, hogy verseng a kötődést. Kontrollként Flt4IgG1-ről azt találtuk, hogy nem verseng PD-1 kötődésért B7-4-hez 100 µg/ml koncentrációban.

Egy még további kísérletben B7-4 PD-1-hez való kötő képességét áramlási citometriával és BIACORE kötési vizsgálati eljárásokkal határoztuk meg. Humán és egér B7-4-hez kötött humán és egér PD-1.Ig fúziós fehérjéket expresszáltatunk CHO-sejteken, és detektáltuk áramlási citometriával (15. ábra). Azonban sem humán CTLA-4.Ig, sem humán CD28.Ig, sem humán ICOS.Ig nem kötődött egyik B7-4-et expresszáló sejtvonalhoz sem. A PD-1 fúziós fehérjék nem kötődtek egyedül vektorral transzfektált CHO-sejtekhez. A PD-1:B7-4 kölcsönhatás további megerősítését nyertük felszíni plazmon-rezonancia alkalmazásával BIACORE-készüléken. A humán és egér PD-1.Ig-fehérjét és humán CTLA-4.Ig-t immobilizáltunk dextrán-chipek áramlási kamrában lévő felszínére, és teszteltük azokat oldható humán B7-4.Ig-hez való kötődésre. A B7-4.Ig kötődött mind humán, mind egér PD-1.Ig-hez, de nem kötődött humán CTLA-4.Ig-hez (16. ábra). Ezt a kötést gátolta a kompetíció együtt injektált oldható PD-1.Ig-vel, de nem CTLA-4.Ig-vel. Humán B7-1 és B7-2 oldható formái nem kötődtek az immobilizált humán PD-1-hez.

Ezen adatok azt demonstrálják, hogy a PD-1 kötődik B7-4-hez, és ez a kötődés szabályozhatja a PD-1 működését.

12. példa. B7-4 negatív jelet közvetít immunsejtekhez

Ebben a példában mérőhelyenként 5×10^5 Jurkat T-sejtet stimuláltunk anti-CD3-mal bevont gyöngyökkel (1:1 arányban) és oldható anti-CD28-cal. B7-4-et expresszáló COS-sejteket vagy EZZ-nek nevezett negatív kontrollt titráltunk a mérőhelyekbe. 48 óránál felülőszót gyűjtöttünk be, és elemeztünk ELISA-val humán IL-2-re. A 17. ábrán azt mutatjuk be, hogy COS-B7-4-sejtek növekvő száma (oszlopok az ábra jobb oldalán) az IL-2-termelés csökkenéséhez vezet.

Hasonló vizsgálati formát alkalmazva, például amelyben PCMB-ből származó humán PHA-blasztokat stimuláltunk immobilizált anti-CD3-mal és oldható anti-CD28-cal, T-sejt-proliferáció csökkenését figyeltük meg B7-4-et expresszáló COS-sejtekkel titrálva.

13. példa. A PD-1:B7-4 kölcsönhatás gátolja a CD13-közvetített T-sejt-proliferációt

A PD-1:B7-4 kölcsönhatás funkcionális jelentőségének megvizsgálására a B7-4-nek receptorával való kölcsönhatásának funkcionális következményeit is megvizsgáltuk humán T-sejtek alkalmazásával. Perifériás vér egymagvú sejteket izoláltunk *Ficoll-Hypaque* gradiens centrifugálással. $CD4^+$ T-sejt-sejtpopulációkat (85-90% tisztaságúakat) tisztítottunk negatív szelekcióval monoklonális ellenanyagok és immunmágneses gyöngyök (Perseptive Biosystems) alkalmazásával. Anti-CD3-at, kontroll IgG-t és fúziós fehérjét kovalensen kapcsoltunk poliuretánnal bevont tozill-aktivált Dynabead-ekhez (Dyna) a gyártó utasításai szerint, és ahogy korábban leírták [Blair, J.P. és mtsai., J. Immunol. 160, 12-15. old. (1998)]. Anti-CD3-ellenanyagot (UCHT1, Pharmingen) adtunk a jelzett koncentrációkban 1×10^7 gyöngy/ml, 0,1 M foszfát-pufferhez, pH 7,4. Kontroll IgG-tadtunk a gyöngyök szuszpenziójához annak érdekében, hogy állandó, 5 μ g/ml IgG-összkoncentrációt tartsunk a kötés során. Hasonlóképpen, anti-CD3/B7-4-Ig(γ 2a) gyöngyöket állítottunk elő a jelzett anti-CD3-ellenanyag koncentrációkkal, az összes kötött fehérje (2 mg/ 10^7 gyöngy) 40%-át kitevő állandó koncentrációval, és kontroll IgG-vel kiegészítve a maradék összes kötött fehérjét. 10^5 T-sejtet tenyésztettünk 96-mérőhelyes lapos fenékű mikrotiterlemezekben, és gyöngyöket adtunk hozzá 1 gyöngy/1 sejt arányban anti-CD28-ellenanyag (CD28.2, Pharmingen) jelzett koncentrációinak jelenlétében vagy hiányában. A proliferációt a tenyészeteknek a 4 napos vizsgálat utolsó hat órájában történő, 1 μ Ci ^{3} H-timidinnel való jelölésével határoztuk meg. Citokin-ELISA-val történő jelölés végett a tenyészeteket a fent leírt módon állítottuk fel, és a felülőszókat begyűjtöttük a jelzett időpontokban. Az interferon- γ , IL-10- és IL-2-koncentrációt kereskedelmi forgalomban kapható ELISA-reagenskészletek (Genzyme) alkalmazásával határoztuk meg.

Perifériás vér egymagvú sejtekből (PBMC) származó tisztított $CD4^+$ T-sejteket aktiváltunk anti-CD3-monoklonális ellenanyaggal és vagy humán B7-4-Ig-vel, vagy kontroll Ig-vel bevont gyöngyökkel. A proliferációt és citokin-termelést 96 órával a stimulálás után állapítottuk meg. Amint azt a 18. ábrán bemutatjuk, az anti-CD3 monoklonális ellenanyaggal és B7-4-Ig-vel bevont gyöngyökkel aktivált sejtek 69% csökkenést mutattak a proliferációban az anti-CD3 monoklonális ellenanyaggal és kontroll Ig-vel aktiváltakhoz hasonlóan. Ezenkívül a sejtek aktiválása B7-4 jelenlétében zavarta a citokin-szekréciót is. B7-4 jelenlétében az interferon- γ és IL-10 szekréciója megközelítőleg sorrendben 80%-kal és 60%-kal csökkent (18. ábra). Az IL-2-termelés a detektálás szintje alatt volt ilyen aktiválási körülmények között, mind 24, mind 96 óránál. Azonban olyan körülmények között, ahol a kostimulációt oldható anti-CD28 alakjában biztosítottuk, a sejtek aktiválása B7-4 jelenlétében az IL-2-termelés csökkenéséhez is vezetett. Ezáltal egér és humán sejtek aktiválása B7-4 jelenlétében mind a proliferáció, mind a citokin-termelés gátlásához vezet.

14. példa. A PD-1:B7-4 kölcsönhatás kimenetele a T-sejt-receptor és a CD28-jel erősségétől függ

A T-sejt-receptor, CD28 és PD-1 által közvetített jelek közötti összefüggés vizsgálatára humán $CD4^+$ T-sejteket stimuláltunk anti-CD3 monoklonális ellenanyag szuboptimális vagy optimális koncentrációival, B7-4.Ig rögzített koncentrációjával és oldható anti-CD28 monoklonális ellenanyag növekvő koncentrációival. Anti-CD3 monoklonális ellenanyaggal bevont gyöngyök alkalmazásával megállapítottuk a szuboptimális és optimális T-sejt-stimulációhoz szükséges koncentrációkat. Szuboptimális T-sejt-receptor kötéshez szükséges körülmények között (anti-CD3 monoklonális ellenanyag 1 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációban), minimális proliferációt figyeltünk meg kostimuláció hiányában (19A ábra). Oldható anti-CD28 monoklonális ellenanyag növekvő koncentrációinak hozzáadása proliferáció akár 30-szoros növekedéséhez vezetett. Ilyen körülmények között a T-sejtek aktiválása B7-4 jelenlétében 80%-os csökkenéshez vezetett a proliferációban (19A ábra). Kostimuláció maximális szintje (anti-CD28 250 ng/ml koncentrációban) volt szükséges a proliferáció B7-4-stimuláció közvetítette gátlásának megszüntetéséhez. Ezzel ellentétben T-sejt-receptoros aktiválás telítési körülményei között (anti-CD3 monoklonális ellenanyag 2 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációban), a T-sejt-proliferáció B7-4-közvetített gátlását csak CD28-kostimuláció hiányában figyeltük meg (19B ábra).

15. példa. B7-4 képessége CD28-jel és citokin-termelés gátlására

Úgy látszik, hogy a PD-1:B7-4 útvonal gátló hatásait a TCR-en és CD28-on keresztüli jel erőssége határozza meg (lásd az előző példát), miáltal gyenge CD3/CD28-közvetített válaszok könnyen gátló jellegűen szabályozódnak. A CD28-jel és a PD-1:B7-4 útvonal kölcsönhatásának tanulmányozására előaktivált $CD4^+$ DO11.10 T-sejteket aktiváltunk CHO- IA^d /B7.2-n vagy CHO- IA^d /B7.2/B7-4-en prezentált OVA-peptiddel.

B7-4 detektálására 5×10^5 CHO-transzfectáns sejtet inkubáltunk 5 $\mu\text{g/ml}$ humán PD-1-Ig-vel (hPD-1-Ig) (Genetics Institute, Cambridge, MA) és azt kecske anti-egér-IgG2a-fikoeritrinnel (PE) (Southern Biotechnology Associates Inc., Birmingham, AL) hívtuk elő. Ezenfelül a sejteket külön festettük 5 $\mu\text{g/ml}$ anti- IA^d -PE-vel vagy B7.2-PE-vel (Pharmingen, San Diego, CA). Minden lépés után a sejteket háromszor mostuk PBS/1% BSA/0,02% nátrium-azid pufferral. Az utolsó inkubálás után a sejteket 1%-os paraformaldehiddel rögzítettük. 10000 eseményt elemeztünk FACSCalibur készüléken (Becton Dickinson, Mountain View, CA). Az összes izotípus kontrollt a Pharmingen cégtől szereztük be.

Lépéseket állítottunk elő DO11.10-egerekből, és Tris- NH_4Cl -el kezeltünk az eritrocitáktól való kimerítés végett. A sejteket 1 $\mu\text{g/ml}$ OVA-peptiddel (Analytical Biotechnology Services, Boston, MA) kezeltük 72 órán keresztül, 10% FCS-sel (Sigma, St Louis, MO), 2 mM L-glutamminal, 100 U/ml penicillinnel, 100 $\mu\text{g/ml}$ sztreptomocinnal, 250 ng/ml amfotericin-B-vel, 10 mM HEPES-sel, 50 μM 2-ME-vel (amelyek mindegyikét a Life Technologies cégtől szereztük be) és 15 mg/ml gentamicinnel (BioWhittaker, Walkersville, MD) kiegészített RPMI 1640-ben (Life Technologies, Grand Island, New York). $CD4^+$ T-sejteket tisztítottunk pozitív szelekcióval mágnes-aktivált sejtválogató oszlopok (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) alkalmazásával, 98%-nál nagyobb tisztaságot eredményezve. A sejteket éjszakán keresztül pihentettük az újrástimulálás előtt.

CHO-sejtek proliferációját 50 $\mu\text{g/ml}$ mitomicin-C-vel (Bristol Laboratories, Princeton, NJ) történő inkubálással gátoltuk 16 órán keresztül 37°C-on. Az inkubálási időszak végén a sejteket begyűjtöttük 10 mM PBS-ben lévő EDTA-val, mostuk kétszer, és állni hagytuk jégen 1 órán keresztül. A sejteket azt követően háromszor mostuk és újrafeluszpendáltuk tenyésztő tápközegben. 10^5 előaktivált $CD4^+$ T-sejtet tenyésztettünk változó koncentrációjú OVA-peptiddel és 10^6 mitomicin-C-vel kezelt CHO-transzfectánsal 96-mérőhelyes



mikrotiterlemezeken. A proliferáció mérésére a tenyészeteket 48 órán keresztül inkubáltuk, és pulzáltuk 1 $\mu\text{Ci}/\text{mérőhely}$ ^3H -timidinnel (New England Nuclear, Boston, MA) az inkubációs időszak utolsó 6 órájában.

B7-4 és IA^d expressziója hasonló volt az összes CHO-transzfektáns (20. ábra). Amint vártuk, B7.2 bejuttatása a T-sejtek proliferációs válaszához és az összes antigén-koncentráció a megnövekedéséhez vezetett (21. ábra). Azonban B7-4 gátolta a válaszokat alacsonyabb peptidkoncentrációknál (0,01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ és 0,001 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (21. ábra).

A PD-1:B7-4 útvonal citokin-termelés gátlására való képességének megállapítására CHO-transzfektáns sejtek felszínén prezentált OVA-peptiddel aktivált CD4^+ DO11.10 T-sejtek felülírását elemeztük. A felülírások alikvojtait begyűjtöttük különböző idővel a tenyészetek indítása után. Az IL-2, IL-4, IFN- γ és IL-10 szintjét a Pharmingen cégtől származó monoklonális ellenanyagokkal és rekombináns citokin standardokkal elemeztük. A detektálási határok az alábbiak voltak: IL-2, 20 pg/ml, IL-4, 40 pg/ml, IFN- γ , 100 pg/ml és IL-10, 200 pg/ml. Az IL-2, IL-4, IFN- γ és IL-10 termelését szignifikánsan gátolta, amikor CD4^+ DO11.10-sejteket 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ peptiddel és B7-4-vel tenyésztettünk (22. ábra). Ennél a koncentrációnál a proliferáció gátlása csak gyenge volt. Azonban B7-4 szignifikánsan gátolta a citokin-termelést 0,01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ peptidkoncentrációnál, ami összhangban áll a proliferáció gátlásával (23. ábra). Nem detektáltunk IL-10-et ilyen aktiválási körülmények között. Tehát a PD-1 B7-4 általi kötése képes gátló jellegűen szabályozni a citokin-termelést, még akkor is, amikor a T-sejt-proliferációt nem befolyásolja.

Annak meghatározására, hogy a csökkent citokin-termelés csökkenti mRNS-szintek következménye-e, RNáz-védelmi vizsgálati eljárást alkalmaztunk. CD4^+ T-sejteket újrasztimuláltunk különböző CHO-transzfektáns sejtekkel és 0,01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ OVA-peptiddel. 48 óra elteltével a sejteket begyűjtöttük, és mRNS-t izoláltunk TRIzol[®] reagens (Life Technologies) alkalmazásával. 5 μg mRNS-t elemeztünk citokin-szintekre RNáz-védelmi vizsgálati eljárással *RiboQuant multiprobe kit mCK1* alkalmazásával, a gyártó utasításai szerint (Pharmingen). Detektáltuk IL-4-, IL-10-, IL-13-, IL-2-, IL-6- és IFN- γ -mRNS transzkripció szintjét előaktivált CD4^+ DO11.10 T-sejtekben, 0,01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CHO- IA^d /B7.2-n prezentált OVA-peptiddel történő stimuláció után. Azonban B7-4 bejuttatása szignifikánsan csökkentette a citokin-mRNS-ek szintjét. A citokin-mRNS-ek minimális serkentő jellegű szabályozása volt stimulálatlan T-sejt-tenyészetekben vagy CHO- IA^d -n prezentált peptiddel stimulált T-sejteken. Ezen eredmények azt is demonstrálják, hogy a PD-1:B7-4 útvonal képes erős B7/CD28-jel antagonizálására, legalábbis amikor az antigén-stimuláció gyenge vagy korlátozó, és legalább a citokin-termelés gátlására erős antigén-stimuláció körülményei között.

16. példa. A PD-1:B7-4 útvonal hatásmechanizmusa

CTLA-4 keresztetkötéséről kimutatták, hogy gátolja a sejtciklus előrehaladását naív T-sejtekben [Krummel, M.F. és Allison, J.P., J. Exp. Med. 183, 2533-2540. old. (1996); Wahnes, T. L. és mtsai., J. Exp. Med. 183, 2541-2550. old. (1996)]. Mivel a PD-1-et apoptózis egér sejtvonalakból izolálták, a PD-1:B7-4 útvonal egy lehetséges hatásmechanizmusa a programozott sejthalál növelése lehet. Ezen kérdés vizsgálatára CD4^+ DO11.10 T-sejteket újrasztimuláltunk 0,01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ peptiddel és különböző CHO-transzfektánsokkal, és elemeztük a sejtciklus előrehaladását. A CD4^+ T-sejteket korábban leírt módon stimuláltuk újra 0,01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ peptiddel. 36 órás tenyésztés elteltével a sejteket viaszanyertük, és anti-CD4-FITC-cel festettük. A sejteket PBS-ben mostuk, rögzítettük 70%-os etanolban 1 órán keresztül jégen, és azután újrafeluszpendáltuk 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNáz-4

(Sigma) és 50 µg/ml propidium-jodidot (Sigma) tartalmazó PBS-ben. Az elemzést a festés elvégzését követő 1 órában belül hajtottuk végre.

48 óra elteltével a sejteket visszanyertük, és anti-CD4-FITC-cel festettük. A permeabilizálás után a sejteket propidium-jodiddal inkubáltuk a G_0/G_1 , S/G_2 és szub-diploid populációk elemzésére. A CHO-IA^d-n prezentált peptiddel újraprimulált CD4⁺ T-sejtek nagy része a szub-diploid populációban van, apoptózist jelezve (24. ábra). Azokban a tenyészetekben, ahol a T-sejteket CHO-IA^d/B7-2-n prezentált peptiddel stimuláltuk, a sejtek megnövekedett száma volt a S/G_2 -fázisban, és csökkent száma volt a szub-diploid populációban, jelezve, hogy a sejtek ciklusban voltak, és megmenekültek az apoptózistól a B7-4/CD28 kostimuláció hatására. B7-4 bejuttatása megnövekedett számú sejthez vezetett a G_0/G_1 -fázisban (24. ábra). Összehasonlítható volt az apoptózis szintje a B7-4-tenyészetekben a CHO-IA^d/B7-tenyészetekkel. Ezt igazoltuk annexin-festéssel is. A sejt-progresszió gátlása PD-1:B7-4 útvonal útján megerősíti annak szerepét a T-sejt-aktiválás gátló jellegű szabályozásában.

17. példa. Biotinilált humán B7-4 kötődésének gátlása humán PD-1-Fc-hez

Fc fúziós fehérjéket állítottunk elő PD-1 vagy B7-4 extracelluláris régiójának egér IgY2a csukló-CH2-CH3 doménjeihez való kapcsolásával. Rekombináns fehérjéket állítottunk elő *LipofectAMINE*-nal (Gibco-BRL) tranziensen transzfektált COS-sejtekben, vagy stabilan transzfektált CHO-sejtvonalakban, és megtisztítottuk azokat kondicionált tápközegből *Protein-A-Sepharose* alkalmazásával.

Teszteltük B7-4 vagy PD-1 elleni ellenanyagok képességét humán B7-4Fc és humán PD-1Fc kölcsönhatásának gátlására szokásos ELISA eljárások alkalmazásával. Röviden, humán PD-1Fc-molekulákat immobilizáltunk 96-mérőhelyes mikrotiterlemezekben, blokkoltunk és mostunk. Biotinilált B7-4Fc-molekulákat (100 ng/ml) adtuk a mérőhelyekhez megközelítőleg 2000, 700, 200, 70, 25, 8 és 1,18 ng/ml koncentrációban (25. ábra). A mérőhelyeket sztreptavidinhez konjugált tormaperoxidázzal inkubáltuk, mostuk, és a szint szokásos eljárások alkalmazásával hívtuk elő. B7-4Fc ED50-értékét 108 ng/ml-nek találtuk.

Teszteltük humán B7-4 elleni egér ellenanyagok (10D9 és 11D12) vagy humán immunglobulinok scFv-részeinek (B7-4-1, B7-4-6 és B7-4-12) képességét biotinilált humán B7-4Fc-nek humán PD-1Fc-hez történő kötődésének gátlására az inhibitorok 7 koncentrációja mellett. Az IC50-értékről azt találtuk, hogy 0,5 nM és 24 nM között van, az adatokat a 25. ébrán mutatjuk be.

A PD-1-specifikus scFv-eket teszteltük B7-4Fc PD-1Fc-hez történő kötődésének gátlására való képességükre is a fent leírt ELISA eljárások alkalmazásával. PD-1-geyel reagáló humán scFv-ről (PD1-17 scFv) azt találtuk, hogy gátolja a specifikus kötődést (EC50 10^{-7} és 10^{-8} között), amint azt a 26. ábrán bemutatjuk. A PD1-17scFv VL- és VH-doménjét alkalmaztuk teljes IgG előállítására. Röviden, a VL és VH kódoló régiókat genomális CH- és CL-génszekvenciákhoz kapcsoltuk expressziós vektorokban. A kapott expressziós vektorokat tranziensen transzfektáltuk 293-as sejtekbe, és az IgG-t begyűjtöttük a kondicionált tápközegből. Az átültetett teljes IgG-molekula hatásossága nagyobb volt, mint az scFv-ellenanyagé (EC 50 10^{-8} M és 10^{-9} M között).

18. példa. Oldható B7-4Fc beadása súlyosbítja a betegséget egér modellben

Annak meghatározására, hogy a B7-4/PD-1 útvonal modulálásának van-e immun szabályozó aktivitása *in vivo*, a fehérjét kísérletes autoimmun encefalomielitisz (EAE) egérmodellben teszteltük, amely a humán szklerózis multiplex sok klinikai és patológiai tulajdonságát osztja. Nőstény SJL/J egereket immunizáltunk 100 µg proteolipid fehérjével (PLP) komplett Freund-féle adjuvánsban. Tíz nappal később a lépeket begyűjtöttük, egy-



sejtes szuszpenziókká dolgoztuk fel, és újrasztimuláltuk 5 µg PLP-vel 96 órán keresztül. A sejteket háromszor mostuk PBS-ben, és azután 15×10^6 sejtet átvittünk naív SJL/J egerekbe intraperitoneális injekcióval. Autoreaktív T-sejtek adoptív átvitele akut paralizist eredményez a befogadó egerekben, ami faroktónus elvesztésében nyilvánul meg, amely teljes hátsó végtagi paralizissá fejlődik tovább. Ez a paralizises esemény egybeesik aktivált T-sejtek és makrofágok észrevehető beszűrődésével a CNS-be. A legtöbb esetben ez betegség akut modellje, spontán helyreállással paralizis rövid időszaka után. B7-4Fc értékelésére egereket szubkután injektáltunk 200 µg fehérjével 100 µl steril sóoldatban a 0., 2., 4., 7. és 11. napon a sejtátvitel után (n=10). Kontroll egerek (n=10) csak egyenlő térfogatú sóoldatot kaptak. Az összes állatot rendszeresen ellenőriztük betegség klinikai jeleire, amelyeket az alábbiak szerint értékeltünk: 1. Faroktónus elvesztése; 2. Hátsó végtag gyengesége/ részleges hátsó végtagi paralizis; 3. Teljes hátsó végtagi paralizis; 4. Hátsó és első végtagi paralizis; 5. Haldokló.

A 27. ábrán bemutatott kísérletben klinikai betegség előfordulása és kezdete hasonló volt mindkét csoportban. A B7-4Fc-vel kezelt egerekben azonban komoly betegség alakult ki, az állatok többsége gyorsan előrehaladt a teljes hátsó és első végtagi paralizis állapotba (9/10 és 1/10 sorrendben B7-4Fc és kontroll egerek esetén). A betegség klinikai jeleivel kapcsolatos halandóság 10% volt a kontroll csoportban és 70% a B7-4Fc-vel kezelt egerekben. Ezenfelül a klinikai betegségből való felépülés lényegesen késleltetett volt a túlélő, B7-4Fc-vel kezelt egerekben, azon tény ellenére, hogy a kezelést abbahagytuk a 11. napon.

Összefoglalva, T-sejt-közvetített autoimmunitás adoptív átviteli modelljének alkalmazásával az oldható B7-4Fc beadása súlyosbítja a betegség klinikai jeleit, megnövekedett halandóságot és paralizisból való késleltetett felépülést eredményezve. Ezen felismerések összhangban vannak gyulladásos sejtek aktiválásával/beszűrődésével a CNS-be, és világosan demonstrálják a B7-4Fc *in vivo* immunszabályozó képességét.

Szakember számára nyilvánvaló a leírásban feltárt találmány szerinti specifikus megvalósítási módok sok ekvivalense, vagy képes azokat nem több, mint rutin kísérletezés alkalmazásával megállapítani. Az ilyen ekvivalenseket tartalmazzák az alábbi igénypontok.

SZEKVENCIALISTA

<210> 1

<211> 968

<212> DNS

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (59)..(793)

<400> 1

```

gcttcccgag gctccgcacc agccgcgcct ctgtccgcct gcagggcatt ccagaaag      58
atg agg ata ttt gct gtc ttt ata ttc atg acc tac tgg cat ttg ctg      106
Met Arg Ile Phe Ala Val Phe Ile Phe Met Thr Tyr Trp His Leu Leu
      1              5              10              15
aac gca ttt act gtc acg gtt ccc aag gac cta tat gtg gta gag tat      154
Asn Ala Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr
      20              25              30
ggg agc aat atg aca att gaa tgc aaa ttc cca gta gaa aaa caa tta      202
Gly Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu
      35              40              45
gac ctg gct gca cta att gtc tat tgg gaa atg gag gat aag aac att      250
Asp Leu Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile
      50              55              60
att caa ttt gtg cat gga gag gaa gac ctg aag gtt cag cat agt ago      298
Ile Gln Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser
      65              70              75              80
tac aga cag agg gcc cgg ctg ttg aag gac cag ctc tcc ctg gga aat      346
Tyr Arg Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn
      85              90              95
gct gca ctt cag atc aca gat gtg aaa ttg cag gat gca ggg gtg tac      394
Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr
      100             105             110
cgc tgc atg atc agc tat ggt ggt gcc gac tac aag cga att act gtg      442
Arg Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val
      115             120             125
aaa gtc aat gcc cca tac aac aaa atc aac caa aga att ttg gtt gtg      490
Lys Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val
      130             135             140
gat cca gtc acc tct gaa cat gaa ctg aca tgt cag gct gag ggc tac      538
Asp Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr
      145             150             155             160
ccc aag gcc gaa gtc atc tgg aca agc agt gac cat caa gtc ctg agt      586
Pro Lys Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser
      165             170             175

```



ggt aag acc acc acc acc aat tcc aag aga gag gag aag ctt ttc aat 634
Gly Lys Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn
180 185 190
gtg acc agc aca ctg aga atc aac aca aca act aat gag att ttc tac 682
Val Thr Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr
195 200 205
tgc act ttt agg aga tta gat cct gag gaa aac cat aca gct gaa ttg 730
Cys Thr Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu
210 215 220
gtc atc cca ggt aat att ctg aat gtg tcc att aaa ata tgt cta aca 778
Val Ile Pro Gly Asn Ile Leu Asn Val Ser Ile Lys Ile Cys Leu Thr
225 230 235 240
ctg tcc cct agc acc tagcatgatg totgocctatc atagtcattc agtgattgtt 833
Leu Ser Pro Ser Thr
245

gaataaatga atgaatgaat aacactatgt ttacaaaata tatcotaatt cctcacctcc 893
attcatccaa accatattgt tacttaataa acattcagca gatatttatg gaataaaaaa 953
aaaaaaaaaa aaaaaa 968

<210> 2

<211> 245

<212> FRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

	165		170		175
Gly Lys Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn					
	180		185		190
Val Thr Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr					
	195		200		205
Cys Thr Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu					
	210		215		220
Val Ile Pro Gly Asn Ile Leu Asn Val Ser Ile Lys Ile Cys Leu Thr					
	225		230		235
Leu Ser Pro Ser Thr					240
	245				

<210> 3

<211> 1553

<212> DNS

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (53) .. (922)

<400> 3

```

cgagggtccg caccagccgc gcttctgtcc gcctgcaggg cattccagaa ag atg agg 58
                                                    Met Arg
                                                    1
ata ttt gct gtc ttt ata ttc atg acc tac tgg cat ttg ctg aac gca 106
Ile Phe Ala Val Phe Ile Phe Met Thr Tyr Trp His Leu Leu Asn Ala
      5              10              15
ttt act gtc acg gtt ccc aag gac cta tat gtg gta gag tat ggt agc 154
Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr Gly Ser
      20              25              30
aat atg aca att gaa tgc aaa ttc cca gta gaa aaa caa tta gac ctg 202
Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu Asp Leu
      35              40              45              50
gct gca cta att gtc tat tgg gaa atg gag gat aag aac att att caa 250
Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile Ile Gln
              55              60              65
ttt gtg cat gga gag gaa gac ctg aag gtt cag cat agt agc tac aga 298
Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser Tyr Arg
              70              75              80
cag agg gcc cgg ctg ttg aag gac cag ctc tcc ctg gga aat gct gca 346
Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn Ala Ala
              85              90              95
ctt cag atc aca gat gtg aaa ttg cag gat gca ggg gtg tac cgc tgc 394
Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr Arg Cys
      100              105              110
atg atc agc tat ggt ggt gcc gac tac aag cga att act gtg aaa gtc 442

```

Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val Lys Val
 115 120 125 130
 aat gcc cca tac aac aaa atc aac caa aga att ttg gtt gtg gat cca 490
 Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val Asp Pro
 135 140 145
 gtc acc tct gaa cat gaa ctg aca tgt cag gct gag gcc tac ccc aag 538
 Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr Pro Lys
 150 155 160
 gcc gaa gtc atc tgg aca agc agt gac cat caa gtc ctg agt ggt aag 586
 Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser Gly Lys
 165 170 175
 acc acc acc acc aat tcc aag aga gag gag aag ctt ttc aat gtg acc 634
 Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn Val Thr
 180 185 190
 agc aca ctg aga atc aac aca aca act aat gag att ttc tac tgc act 682
 Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr Cys Thr
 195 200 205 210
 ttt agg aga tta gat cct gag gaa aac cat aca got gaa ttg gtc atc 730
 Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu Val Ile
 215 220 225
 cca gaa cta cct ctg gca cat cct cca aat gaa agg act cac ttg gta 778
 Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Thr His Leu Val
 230 235 240
 att ctg gga gcc atc tta tta tgc ctt ggt gta gca ctg aca ttc atc 826
 Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr Phe Ile
 245 250 255
 ttc cgt tta aga aaa ggg aga atg atg gat gtg aaa aaa tgt gcc atc 874
 Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys Cys Gly Ile
 260 265 270
 caa gat aca aac tca aag aag caa agt gat aca cat ttg gag gag acg 922
 Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr His Leu Glu Glu Thr
 275 280 285 290
 taatccagca ttggaacttc tgatcttcaa gcagggattc tcaacctgtg gtttaggggt 982
 toatcggggc tgagcgtgac aagaggaagg aatgggcccg tgggatgcag gcaatgtggg 1042
 acttaaaagg cccaagcact gaaaatggaa cctggcgaaa gcagaggagg agaataaga 1102
 aagatggagt caaacaggga gcctggaggg agacottgat actttcaaat gcctgagggg 1162
 ctcatogacg cctgtgacag ggagaaagga tactttctgaa caaggagcct ccaagcaaat 1222
 catccattgc toatcctagg aagacggggt gagaatccct aatttgaggg tcagttcctg 1282
 cagaagtgcc ctttgootcc actcaatgac tcaatttggt ttctgcatga ctgagagtct 1342
 cagtggttga acgggacagt atttatgtat gaggttttcc tatttatatt gaggctgtga 1402
 ggtcttcttg tcatgtgagt gtggttgtga atgatttctt ttgaagatat attgtagtag 1462
 atgttacaat tttgtcggca aactaaaact gctgcttaat gatttgctca catotagtaa 1522
 aacatggagt atttgtaaaa aaaaaaaaaa a 1553
 <210> 4



<211> 290

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

```

Met Arg Ile Phe Ala Val Phe Ile Phe Met Thr Tyr Trp His Leu Leu
  1             5             10             15
Asn Ala Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr
      20             25             30
Gly Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu
      35             40             45
Asp Leu Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile
      50             55             60
Ile Gln Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser
      65             70             75             80
Tyr Arg Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn
      85             90             95
Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr
      100            105            110
Arg Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val
      115            120            125
Lys Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val
      130            135            140
Asp Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr
      145            150            155            160
Pro Lys Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser
      165            170            175
Gly Lys Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn
      180            185            190
Val Thr Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr
      195            200            205
Cys Thr Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu
      210            215            220
Val Ile Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Thr His
      225            230            235            240
Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr
      245            250            255
Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys Cys
      260            265            270
Gly Ile Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr His Leu Glu
      275            280            285
Glu Thr
      290

```

<210> 5

<211> 24

<212> DNS
 <213> Homo sapiens
 <400> 5
 cagctatggt ggtgcggact acaa 24
 <210> 6
 <211> 25
 <212> DNS
 <213> Homo sapiens
 <400> 6
 aggtgctagg ggacagtgtt agaca 25
 <210> 7
 <211> 24
 <212> DNS
 <213> Homo sapiens
 <400> 7
 cagctatggt ggtgcggact acaa 24
 <210> 8
 <211> 25
 <212> DNS
 <213> Homo sapiens
 <400> 8
 aggtgctagg ggacagtgtt agaca 25
 <210> 9
 <211> 24
 <212> DNS
 <213> Homo sapiens
 <400> 9
 tggctttagt tgggcaccaa cata 24
 <210> 10
 <211> 864
 <212> DNS
 <213> Homo sapiens
 <400> 10
 atgcagatcc cacaggogcc ctggccagtc gtctggggcg tgotadaact gggctggcgg 60
 ccaggatggt tcttagactc ccagacagg ccttggaaac cccccacctt ctccccagcc 120
 ctgctcgtgg tgacgaagg ggacaacgoc accttcacct gcagcttctc caacacatcg 180
 gagagcttcg tgctaaactg gtaccgcatg agccccagca accagacgga caagctggcc 240
 gcttcccccg aggaccgcag ccagccccgg caggactgcc gcttccgtgt cacacaactg 300
 cccaaacgggc gtgacttcca catgagcgtg gtcagggccc ggcgcaatga cagcggcacc 360
 tacctctgtg gggccatctc cctggccccc aaggcgcaga tcaaagagag cctgcccggca 420
 gagctcaggg tgacagagag aagggcagaa gtgcccacag cccaccccag cccctcacc 480
 aggtcagccg gccagttcca aaccctgggt gttggtgtcg tggggggcct gctgggcagc 540
 ctggtgctgc tagtctgggt cctggccgtc atctgctccc gggccgcacg agggacaata 600
 ggagccaggc gcaccggcca gccootgaag gaggaccctt cagccgtgcc tgtgttctct 660

gtggactatg gggagctgga ttccagtggg cgagagaaga ccccgaggcc ccccgtagcc 720
 tgtgtccctg agcagacgga gtatgccacc attgtcttcc ctacgggaat gggcacctca 780
 tccccggccc gcaggggctc agctgacggc cctcggagtg cccagccact gaggcctgag 840
 gatggacact gctcttgccc cctc 864

<210> 11

<211> 921

<212> DNS

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (25)..(888)

<400> 11

cactotgggtg ggggtgctcc aggc atg cag atc cca cag gcg ccc tgg cca 51

Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro

1

5

gtc gtc tgg gcg gtg cta caa ctg ggc tgg cgg cca gga tgg ttc tta 99

Val Val Trp Ala Val Leu Gln Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu

10

15

20

25

gac tcc cca gac agg ccc tgg aac ccc ccc acc ttc tcc cca gcc ctg 147

Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu

30

35

40

ctc gtg gtg acc gaa ggg gac aac gcc acc ttc acc tgc agc ttc tcc 195

Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser

45

50

55

aac aca tgc gag agc ttc gtg cta aac tgg tac cgc atg agc ccc agc 243

Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser

60

65

70

aac cag acg gac aag ctg gcc gcc ttc ccc gag gac cgc agc cag ccc 291

Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro

75

80

85

ggc cag gac tgc cgc ttc cgt gtc aca caa ctg ccc aac ggg cgt gac 339

Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp

90

95

100

105

ttc cac atg agc gtg gtc agg gcc cgg cgc aat gac agc gcc acc tac 387

Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr

110

115

120

ctc tgt ggg gcc atc tcc ctg gcc ccc aag gcg cag atc aaa gag agc 435

Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser

125

130

135

ctg cgg gca gag ctc agg gtg aca gag aga agg gca gaa gtg ccc aca 483

Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr

140

145

150

gcc cac ccc agc ccc tca ccc agg tca gcc gcc cag ttc caa acc ctg 531

Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Ser Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu

155	160	165	
gtg gtt ggt gtc gtg ggc ggc ctg ctg ggc agc ctg gtg ctg cta gtc			579
Val Val Gly Val Val Gly Gly Leu Leu Gly Ser Leu Val Leu Leu Val			
170	175	180	185
tgg gtc ctg gcc gtc atc tgc tcc cgg gcc gca cga ggg aca ata gga			627
Trp Val Leu Ala Val Ile Cys Ser Arg Ala Ala Arg Gly Thr Ile Gly			
190	195	200	
gcc agg cgc acc ggc cag ccc ctg aag gag gac ccc tca gcc gtg cct			675
Ala Arg Arg Thr Gly Gln Pro Leu Lys Glu Asp Pro Ser Ala Val Pro			
205	210	215	
gtg ttc tot gtg gac tat ggg gag ctg gat ttc cag tgg cga gag aag			723
Val Phe Ser Val Asp Tyr Gly Glu Leu Asp Phe Gln Trp Arg Glu Lys			
220	225	230	
acc ccg gag ccc ccc gtg ccc tgt gtc cct gag cag acg gag tat gcc			771
Thr Pro Glu Pro Pro Val Pro Cys Val Pro Glu Gln Thr Glu Tyr Ala			
235	240	245	
acc att gtc ttt cct agc gga atg ggc acc tca tcc ccc gcc cgc agg			819
Thr Ile Val Phe Pro Ser Gly Met Gly Thr Ser Ser Pro Ala Arg Arg			
250	255	260	265
ggc tca gct gac ggc cct cgg agt gcc cag cca ctg agg cct gag gat			867
Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg Ser Ala Gln Pro Leu Arg Pro Glu Asp			
270	275	280	
gga cac tgc tot tgg ccc ctc tgaccggcctt ccttgccac cagtgtctgtg cag			921
Gly His Cys Ser Trp Pro Leu			
285			

<210> 12

<211> 288

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Met	Gln	Ile	Pro	Gln	Ala	Pro	Trp	Pro	Val	Val	Trp	Ala	Val	Leu	Gln
1				5					10					15	
Leu	Gly	Trp	Arg	Pro	Gly	Trp	Phe	Leu	Asp	Ser	Pro	Asp	Arg	Pro	Trp
				20				25						30	
Asn	Pro	Pro	Thr	Phe	Ser	Pro	Ala	Leu	Leu	Val	Val	Thr	Glu	Gly	Asp
				35				40					45		
Asn	Ala	Thr	Phe	Thr	Cys	Ser	Phe	Ser	Asn	Thr	Ser	Glu	Ser	Phe	Val
				50				55					60		
Leu	Asn	Trp	Tyr	Arg	Met	Ser	Pro	Ser	Asn	Gln	Thr	Asp	Lys	Leu	Ala
				65				70					75		80
Ala	Phe	Pro	Glu	Asp	Arg	Ser	Gln	Pro	Gly	Gln	Asp	Cys	Arg	Phe	Arg
				85					90					95	
Val	Thr	Gln	Leu	Pro	Asn	Gly	Arg	Asp	Phe	His	Met	Ser	Val	Val	Arg
				100					105						110

Ala	Arg	Arg	Asn	Asp	Ser	Gly	Thr	Tyr	Leu	Cys	Gly	Ala	Ile	Ser	Leu
			115				120					125			
Ala	Pro	Lys	Ala	Gln	Ile	Lys	Glu	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Leu	Arg	Val
			130				135					140			
Thr	Glu	Arg	Arg	Ala	Glu	Val	Pro	Thr	Ala	His	Pro	Ser	Pro	Ser	Pro
			145				150				155				160
Arg	Ser	Ala	Gly	Gln	Phe	Gln	Thr	Leu	Val	Val	Gly	Val	Val	Gly	Gly
				165					170					175	
Leu	Leu	Gly	Ser	Leu	Val	Leu	Leu	Val	Trp	Val	Leu	Ala	Val	Ile	Cys
			180						185				190		
Ser	Arg	Ala	Ala	Arg	Gly	Thr	Ile	Gly	Ala	Arg	Arg	Thr	Gly	Gln	Pro
			195				200					205			
Leu	Lys	Glu	Asp	Pro	Ser	Ala	Val	Pro	Val	Phe	Ser	Val	Asp	Tyr	Gly
			210				215					220			
Glu	Leu	Asp	Phe	Gln	Trp	Arg	Glu	Lys	Thr	Pro	Glu	Pro	Pro	Val	Pro
			225				230				235				240
Cys	Val	Pro	Glu	Gln	Thr	Glu	Tyr	Ala	Thr	Ile	Val	Phe	Pro	Ser	Gly
				245					250					255	
Met	Gly	Thr	Ser	Ser	Pro	Ala	Arg	Arg	Gly	Ser	Ala	Asp	Gly	Pro	Arg
			260					265					270		
Ser	Ala	Gln	Pro	Leu	Arg	Pro	Glu	Asp	Gly	His	Cys	Ser	Trp	Pro	Leu
			275				280						285		

<210> 13

<211> 20

<212> DNS

<213> Homo sapiens

<400> 13

gcogaagtca totggacaag

20

<210> 14

<211> 20

<212> DNS

<213> Homo sapiens

<400> 14

totcagtggtg ctggtcacat

20

<210> 15

<211> 20

<212> DNS

<213> Homo sapiens

<400> 15

caccaccacc aattccaaga

20

<210> 16

<211> 23

<212> DNS

<213> Homo sapiens

```

<400> 16
acgtgaccaa ggaagtga aa gaa                23
<210> 17
<211> 23
<212> DNS
<213> Homo sapiens
<400> 17
tgccagctct tcaacagaaa cat                23
<210> 18
<211> 23
<212> DNS
<213> Homo sapiens
<400> 18
tggcaacgct gtccgtgtggt cac                23
<210> 19
<211> 19
<212> DNS
<213> Homo sapiens
<400> 19
gggccgcaca agttttgat                    19
<210> 20
<211> 22
<212> DNS
<213> Homo sapiens
<400> 20
gcccttgtcc ttgatctgaa ga                22
<210> 21
<211> 27
<212> DNS
<213> Homo sapiens
<400> 21
cggacagttg gaccctgaga ctccaca            27
<210> 22
<211> 3593
<212> DNS
<213> Mus musculus
<220>
<221> CDS
<222> (17)..(589)
<400> 22
agatagttcc caaaac atg agg ata ttt gct ggc att ata ttc aca gcc tgc 52
          Met Arg Ile Phe Ala Gly Ile Ile Phe Thr Ala Cys
              1             5             10
tgt cac ttg cta cgg gcg ttt act atc acg gct cca aag gac ttg tac 100

```

Cys His Leu Leu Arg Ala Phe Thr Ile Thr Ala Pro Lys Asp Leu Tyr	
15 20 25	
gtg gtg gag tat ggc agc aac gtc acg atg gag tgc aga ttc cct gta	148
Val Val Glu Tyr Gly Ser Asn Val Thr Met Glu Cys Arg Phe Pro Val	
30 35 40	
gaa cgg gag ctg gac ctg ctt gcg tta gtg gtg tac tgg gaa aag gaa	196
Glu Arg Glu Leu Asp Leu Leu Ala Leu Val Val Tyr Trp Glu Lys Glu	
45 50 55 60	
gat gag caa gtg att cag ttt gtg gca gga gag gag gac ctt aag cct	244
Asp Glu Gln Val Ile Gln Phe Val Ala Gly Glu Glu Asp Leu Lys Pro	
65 70 75	
cag cac agc aac ttc agg ggg aga gcc tgg ctg cca aag gac cag ctt	292
Gln His Ser Asn Phe Arg Gly Arg Ala Ser Leu Pro Lys Asp Gln Leu	
80 85 90	
ttg aag gga aat gct gcc ctt cag atc aca gac gtc aag ctg cag gac	340
Leu Lys Gly Asn Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp	
95 100 105	
gca gcc gtt tac tgc tgc ata atc agc tac ggt ggt gcg gac tac aag	388
Ala Gly Val Tyr Cys Cys Ile Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys	
110 115 120	
cga atc acg ctg aaa gtc aat gcc cca tac cgc aaa atc aac cag aga	436
Arg Ile Thr Leu Lys Val Asn Ala Pro Tyr Arg Lys Ile Asn Gln Arg	
125 130 135 140	
att tcc gtg gat cca gcc act tct gag cat gaa cta ata tgt cag gcc	484
Ile Ser Val Asp Pro Ala Thr Ser Glu His Glu Leu Ile Cys Gln Ala	
145 150 155	
gag ggt tat cca gaa gct gag gta atc tgg aca aac agt gac cac caa	532
Glu Gly Tyr Pro Glu Ala Glu Val Ile Trp Thr Asn Ser Asp His Gln	
160 165 170	
ccc gtg agt ggg aag aga agt gtc acc act tcc cgg aca gag ggg atg	580
Pro Val Ser Gly Lys Arg Ser Val Thr Thr Ser Arg Thr Glu Gly Met	
175 180 185	
ctt ctc aat gtg acc agc agt ctg agg gtc aac gcc aca gcg aat gat	628
Leu Leu Asn Val Thr Ser Ser Leu Arg Val Asn Ala Thr Ala Asn Asp	
190 195 200	
ggt ttc tac tgt acg ttt tgg aga tca cag cca ggg caa aac cac aca	676
Val Phe Tyr Cys Thr Phe Trp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asn His Thr	
205 210 215 220	
gcg gag ctg atc atc cca gaa ctg cct gca aca cat cct cca cag aac	724
Ala Glu Leu Ile Ile Pro Glu Leu Pro Ala Thr His Pro Pro Gln Asn	
225 230 235	
agg act cac tgg gtg ctt ctg gga tcc atc ctg ttg ttc ctc att gta	772
Arg Thr His Trp Val Leu Leu Gly Ser Ile Leu Leu Phe Leu Ile Val	
240 245 250	



gtg tcc acg gtc ctc ctc ttc ttg aga aaa caa gtg aga atg cta gat 820
Val Ser Thr Val Leu Leu Phe Leu Arg Lys Gln Val Arg Met Leu Asp
255 260 265

gtg gag aaa tgt ggc gtt gaa gat aca agc tca aaa aac cga aat gat 868
Val Glu Lys Cys Gly Val Glu Asp Thr Ser Ser Lys Asn Arg Asn Asp
270 275 280

aca caa ttc gag gag acg taa gcagtgttga accctctgat cgtcagattgg 919
Thr Gln Phe Glu Glu Thr
285 290

cagcttggtg totgtgaaaag aaagggccca tgggacatga gtccaaagac tcaagatgga 979
aactgagggga gagaaccaag aaagtgttgg gagaggagcc tggaaacaacg gacatttttt 1039
ccagggagac actgctaagc aagttgcccc tcagtcgtct tgggaaatgg attgaggggt 1099
cctggcttag cagctgggtcc ttgcacagtg acccttttcc ctgctcagtg ccgggatgag 1159
agatggagtc atgagtgttg aagaataagt gccttctatt tattttgagt ctgtgtgttc 1219
tcactttggg catgtaatta tgactgggtga attctgaaga catgatagat cttaagatgt 1279
agtcacaaaa ctcaactgct gcttagcctc ctccgtaact actgatacaa gcagggaaca 1339
cagaggtoac ctgcttggtt tgacaggctc ttgctgtctg actcaataa totttatttt 1399
tcagtcctca aggtctctcg atagcagttg ttctgtatca gccttatagg tgtoagggtat 1459
agcactcaac atctcatctc attacaatag caacccctcat caccatagca acagctaacc 1519
tctgttatcc tcaattcata gccagggaagc tgagcgacta agtcacttgc ccacagagta 1579
tcagctctca gattttctgtt ctccagccac tgccttttca ggtatagaatt tgcgttaag 1639
aaattaattt aaaaactgat tattgagtag cattgtatat caatcaaac atgcttctgt 1699
cactgtgctg gcctctgagc ataaagatgt acgcccaggt accggtcgga catgtttatg 1759
tgtgttaaat actcagagaa atgttcatta acaaggagct tgcatttttag agacactgga 1819
aagtaactcc agttcattgt ctagcattac atttacctca tttgtatctc ttgccataca 1879
gtctcttgtt ctccatgaag tgtoatgaat cttgttgaaat agttctttta ttttttaaat 1939
gtttctattt aaatgatatt gacatctgag gcatagctc agttgggttaa acccttttcc 1999
cacaagtgtg aaacctgag tottatccct agaaccacaa taaaaaacag ttgcgtatgt 2059
ttgtgcatgc ttttgatccc agcactaggg aggcagaggc aggcagatcc tgagctctca 2119
ttgaccacc agcctagcct acatgggttag ctccaggcct acaggagctg gcagagcctg 2179
aaaaacgatg cctagacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacacc 2239
atgtactcat agacctaat gcacctctct acacatgcac acacatacaa ttcaaacaca 2299
aatcaacagg gaattgtctc agaattgtcc ccaagacaaa gaagaagaaa aacacaaaac 2359
cagctctatt cctcagcct atctctctca ctcttctca gaagcaacta ctattgtttt 2419
tgtatataaa tttaaccaac gacagttat atgtagaata tatattaaag tgtctgtcaa 2479
tatatattat ctctttcttt ctctctctct tctctctctt ctctctctct tctctctctt 2539
ctctctctct tctctctctt ctctctctct tctctctctt ctctctctct tctctctctt 2599
ctctctctct tctctctctt ctctctctct tctctctctt ctctctctct tctctctctt 2659
ctgtgtctct cgcctctctt attaatgta tggatattta tgcgtctctc agaattggtc 2719
taaagctctt tgtttctagg tttctctccc catctctctc ggcctctctc acactgtctc 2779
ggcagacac catgtctgtc gcctgaatct gtagacacca ttataaagc acgtactcac 2839
cgagtttgta ttgtgtgtgt totgtgtgtg attaaaggga gaccatgagt cccagggtta 2899
cactgagtta cccagtaacc aagggggagc cttgtttgtg tctccatggc agaagcaggc 2959
ctggagccat ttgtgtttct tctgtgactt ctctcaaaaa cagaagcctc acttgctcat 3019

34366

tacaggttct cttttgggaa tgtcagcatt gctccttgac tgotgggtgc cctggaagga 3079
 gccattagc totgtgtgag cctttgacag ctactgcctc tcttaccac agggggcctct 3139
 aagatactgt tacctagagg tottgaggat ctgtgttctc tggggggagg aaaggaggag 3199
 gaaccacagaa ctttcttaca gttttccttg ttctgtcaca tgtcaagact gaaggaacag 3259
 gctggggtac gtagtgagat cctgtctcaa aggaaagacg agcatagccg aaccccccgt 3319
 ggaaccccct ctgttacctg ttcacacaag cttattgatg agtctcatgt taatgtcttg 3379
 tttgtatgaa gtttaagaaa atatcggggt gggcaacaca ttctatttat tcatttttatt 3439
 tgaaatctta atgcatctc atgggtgttg attgggtgtg cactttatto tttgtgttg 3499
 tgtataacca taaattttat ttgcatcag attgtcaatg tattgcatta atttaataaa 3559
 tatttttatt tattaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa 3593

<210> 23

<211> 290

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 23

Met	Arg	Ile	Phe	Ala	Gly	Ile	Ile	Phe	Thr	Ala	Cys	Cys	His	Leu	Leu
1				5						10				15	
Arg	Ala	Phe	Thr	Ile	Thr	Ala	Pro	Lys	Asp	Leu	Tyr	Val	Val	Glu	Tyr
			20					25						30	
Gly	Ser	Asn	Val	Thr	Met	Glu	Cys	Arg	Phe	Pro	Val	Glu	Arg	Glu	Leu
		35					40					45			
Asp	Leu	Leu	Ala	Leu	Val	Val	Tyr	Trp	Glu	Lys	Glu	Asp	Glu	Gln	Val
		50				55					60				
Ile	Gln	Phe	Val	Ala	Gly	Glu	Glu	Asp	Leu	Lys	Pro	Gln	His	Ser	Asn
	65				70				75					80	
Phe	Arg	Gly	Arg	Ala	Ser	Leu	Pro	Lys	Asp	Gln	Leu	Leu	Lys	Gly	Asn
			85					90						95	
Ala	Ala	Leu	Gln	Ile	Thr	Asp	Val	Lys	Leu	Gln	Asp	Ala	Gly	Val	Tyr
		100						105				110			
Cys	Cys	Ile	Ile	Ser	Tyr	Gly	Gly	Ala	Asp	Tyr	Lys	Arg	Ile	Thr	Leu
		115					120					125			
Lys	Val	Asn	Ala	Pro	Tyr	Arg	Lys	Ile	Asn	Gln	Arg	Ile	Ser	Val	Asp
		130					135				140				
Pro	Ala	Thr	Ser	Glu	His	Glu	Leu	Ile	Cys	Gln	Ala	Glu	Gly	Tyr	Pro
145				150					155					160	
Glu	Ala	Glu	Val	Ile	Trp	Thr	Asn	Ser	Asp	His	Gln	Pro	Val	Ser	Gly
			165						170					175	
Lys	Arg	Ser	Val	Thr	Thr	Ser	Arg	Thr	Glu	Gly	Met	Leu	Leu	Asn	Val
			180						185					190	
Thr	Ser	Ser	Leu	Arg	Val	Asn	Ala	Thr	Ala	Asn	Asp	Val	Phe	Tyr	Cys
			195				200						205		
Thr	Phe	Trp	Arg	Ser	Gln	Pro	Gly	Gln	Asn	His	Thr	Ala	Glu	Leu	Ile
	210						215						220		
Ile	Pro	Glu	Leu	Pro	Ala	Thr	His	Pro	Pro	Gln	Asn	Arg	Thr	His	Trp

225		230		235		240									
Val	Leu	Leu	Gly	Ser	Ile	Leu	Leu	Phe	Leu	Ile	Val	Val	Ser	Thr	Val
				245					250					255	
Leu	Leu	Phe	Leu	Arg	Lys	Gln	Val	Arg	Met	Leu	Asp	Val	Glu	Lys	Cys
			260					265					270		
Gly	Val	Glu	Asp	Thr	Ser	Ser	Lys	Asn	Arg	Asn	Asp	Thr	Gln	Phe	Glu
		275					280					285			
Glu	Thr														
	290														

Szabadalmi igénypontok:

1. B7-4 és PD-1 kölcsönhatását moduláló szer, immunválasz modulálásában történő alkalmazásra, amely érintkezésbe hozva B7-4-et — amely egy olyan aminosav-szekvenciát tartalmazó fehérje, amely legalább 50% aminosav-azonosságú a 2. vagy 4. azonosítószámú szekvencián bemutatott aminosav-szekvenciával — expresszázó sejttel vagy PD-1-et — amely a B7-4 receptora — expresszázó immunsejttel modulálja az immunválaszt, ahol a szer a következőket tartalmazza:

izolált nukleinsav-molekula, amely B7-4 fehérjét, PD-1 fehérjét vagy azok biológiai aktív részletét kódolja;

izolált B7-4 fehérje, biológiai aktív részlete vagy fúziós fehérjeje;

izolált PD-1 fehérje, biológiai aktív részlete vagy fúziós fehérjeje;

a B7-4 extracelluláris doménjét tartalmazó fehérje;

anti-B7-4 ellenanyag; vagy

anti-PD-1 ellenanyag.

2. Az 1. igénypont szerinti szer vagy a 9. igénypont szerinti alkalmazás, ahol az immunválasz gátló jellegű módon van szabályozva.

3. Az 1. igénypont szerinti szer vagy a 9. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a PD-1-en keresztül történő jeltovábbítás a következők által alkotott csoportból kiválasztott szerrel van stimulálva:

PD-1-et felismerő aktiváló ellenanyag, amely negatív jelet továbbít a PD-1-en keresztül;

PD-1-et felismerő ellenanyag multivalens formában; vagy

B7-4 gátló receptorhoz kötődő formája, ahol a B7-4 gátló receptorhoz kötődő formája:

a SEQ ID NO: 2 19-245. aminosavai vagy a SEQ ID NO: 4 19-238. aminosavai által alkotott extracelluláris domént tartalmazó polipeptid multivalens formában; vagy

olyan aminosav-szekvenciát tartalmazó polipeptid, multivalens formában, amelyet olyan nukleinsav-molekula kódol, amely sztringens hibridizációs körülmények közötti hibridizál a SEQ ID NO: 2 19-245. aminosavait vagy a SEQ ID NO: 4 19-238. aminosavait kódoló nukleotidok komplementeréhez, oly módon, hogy az egymással legalább 70%-ban homológ nukleotid-szekvenciák egymáshoz hibridizálva maradnak.

4. Az 1. igénypont szerinti szer vagy a 9. igénypont szerinti alkalmazás, ahol az immunsejt a következők által alkotott csoportból van kiválasztva: T-sejt, B-sejt és mieloid sejt.

5. A 2. igénypont szerinti szer, ahol az immunsejten anergia van létrehozva.

6. A 2. igénypont szerinti szer, immunválasz gátló jellegű szabályozásában történő alkalmazásra, az immunsejten egy további, immunválaszt gátló jellegűen szabályozó szerrel történő együtt érintkezése útján.

7. Az 1. igénypont szerinti szer vagy a 9. igénypont szerinti alkalmazás, ahol az immunválasz serkentő jellegű módon van szabályozva.

8. Az 1. igénypont szerinti szer vagy a 9. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a PD-1-en keresztül történő jeltovábbítás a következők által alkotott csoportból kiválasztott szerrel van gátolva:

PD-1-et felismerő blokkoló ellenanyag, amely gátolja negatív jel továbbítását a PD-1-en keresztül;

B7-4 oldható formája;

B7-4-et felismerő ellenanyag; vagy

PD-1 oldható formája.

9. B7-4 — amely egy olyan aminosav-szekvenciát tartalmazó fehérje, amely legalább 50% aminosav-azonosságú a 2. vagy 4. azonosítószámú szekvencián bemutatott aminosav-szekvenciával — és PD-1 — amely a B7-4 receptora — kölcsönhatását moduláló szer terápiásan hatásos mennyiségének alkalmazása immunválasz modulálására szolgáló gyógyszer előállítására, ahol a szer a következőket tartalmazza:

izolált nukleinsav-molekula, amely B7-4 fehérjét, PD-1 fehérjét vagy azok biológiai aktív részletét kódolja;

izolált B7-4 fehérje, biológiai aktív részlete vagy fúziós fehérje;

izolált PD-1 fehérje, biológiai aktív részlete vagy fúziós fehérje;

a B7-4 extracelluláris doménjét tartalmazó fehérje;

anti-B7-4 ellenanyag; vagy

anti-PD-1 ellenanyag.

ezáltal az immunválasz modulálására, amikor érintkezésbe van hozva B7-4-et expresszáló sejttel vagy PD-1-et expresszáló sejttel.

10. Az 1. igénypont szerinti szer, immunválasz modulálásában történő alkalmazásra, immunsejttel történő *in vitro* érintkezés útján.

11. A következők által alkotott csoportból kiválasztott szer:

izolált nukleinsav-molekula, amely B7-4 fehérjét, PD-1 fehérjét vagy azok biológiai aktív részletét kódolja;

izolált B7-4 fehérje, biológiai aktív részlete vagy fúziós fehérje;

izolált PD-1 fehérje, biológiai aktív részlete vagy fúziós fehérje;

a B7-4 extracelluláris doménjét tartalmazó fehérje;

anti-B7-4 ellenanyag; vagy

anti-PD-1 ellenanyag

B7-4 — amely egy olyan aminosav-szekvenciát tartalmazó fehérje, amely legalább 50% aminosav-azonosságú a 2. vagy 4. azonosítószámú szekvencián bemutatott aminosav-szekvenciával — és immunsejten

lévő gátló receptor kölcsönhatásának modulálásában történő alkalmazásra, amely érintkezésbe hozva B7-4-et expresszázó antigénprezentáló sejttel modulálja B7-4 kölcsönhatását az immunsejten lévő gátló receptorral.

12. A 11. igénypont szerinti szer, B7-4 és immunsejten lévő gátló receptor kölcsönhatásának modulálásában történő alkalmazásra, az immunsejtnél vagy antigénprezentáló sejtnél egy további, immunválaszt moduláló szerrel történő érintkeztetése útján.

13. A 11. igénypont szerinti szer, B7-4 és immunsejten lévő gátló receptor kölcsönhatásának modulálásában történő alkalmazásra, immunsejttel történő *in vitro* érintkeztetés útján.

14. A 11. igénypont szerinti szer, B7-4 és immunsejten lévő gátló receptor kölcsönhatásának modulálásában történő alkalmazásra, immunsejttel történő *in vivo* érintkeztetés útján.

15. A 11. vagy 12. igénypont szerinti szer, T-sejt, B-sejt vagy mieloid sejt bármelyikével történő érintkezésbe hozásban történő alkalmazásra.

16. Oltóanyag, amely kórokozóból származó polipeptidet és B7-4 — amely egy olyan aminosav-szekvenciát tartalmazó fehérje, amely legalább 50% aminosav-azonosságú a 2. vagy 4. azonosítószámú szekvencián bemutatott aminosav-szekvenciával — és PD-1 — amely a B7-4 receptora — kölcsönhatását gátló, a nukleinsav-molekulák, fehérjék, fehérje-homológok, ellenanyagok és kismolekulák által alkotott csoportból kiválasztott szert tartalmaz.

17. Készítmény, amely kórokozóból származó polipeptidet és B7-4 — amely egy olyan aminosav-szekvenciát tartalmazó fehérje, amely legalább 50% aminosav-azonosságú a 2. vagy 4. azonosítószámú szekvencián bemutatott aminosav-szekvenciával — és PD-1 — amely a B7-4 receptora — kölcsönhatását elősegítő, a nukleinsav-molekulák, fehérjék, fehérje-homológok, ellenanyagok és kismolekulák által alkotott csoportból kiválasztott szert tartalmaz.

18. PD-1 — amely a B7-4 receptora — és B7-4 — amely egy olyan aminosav-szekvenciát tartalmazó fehérje, amely legalább 50% aminosav-azonosságú a 2. vagy 4. azonosítószámú szekvencián bemutatott aminosav-szekvenciával — kölcsönhatását gátló szer, olyan alany kezelésében történő alkalmazásra, amelynek állapotában immunválasz serkentő jellegű szabályozása előnyös lenne, ahol a szer a következők által alkotott csoportból van kiválasztva:

PD-1-et felismerő blokkoló ellenanyag, amely gátolja negatív jel továbbítását a PD-1-en keresztül;

B7-4 oldható formája;

B7-4-et felismerő ellenanyag; vagy

PD-1 oldható formája.

19. A 18. igénypont szerinti szer, amely PD-1 vagy B7-4 oldható formáját tartalmazza.

20. A 18. vagy 19. igénypont szerinti szer, egy második, az alany immunválaszt serkentő jellegű szabályozó szerrel együtt való beadásra történő alkalmazásra.

21. A 18-20. igénypontok bármelyike szerinti szer, daganat, neurológiai betegség vagy immunszuppresszív betegség bármelyikének kezelésében történő alkalmazásra.

22. B7-4 — amely egy olyan aminosav-szekvenciát tartalmazó fehérje, amely legalább 50% aminosav-azonosságú a 2. vagy 4. azonosítószámú szekvencián bemutatott aminosav-szekvenciával — által közvetített, alany immunsejtjében PD-1-en — amely a B7-4 receptora — keresztüli jel továbbítást stimuláló

szer, olyan alany kezelésében történő alkalmazásra, amelynek állapotára immunválasz gátló jellegű szabályozása előnyösen hatna, ahol a szer a következők által alkotott csoportból van kiválasztva

izolált B7-4 fehérje, biológiai aktív részlete vagy fúziós fehérjeje, amely a PD-1 receptorhoz kötődik; vagy

PD-1-et felismerő ellenanyag, amely negatív jelet továbbít a PD-1-en keresztül.

23. A 22. igénypont szerinti szer, amely

PD-1-et felismerő ellenanyag, amely negatív jelet továbbít a PD-1-en keresztül;

PD-1-et felismerő ellenanyag multivalens formában; vagy

B7-4 oldható formája.

24. A 22. vagy 23. igénypont szerinti szer, egy második, az alany immunválaszát gátló jellegű szabályozó szerrel együtt történő beadásra történő alkalmazásra.

25. A 22-24. igénypontok bármelyike szerinti szer, transzplantáció, allergia vagy autoimmun rendellenesség bármelyikének kezelésében történő alkalmazásra.

26. Sejtalapú vizsgálati eljárás B7-4 ----- amely egy olyan aminosav-szekvenciát tartalmazó fehérje, amely legalább 50% aminosav-azonosságú a 2. vagy 4. azonosítószámú szekvencián bemutatott aminosav-szekvenciával ----- vagy PD-1 aktivitását a B7-4 és PD-1 kölcsönhatásának modulálása útján moduláló vegyületek szkrinelésére, *azzal jellemezve*, hogy B7-4-et expresszáló sejtet érintkezésbe hozunk tesztvegyülettel, és meghatározzuk a tesztvegyület képességét a B7-4 vagy PD-1 aktivitásának modulálására.

27. Sejtmentes vizsgálati eljárás B7-4 ----- amely egy olyan aminosav-szekvenciát tartalmazó fehérje, amely legalább 50% aminosav-azonosságú a 2. vagy 4. azonosítószámú szekvencián bemutatott aminosav-szekvenciával ----- vagy PD-1 aktivitását a B7-4 és PD-1 kölcsönhatásának modulálása útján moduláló vegyületek szkrinelésére, *azzal jellemezve*, hogy B7-4- vagy PD-1-fehérjét vagy annak biológiailag aktív részletét érintkezésbe hozzuk tesztvegyülettel, és meghatározzuk a tesztvegyület képességét a B7-4- vagy PD-1-fehérje vagy annak biológiailag aktív részlete aktivitásának modulálására.

A meghatalmazott:

DANUBIA

Szabadalmi és Jogi Iroda Kft.

Lengyel Zsolt

szabadalmi ügyvivő

MEGA

CYLC

GCTTCCCGAGGGCTCCGCACCCAGCCGCGCTTCTGTCCGCCTGCAGGGGCATTCCA
GAAAGATGAGGATATTTGCTGTCTTTATATTCATGACCTACTGGCATTGCTG
AACGCATTTACTGTCACGGTTCCCAAGGACCTATATGTGGTAGAGTATGGTA
GCAATATGACAATTGAATGCAAATTECCAGTAGAAAAACAATTAGACCTGGC
TGCACTAATTGTCTATTGGGAAATGGAGGATAAGAACATTATTCAATTTGTGC
ATGGAGAGGAAGACCTGAAGGTTTCAGCATAGTAGCTACAGACAGAGGGCCC
GGCTGTTGAAGGACCAGCTCTCCCTGGGAAATGCTGCACTTCAGATCACAGA
TGTGAAATTGCAGGATGCAGGGGTGTACCGCTGCATGATCAGCTATGGTGGT
GCCGACTACAAGCGAATTACTGTGAAAGTCAATGCCCCATACAACAAAATCA
ACCAAAGAATTTTGGTTGTGGATCCAGTCACCTCTGAACATGAACTGACATGT
CAGGCTGAGGGCTACCCCAAGGCCGAAGTCATCTGGACAAGCAGTGACCATC
AAGTCCTGAGTGGTAAGACCACCACCACCAATTCCAAGAGAGAGGAGAAGC
TTTTCAATGTGACCAGCACACTGAGAATCAACACAACAATAATGAGATTTT
CTACTGCACTTTTAGGAGATTAGATCCTGAGGAAAACCATACAGCTGAATTG
GTCATCCCAGGTAATATTCTGAATGTGTCCATTAAATATGTCTAACACTGTC
CCCTAGCACCTAGCATGATGTCTGCCTATCATAGTCATTCAGTGATTGTTGAA
TAAATGAATGAATGAATAACACTATGTTTACAAAATATATCCTAATTCCTCAC
CTCCATTTCATCCAAACCATATTGTTACTTAATAAACATTCAGCAGATATTTAT
GGAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

CGAGGCTCCGCACCAAGCCGCGCTTCTGTCCGCCTGCAGGGCATTCCAGAAAGA
TGACCATATTTGCTGTCTTTATATTCATGACCTACTGGCATTGCTGAACGCATT
TACTGTCACGGTTCCCAAGGACCTATATGTGGTAGAGTATGGTAGCAATATGAC
AATTGAATGCAAATTCAGTAGAAAAACAATTAGACCTGGCTGCACTAATTGT
CTATTGGGAAATGGAGGATAAGAACATTATTCAATTTGTGCATGGAGAGGAAG
ACCTGAAGGTTTACGATAGTAGCTACAGACAGAGGGCCCGCTGTTGAAGGAC
CAGCTCTCCCTGGGAAATGCTGCACTTCAGATCACAGATGTGAAATTGCAGGAT
GCAGGGGTGTACCGCTGCATGATCAGCTATGGTGGTGCCGACTACAAGCGAAT
TACTGTGAAAGTCAATGCCCCATACAACAAAATCAACCAAGAATTTTGGTTGT
GGATCCAGTCACCTCTGAACATGAACTGACATGTCAGGCTGAGGGCTACCCCA
AGGCCGAAGTCATCTGGACAAGCAGTGACCATCAAGTCTTGAGTGGTAAGACC
ACCACCACCAATTCCAAGAGAGAGGAGAAGCTTTTCAATGTGACCAGCACACT
GAGAATCAACACAACAATAATGAGATTTTCTACTGCCATTTTAGGAGATTAGA
TCCTGAGGAAAACCATACAGCTGAATTGGTCATCCCAGAACTACCTCTGGCACA
TCCTCCAAATGAAAGGACTCACTTGGTAATTCTGGGAGCCATCTTATTATGCCCT
GGTGTAGCACTGACATTCATCTTCCGTTTAAGAAAAGGGAGAATGATGGATGT
GAAAAAATGTGGCATCCAAGATACAACTCAAAGAAGCAAAGTGATACACATTT
GGAGGAGACGTAATCCAGCATTGGAACCTTCTGATCTTCAAGCAGGGATTCTCA
ACCTGTGGTTTAGGGGTTTCATCGGGGCTGAGCGTGACAAGAGGAAGGAATGG
GCCCCTGGGATGCAGGCAATGTGGGACTTAAAAGGCCCAAGCACTGAAAATG
GAACCTGGCGAAAGCAGAGGAGGAGAATGAAGAAAGATGGAGTCAAACAGGG
AGCCTGGAGGGAGACCTTGATACTTTCAAATGCCTGAGGGGCTCATCGACGCC
TGTGACAGGGAGAAAGGATACTTCTGAACAAGGAGCCTCCAAGCAAATCATCC
ATTGCTCATCCTAGGAAGACGGGTTGAGAATCCCTAATTTGAGGGTCAGTTCT
GCAGAAAGTGCCCTTTGCCCTCACTCAATGCCTCAATTTGTTTTCTGCATGACTGA
GAGTCTCAGTGTGGAACGGGACAGTATTTATGTATGAGTTTTTCTATTATTT
TGAGTCTGTGAGGTCTTCTTGTGATGTGAGTGTGGTTGTGAATGATTTCTTTGA
AGATATATTGTAGTAGATGTTACAATTTGTGCGCAAACTAACTTGCTGCTTAA
TGATTTGCTCACATCTAGTAAAACATGGAGTATTTGTAAAAA

292 szekretált (245 aminosav)

Szignál/IgV/IgC/hidrofób farok

(a) (b) (c) (d)

Ig-ciszteinek nagyobb félkövér betűtípussal jelölve

MRIFAVFIFMTYWHLNA (szignálszekvencia)

FTVTVPKDLVVEYGSNMTIE**C**KFPVEKQLDLAALIVWEMEDKN
 IIQFVHGEEDLKVQHSSYRQARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQD
 AGVYR**C**MISYGGADYKRITVKVNAPY (IgV)

NKINQRILVDPVTSEHELT**C**QAGYPKAEVIWTSSDHQVLSGKT
 TTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFY**C**TFRRLDPEENHTAEL
 VIP (IgC)

GNILNVSIIKICLTLSPT (hidrofób farok)

3. ábra

292 szekretált (290 aminosav)

Szignál/IgV/IgC/transzmembrán (aláhúzza)
plusz citoplazmatikus

Ig-ciszteinek nagyobb félkövér betűtípussal jelölve

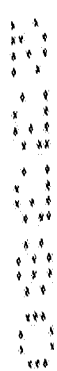
MRIFAVFIFMTYWHLNA (szignálszekvencia)

FTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVWEMEDKN
IIQFVHGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQD
AGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPY (IgV)

NKINQRILVVDVPTSEHELTCAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGKT
TTNSKREEKLFNVTSTLRINTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAEL
VIP (IgC)

ELPLAHPPNERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMDVKKC
GIQDTNSKKQSDTHLEET (transzmembrán plusz citoplazmatikus)

4. ábra



AGATAGTTCCCAAACATGAGGATATTTGCTGGCATTATATTCACAGCCTGC
TGTCACCTTGCTACGGGCGTTTACTATCACGGCTCCAAAGGACTTGACGTG
GTGGAGTATGGCAGCAACGTCACGATGGAGTGCAGATTCCTGTAGAACG
GGAGCTGGACCTGCTTGCGTTAGTGGTGTACTGGGAAAAGGAAGATGAGC
AAGTGATTCAGTTTGTGGCAGGAGAGGAGGACCTTAAGCCTCAGCACAGCA
ACTTCAGGGGGGAGAGCCTCGCTGCCAAAGGACCAGCTTTTGAAGGGAAAT
GCTGCCCTTCAGATCACAGACGTCAAGCTGCAGGACGCAGGCGTTTACTGC
TGCATAATCAGCTACGGTGGTGCAGGACTACAAGCGAATCACGCTGAAAGTC
AATGCCCCATACCGCAAAATCAACCAGAGAATTTCCGTGGATCCAGCCACTT
CTGAGCATGAACTAATATGTCAGGCCGAGGGTTATCCAGAAGCTGAGGTAA
TCTGGACAAACAGTGACCACCAACCCGTGAGTGGGAAGAGAAGTGTCACCA
CTTCCCGGACAGAGGGGATGCTTCTCAATGTGACCAGCAGTCTGAGGGTCA
ACGCCACAGCGAATGATGTTTTCTACTGTACGTTTTGGAGATCACAGCCAG
GGCAAAACCACACAGCGGAGCTGATCATCCAGAAGTGCCTGCAACACATC
CTCCACAGAACAGGACTCACTGGGTGCTTCTGGGATCCATCCTGTTGTTCC
TCATTGTAGTGTCCACGGTCCTCCTCTTCTTGAGAAAACAAGTGAGAATGCT
AGATGTGGAGAAATGTGGCGTTGAAGATACAAGCTCAAAAAACCGAAATGA
TACACAATTCGAGGAGACGTAAGCAGTGTTGAACCCTCTGATCGTCGATTG
GCAGCTTGTGGTCTGTGAAAGAAAGGGCCCATGGGACATGAGTCCAAAGAC
TCAAGATGGAACCTGAGGGGAGAGAACCAAGAAAGTGTTGGGAGAGGAGCC
TGAACAACCGACATTTTTTCCAGGGAGACACTGCTAAGCAAGTTGCCCAT
CAGTCGTCTTGGGAAATGGATTGAGGGTTCCTGGCTTAGCAGCTGGTCCCT
GCACAGTGACCTTTTCTCTGCTCAGTGCCGGGATGAGAGATGGAGTCATG
AGTGTTGAAGAATAAGTGCCCTTCTATTTATTTTGAGTCTGTGTGTTCTCACTT
TGGGCATGTAATTATGACTGGTGAATTCTGACGACATGATAGATCTTAAGAT
GTAGTCACCAAACTCAACTGCTGCTTAGCATCCTCCGTAACACTACTGATACAA
GCAGGGAACACAGAGGTCACCTGCTTGGTTTGACAGGCTCTTGCTGTCTGA
CTCAAATAATCTTTATTTTTCACTCCTCAAGGCTCTTCGATAGCAGTTGTTCT
GTATCAGCCTTATAGGTGTCAGGTATAGCACTCAACATCTCATCTCATTACA
ATAGCAACCCTCATCACCATAGCAACAGCTAACCTCTGTTATCCTCACTTCA
TAGCCAGGAAGCTGAGCGACTAAGTCACTTGCCACACAGAGTATCAGCTCTC
AGATTTCTGTTCTTCAGCCACTGTCCTTTCAAGGATAGAATTTGTCGTTAAGAA
ATTAATTTAAAACTGATTATTGAGTAGCATTGTATATCAATCACACATGCC
TTGTGCACTGTGCTGGCCTCTGAGCATAAAGATGTACGCCGGAGTACCGGT
CGGACATGTTTATGTGTGTTAAATACTCAGAGAAATGTTCAATTAACAAGGAG
CTTGCATTTTAGAGACACTGGAAAGTAACTCCAGTTCAATTGTCTAGCATTAC
ATTTACCTCATTTGCTATCCTTGCCATACAGTCTCTTGTTCTCCATGAAGTGT
CATGAATCTTGTTGAATAGTTCCTTTATTTTTTAAATGTTTCTATTTAAATGATA
TTGACATCTGAGGCGATAGCTCAGTTGGTAAAACCTTTCTCACAAGTGTG
AAACCTGAGTCTTATCCCTAGAACCACATAAAAAACAGTTGCGTATGTTT
GTGCATGCTTTTGATCCAGCACTAGGGAGGCAGAGGCAGGCAGATCCTG
AGCTCTCATTGACCACCCAGCCTAGCCTACATGGTTAGCTCCAGGCCTACA
GGAGCTGGCAGAGCCTGAAAAACGATGCCTAGACACACACACACACACA
CACACACACACACACACACACACACACCATGTACTCATAGACCTAAGTGCACC
CTCCTACACATGCACACACATACAATTCAAACACAAATCAACAGGGAATTGT

CTCAGAATGGTCCCCAAGACAAAGAAGAAGAAAAACACCAAACCAGCTCTA
TTCCCTCAGCCTATCCTCTCTACTCCTTCCTAGAAGCAACTACTATTGTTTTT
GTATATAAATTTACCCAACGACAGTTAATATGTAGAATATATATTAAAGTGTC
TGTCAATATATATTATCTCTTTCTTTCTTTCTTCCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCT
TTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCT
CTTCCTTCCTTCCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCT
TGGTTGCTCACTATGCATTTTCTGTGCTCTTCGCCCTTTTTATTTAATGTATG
GATATTTATGCTGCTTCCAGAATGGATCTAAAGCTCTTTGTTTCTAGGTTTTCT
TCCCCCATCCTTCTAGGCATCTCTCACACTGTCTAGGCCAGACACCATGTCT
GCTGCCTGAATCTGTAGACACCAITTTATAAAGCACGTA CTACCCAGTTTGT
ATTTGGCTTGTTCTGTGTCTGATTAAAGGGAGACCATGAGTCCCCAGGGTA
CACTGAGTTACCCCAGTACCAAGGGGGAGCCTTGTTTGTGTCTCCATGGCA
GAAGCAGGCCTGGAGCCATTTTGGTTTCTTCCTTGACTTCTCTCAAACACAG
ACGCCTCACTTGCTCATTACAGGTTCTCCTTTGGGAATGTCAGCATTGCTCC
TTGACTGCTGGCTGCCCTGGAAGGAGCCCATTAGCTCTGTGTGAGCCCTTG
ACAGCTACTGCCTCTCCTTACCACAGGGGCCTCTAAGATACTGTTACCTAGA
GGTCTTGAGGATCTGTGTTCTCTGGGGGGAGGAAAGGAGGAGGAACCCAG
AACTTTCTTACAGTTTTCTTGTTCTGTCTCACATGTCAAGACTGAAGGAACAG
GCTGGGCTACGTAGTGAGATCCTGTCTCAAAGGAAAGACGAGCATAGCCGA
ACCCCCGGTGGAACCCCCTCTGTTACCTGTTTACACAAGCTTATTGATGAGT
CTCATGTTAATGTCTTGTTTGTATGAAGTTTAAGAAAATATCGGGTTGGGCAA
CACATTCTATTTATTCATTTTATTTGAAATCTTAATGCCATCTCATGGTGTGG
ATTGGTGTGGCACTTTATTCCTTTTGTGTTGTGTATAACCATAAATTTTATTTTG
CATCAGATTGTCAATGTATTGCATTAATTTAATAAATATTTTATTTATTAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAA

5. ábra folytatása

PCT/US00/23347

7/28

MRIFAGIIFTACCHLLRAFTITAPKDLYWEYGSNVTMECRFPVERELDLLALVYWEKEDEQVIQFVAGEE
DLKPQHSNFRGRASLPKDQLKGNAAALQITDVKLQDAGVYCCIISYGGADYKRITLKVNAPYRKINQRISV
DPATSEHELICQAEGYPEAEVIWTNSDHQPVSGKRSVTTSRTEGMLLNVTSSLRVNATANDVFYCTFWR
SQPGQNHATAELIPELPATHPPQNRTHWLLGSILLFLIVVSTVLLFLRKQVRMLDVEKCGVEDTSSKNRN
DTQFEET.

6. ábra

mB7-4 vs hB7-4

69 % azonosság

mB7-4 1 MRIFAGIIFTACCHLIEAFTITAPKDLVVEYGSNVTMECRFPVERELDLLALVYWEKE 60
MRIFA IF HLL AFT+T PKDLVVEYGSN+T+EC+FPVE++LDL AL+VYWE E
hB7-4 1 MRIFAVFIFMTYWHLLNAFTVTVPKDLVVEYGSNWTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEKE 60

mB7-4 61 DEQVIQFVAGEEDLKQHSNFRGRASLPKQDLKGNALQITDVKLQDAGVYCCIISYGG 120
D+ +IQFV GEEDLK QHS++R RA L KDQL GNAALQITDVKLQDAGVY C+ISYGG
hB7-4 61 DKNIIQFVHGEEDLKQHSYRQRARLLKQDLKGNALQITDVKLQDAGVYRCMISYGG 120

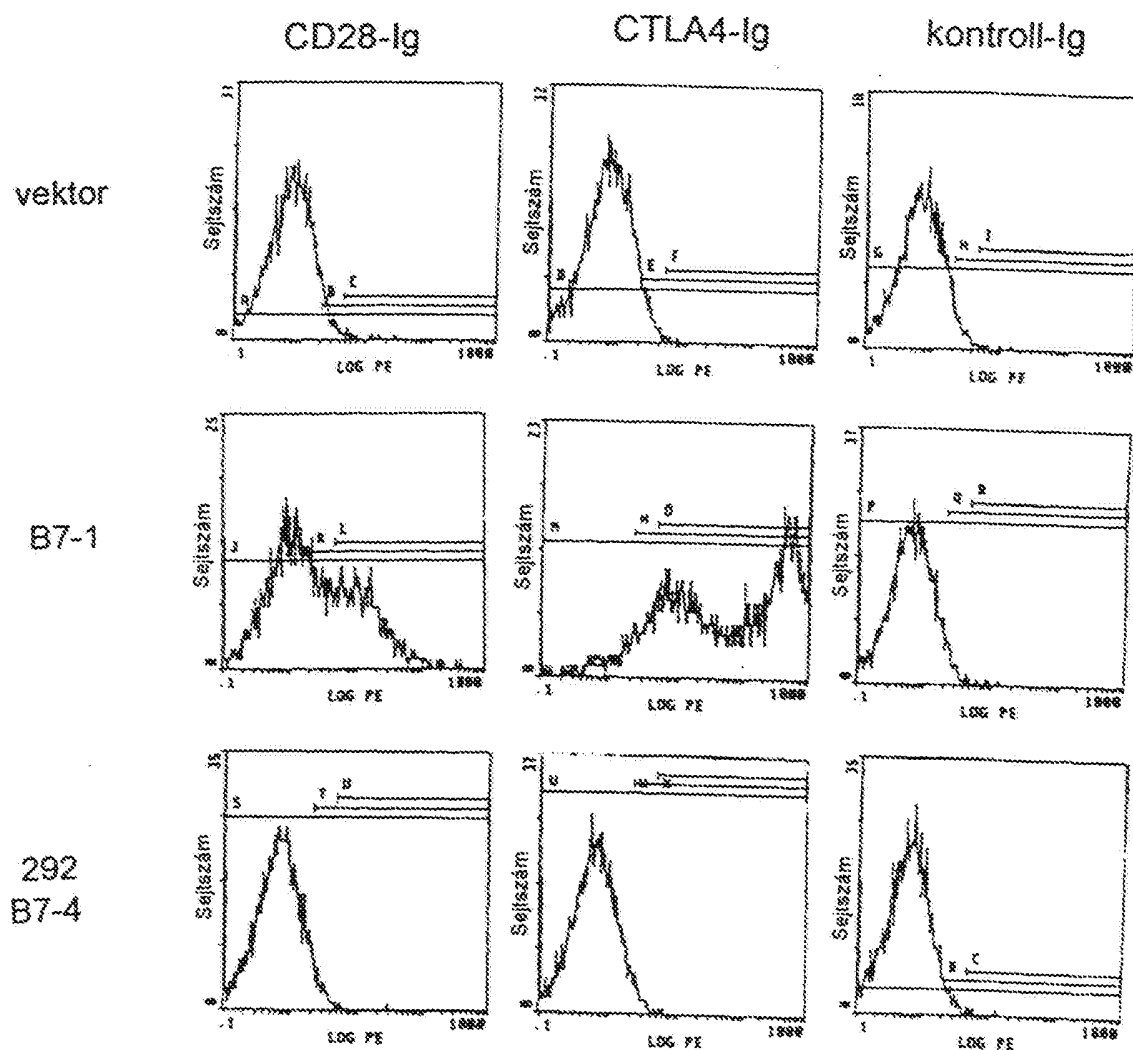
mB7-4 121 ADYKRITLKVNPYRKINQRI-SVDPATSEHELICQAEGYPAEVIWNTSDHQPVSGKRS 179
ADYKRIT+KVNPY KINQRI VDP TSEHEL CQAEGYPAEVIWNT+SDHQ +SGK +
hB7-4 121 ADYKRITVKVNPYKINQRIILVDPVTSEHELTCQAEGYPAEVIWNTSSDHQVLSGKTT 180

mB7-4 180 VTTSRTEGMLLNVTSRLRVNATANDVYCTFWRSQPGQNHTAELIIPELPATHPPQNRT 239
T S+ E L NVTS+LR+N T N++FYCTF R P +NHTAEL+IPELP HPP RTH
hB7-4 181 TTNSKREEKLFNVTETLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVPELPLAHPPNERTH 240

mB7-4 240 WVLLGSILLFLIVVSTVLLFLRKQVRMLDVEKCGVEDTSSKNRNDTQFEET 290
V+LG+ILL L V T + LRK RM+DV+KCG++DT+SK ++DT EET
hB7-4 241 LVILGAILLCGLVLTFFIFLRNG-RMMDVKKCGIQDTNSKKQSDTHLEET 290

7. ábra

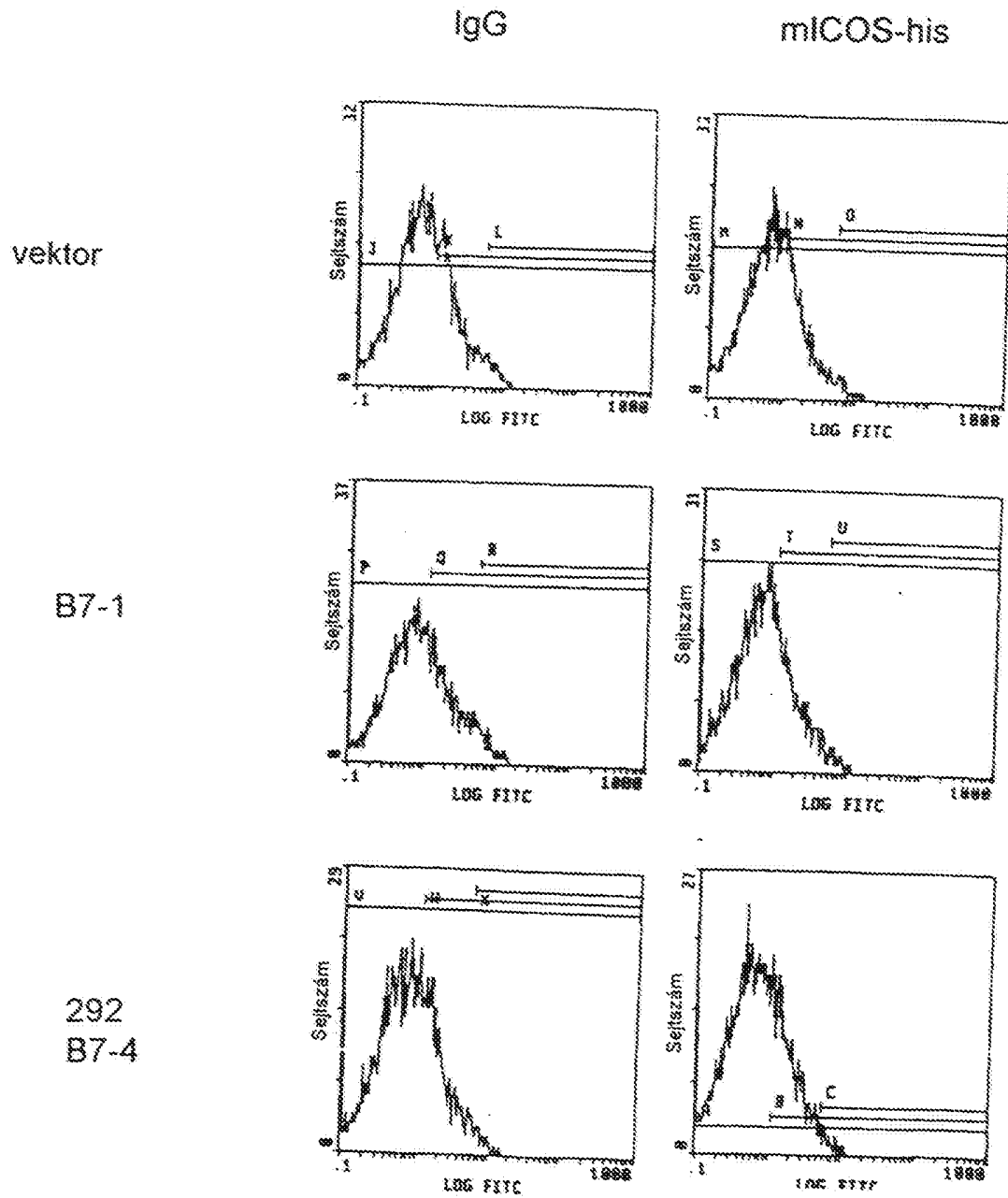




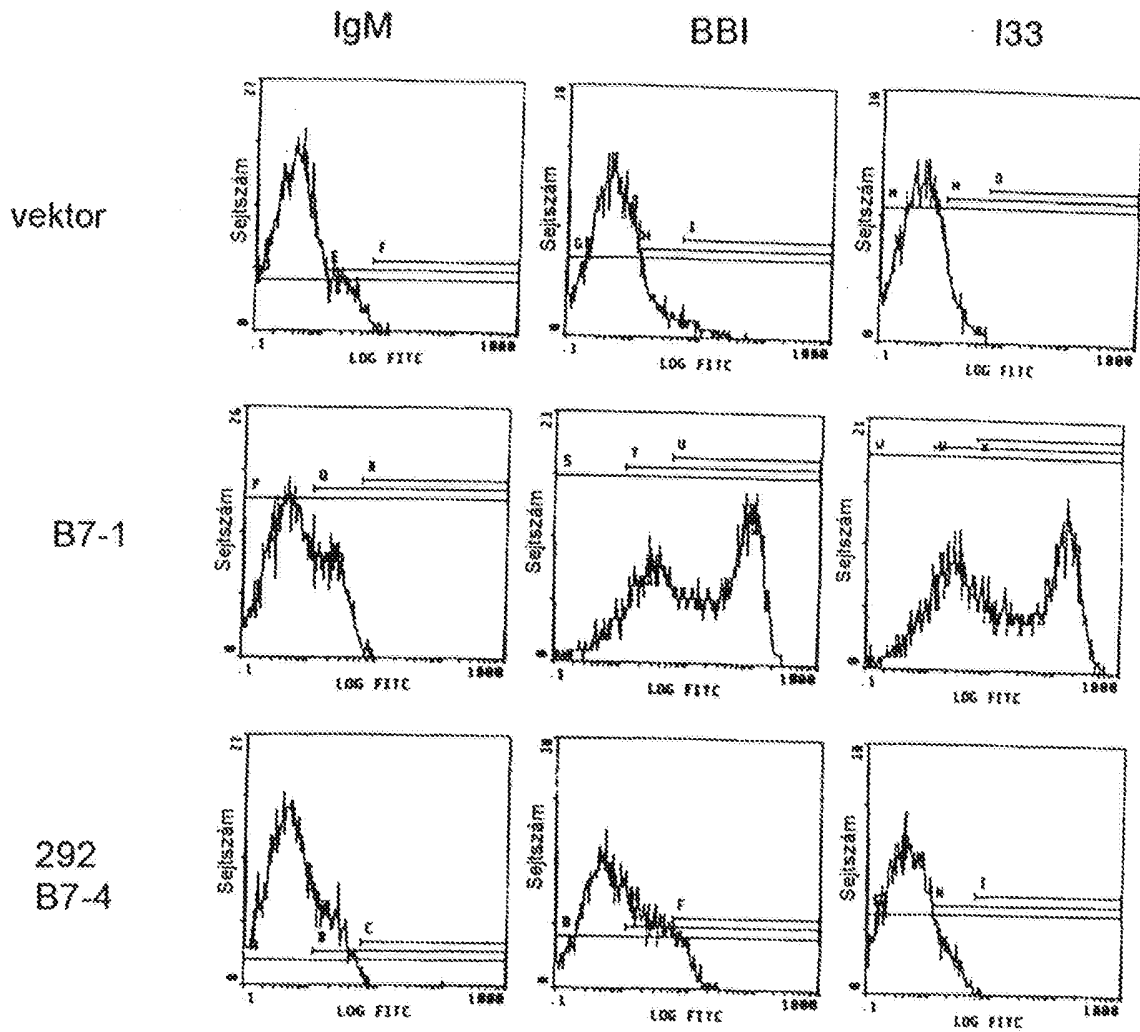
8. ábra

PCT/US00/23347

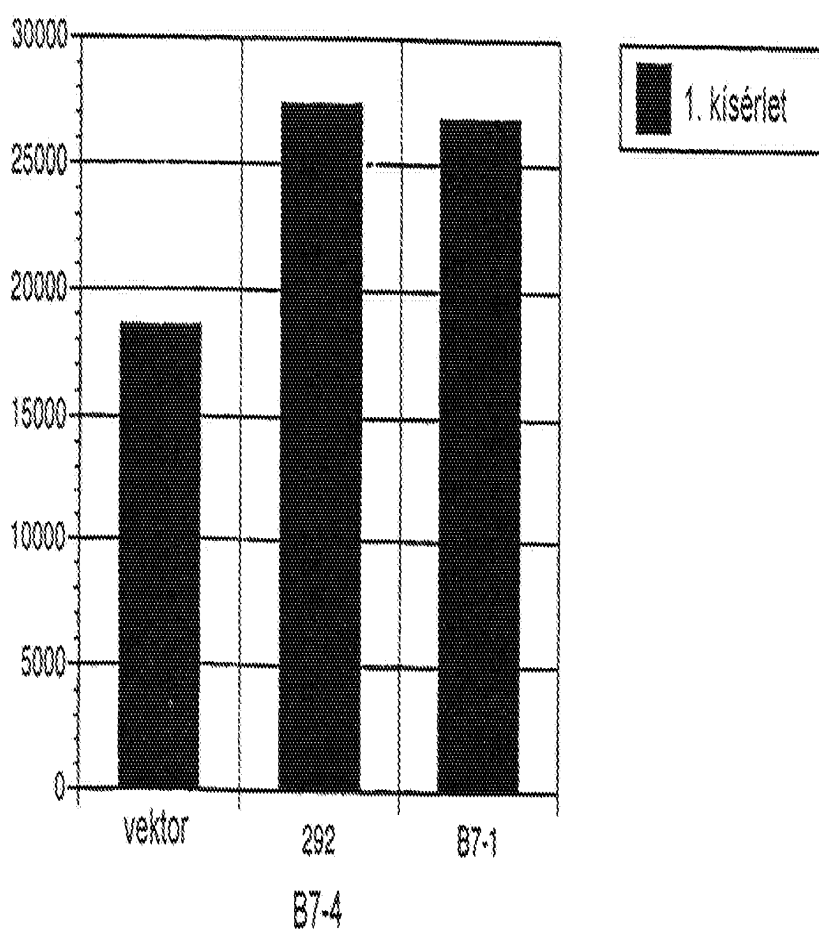
10/28



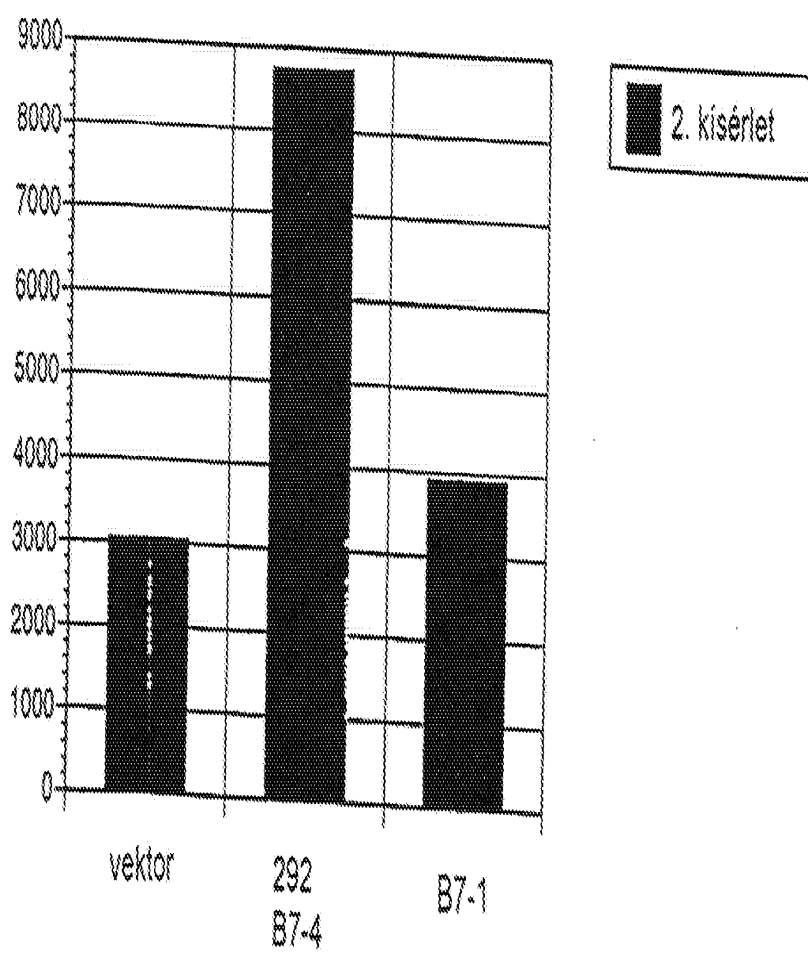
9. ábra



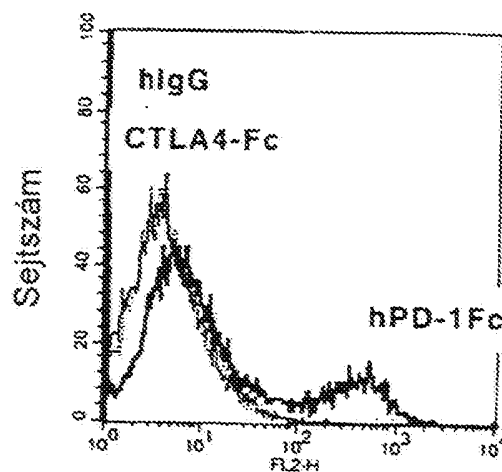
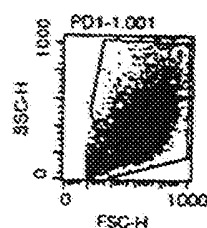
10. ábra



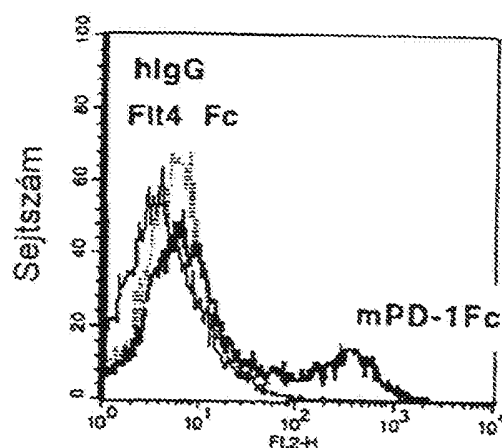
11. ábra



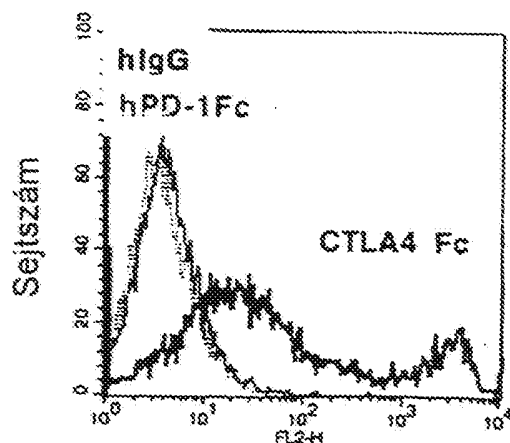
12. ábra



292
B7-4

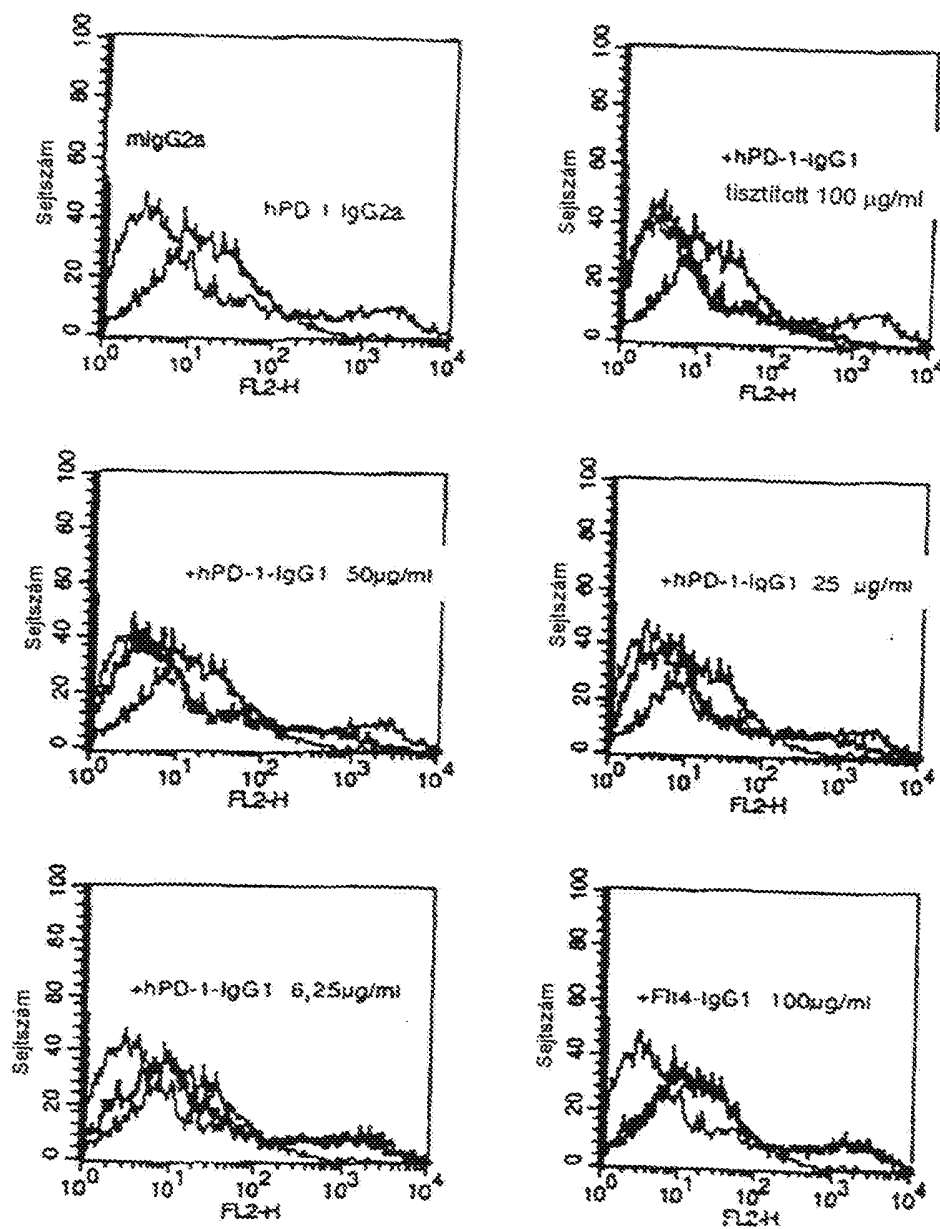


292
B7-4

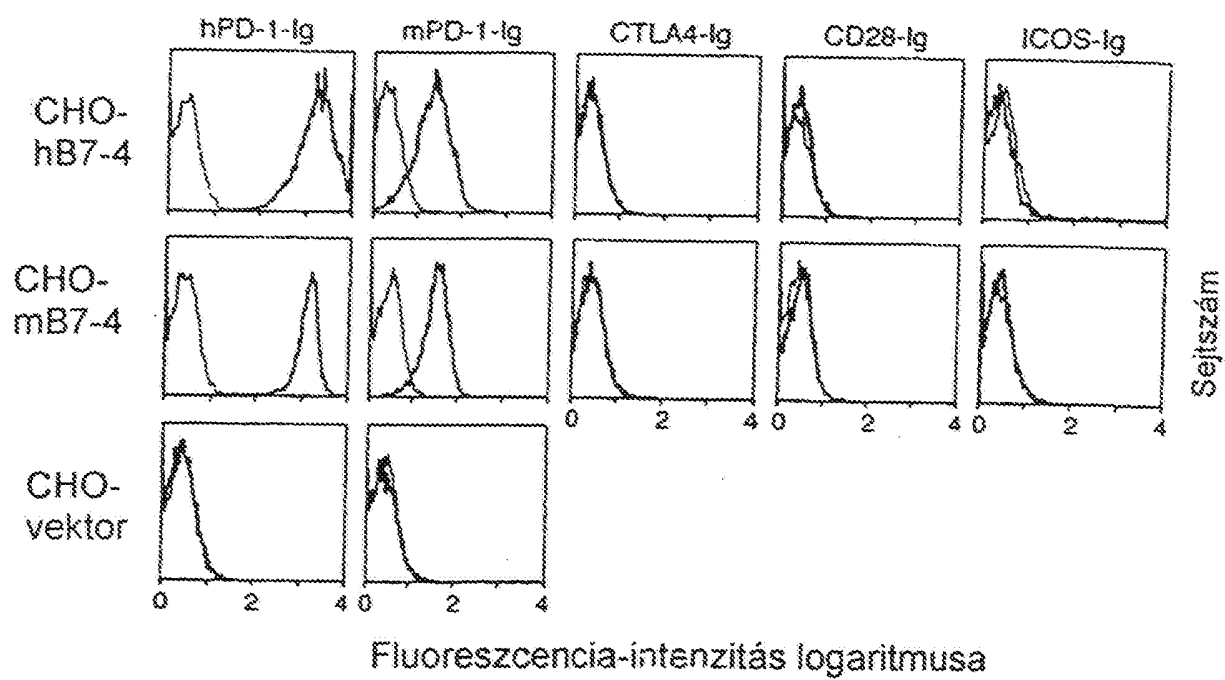


B7-1

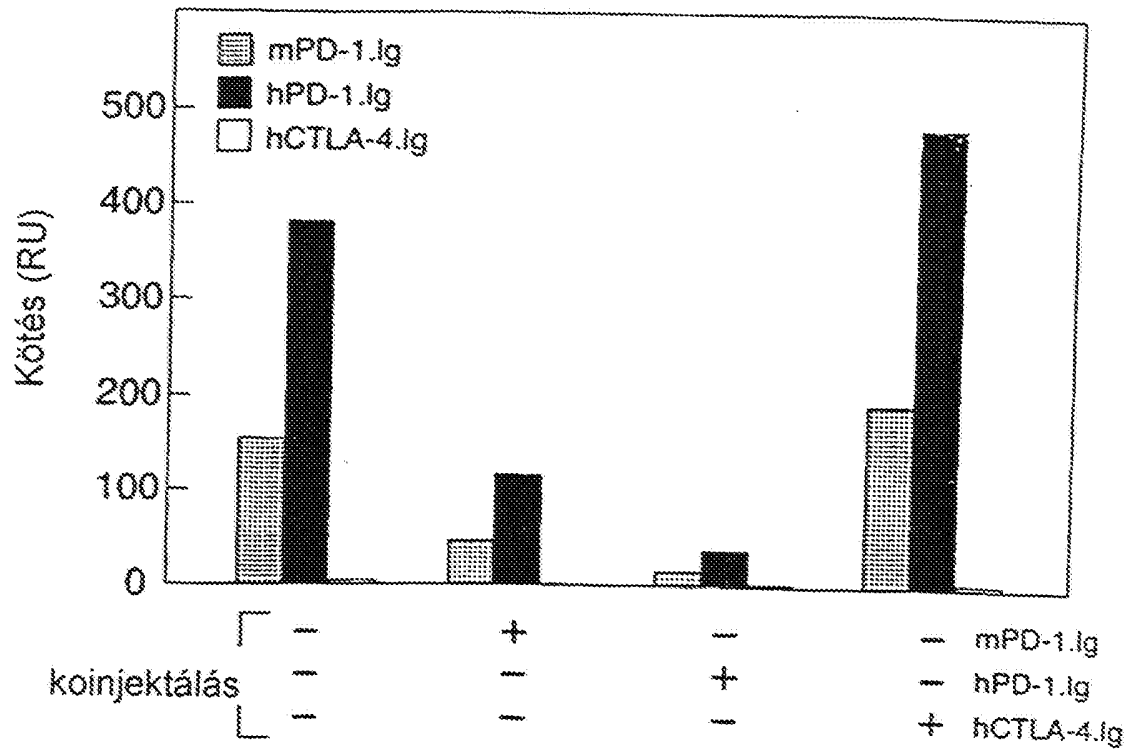
13. ábra



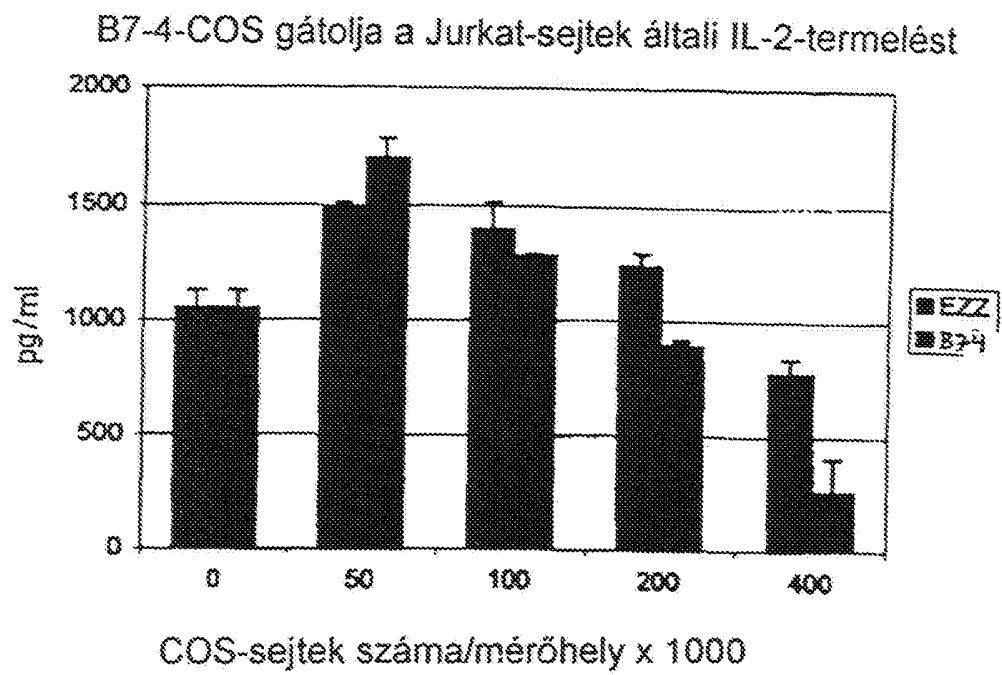
14. ábra



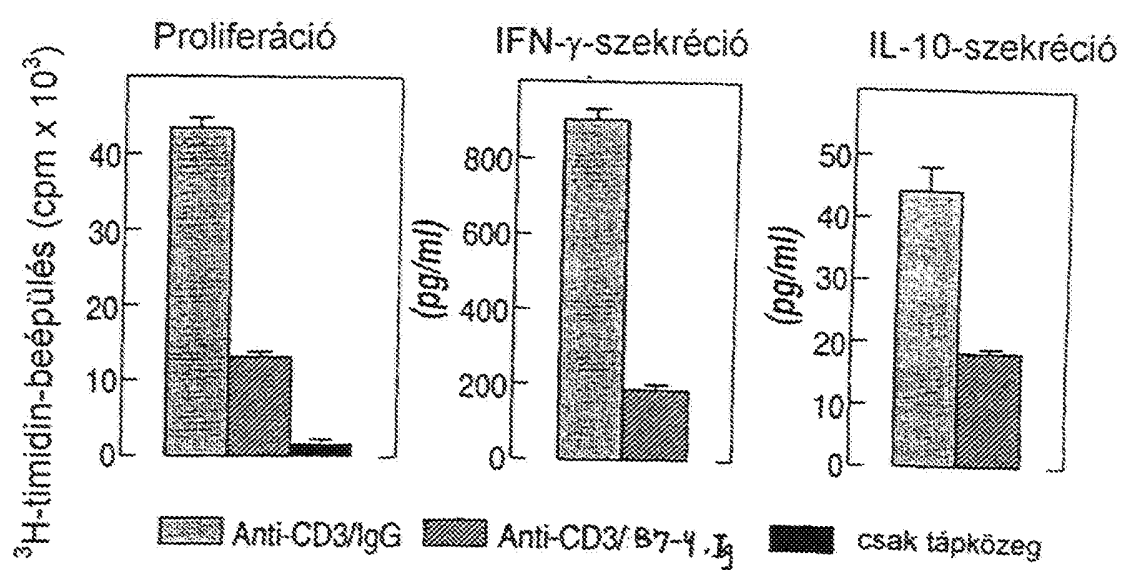
15. ábra



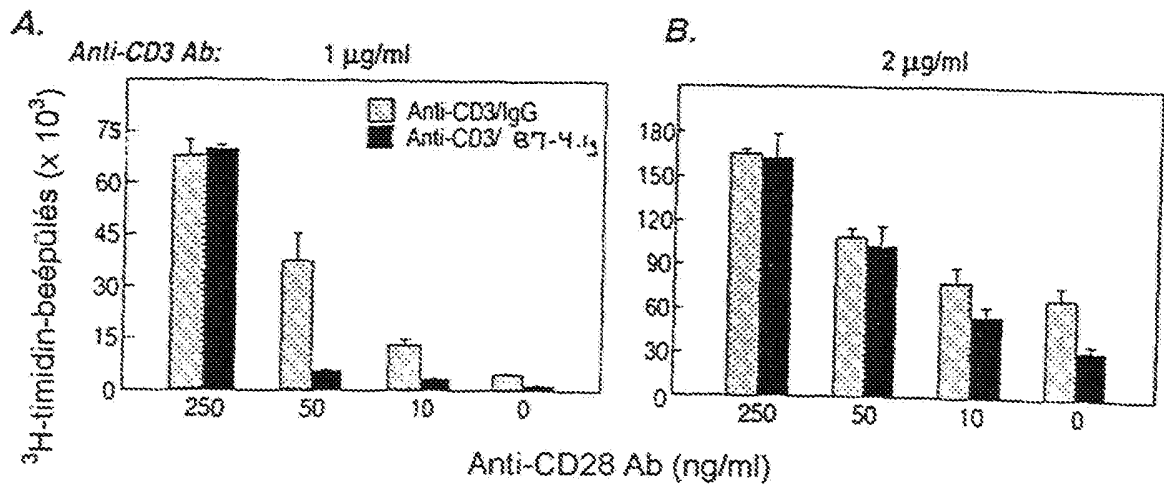
16. ábra



17. ábra

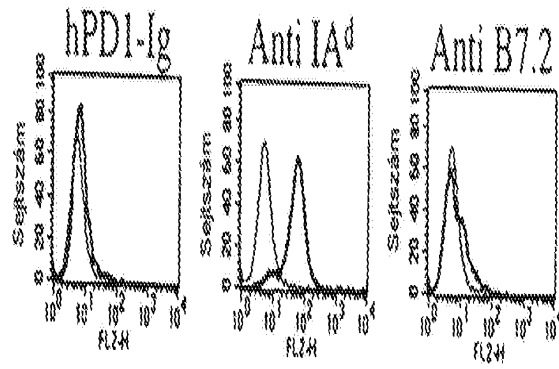


18. ábra

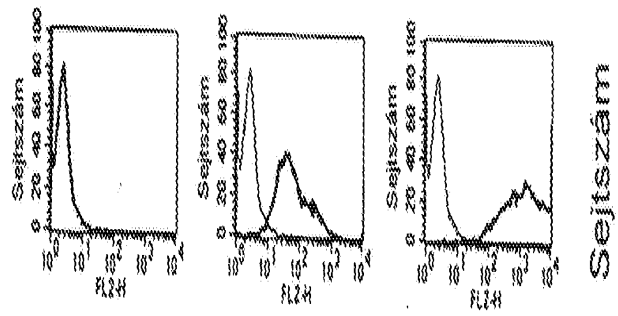


19. ábra

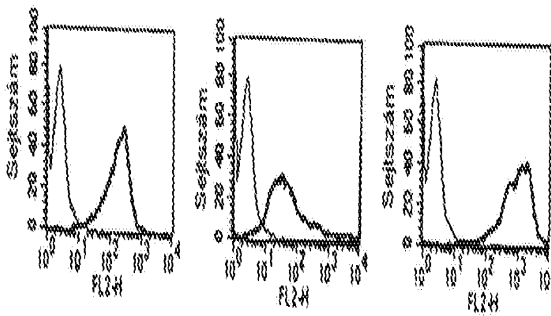
CHO-IA^d



CHO-IA^d/B7.2/

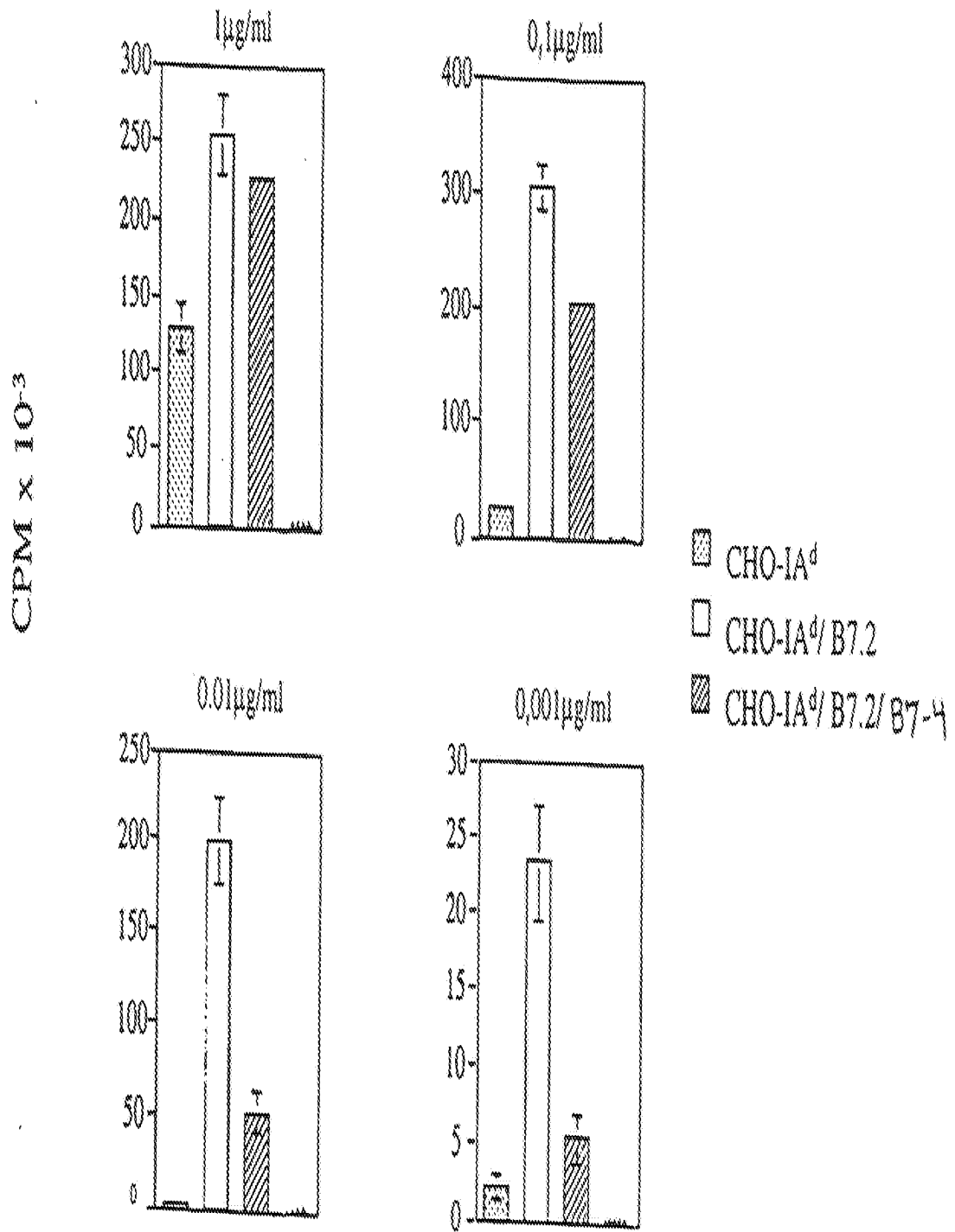


CHO-IA^d/B7.2/B7-4

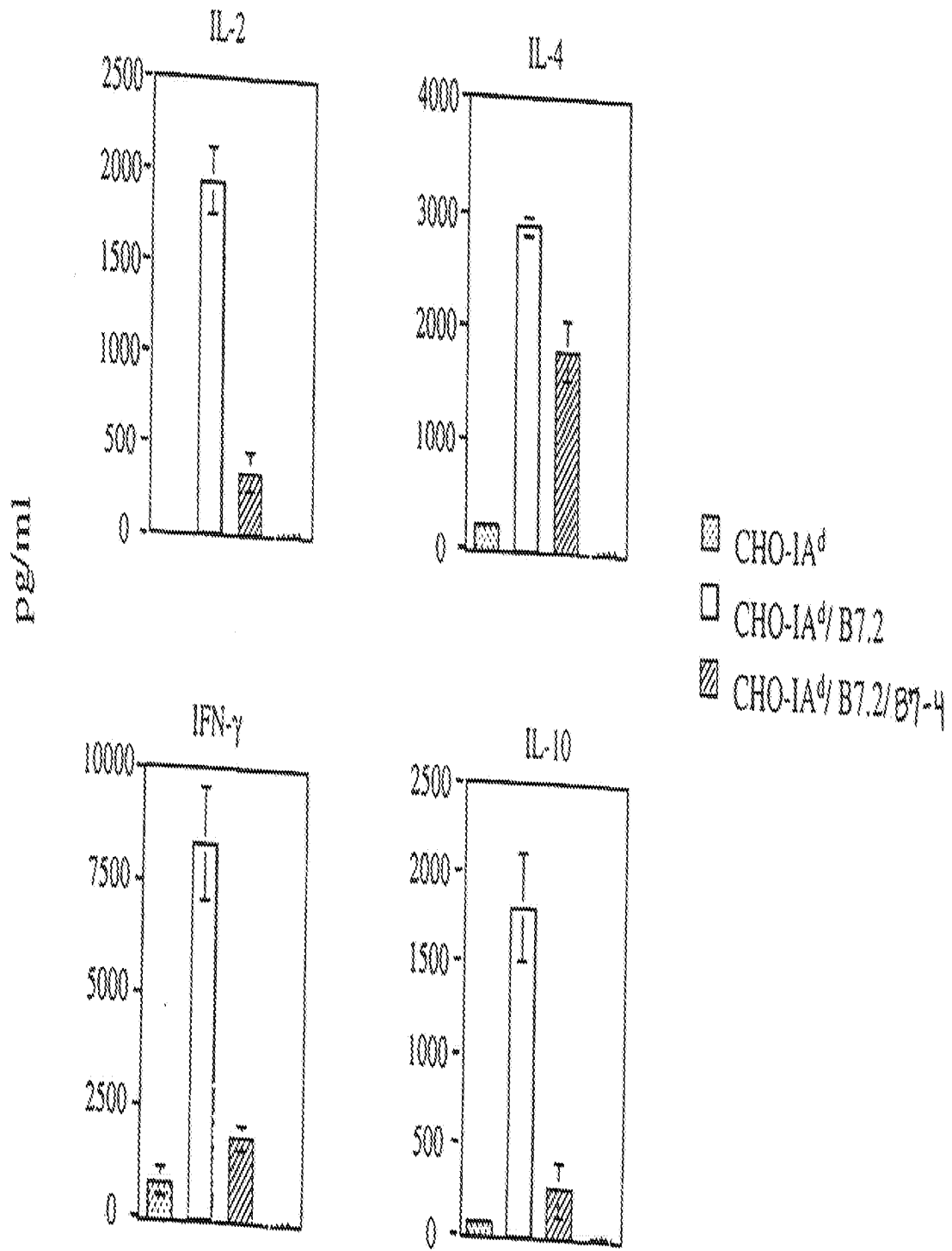


Log fluoreszcencia

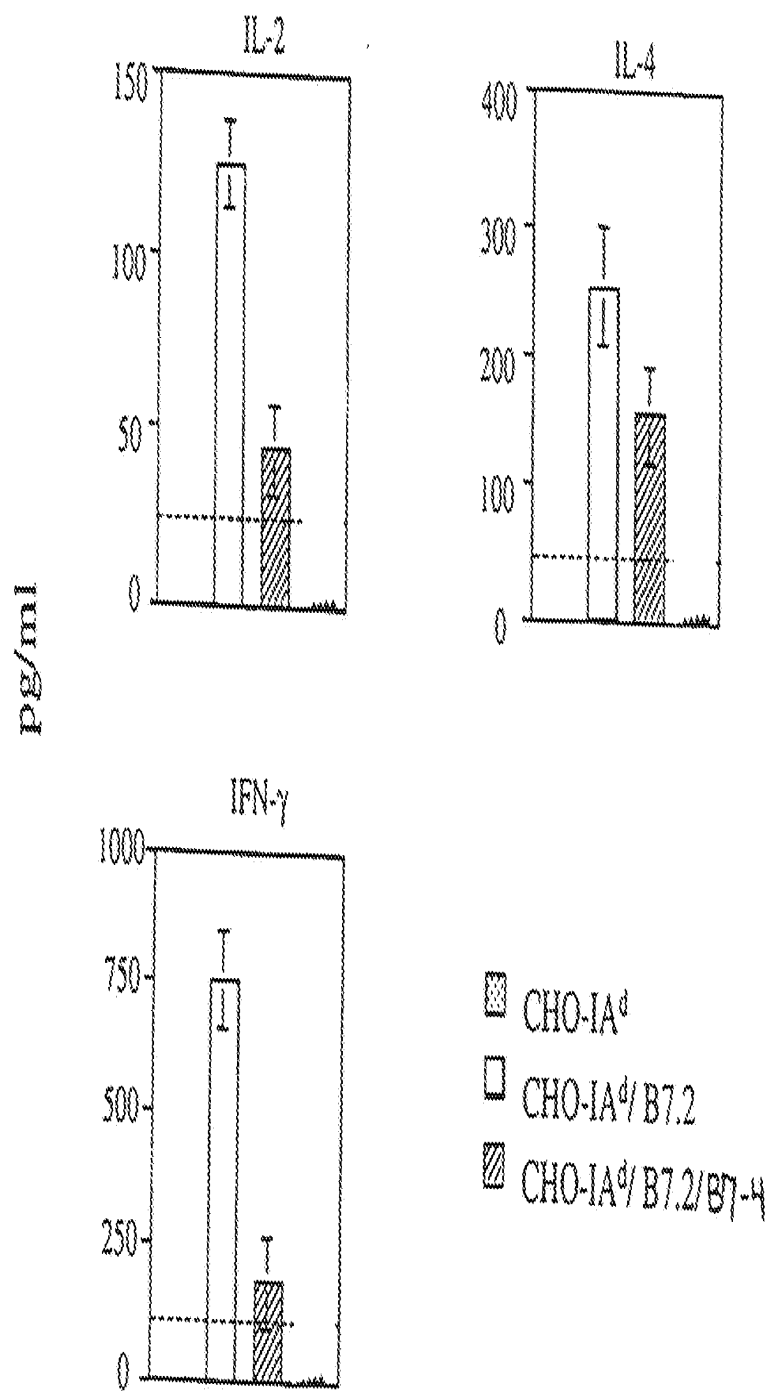
20. ábra



21. ábra

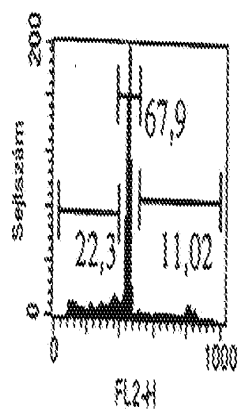


22. ábra

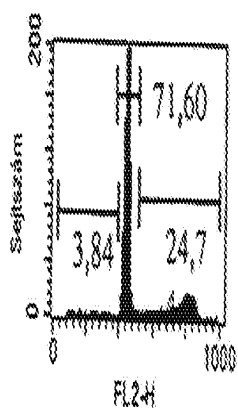
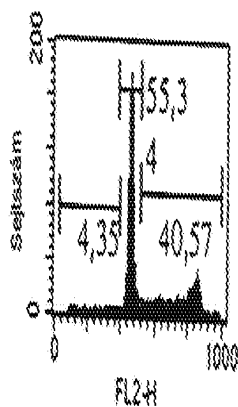


23. ábra

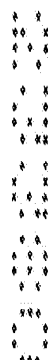
CHO-IA^d



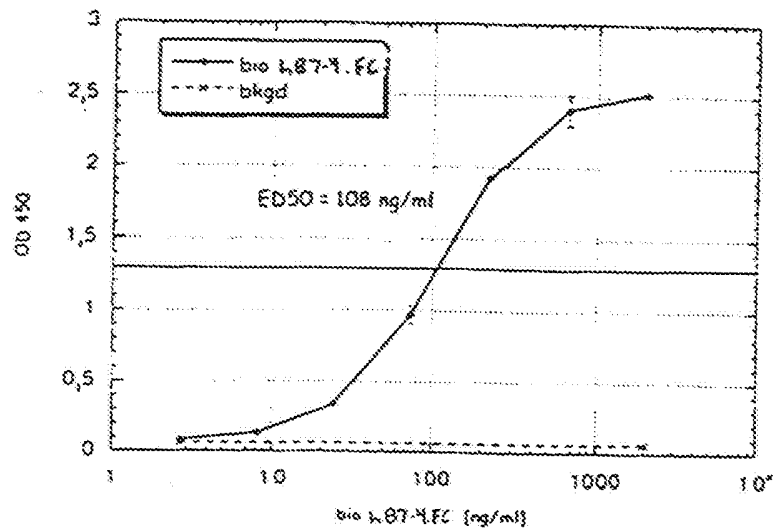
CHO-IA^d/B7.2 CHO-IA^d/B7.2/B7-4



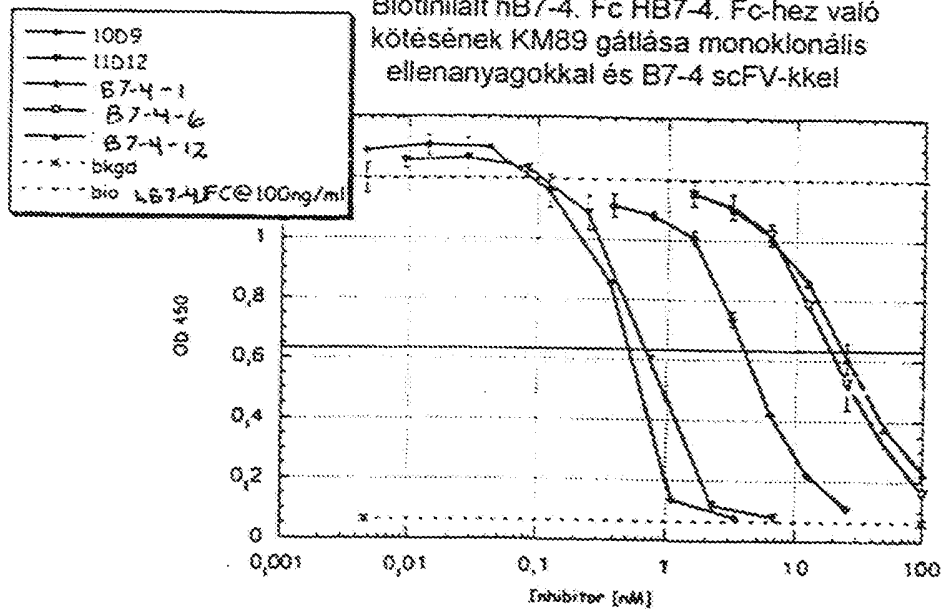
24. ábra



Biotinilált hB7-4 FC (TV2001) KM89
kötési görbéje hPD1.FC-hez



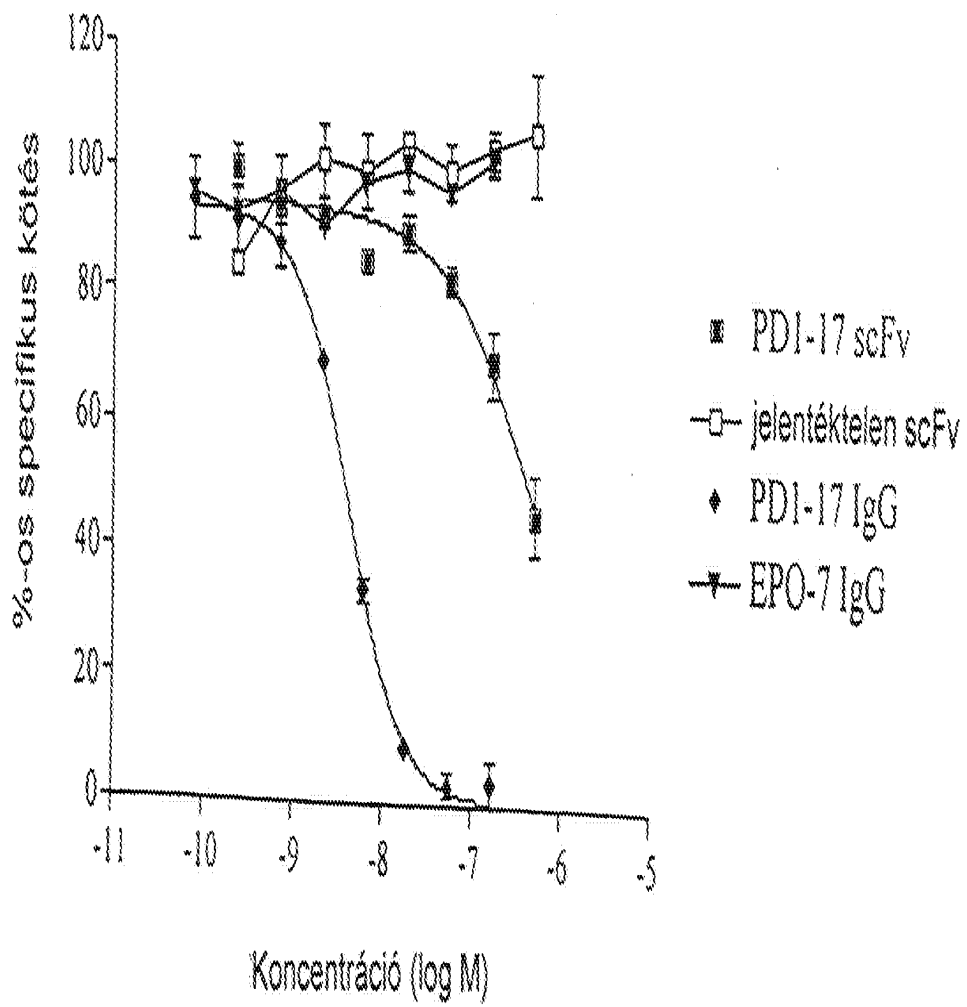
Biotinilált hB7-4. Fc HB7-4. Fc-hez való
kötésének KM89 gátlása monoklonális
ellenanyagokkal és B7-4 scFV-kkel



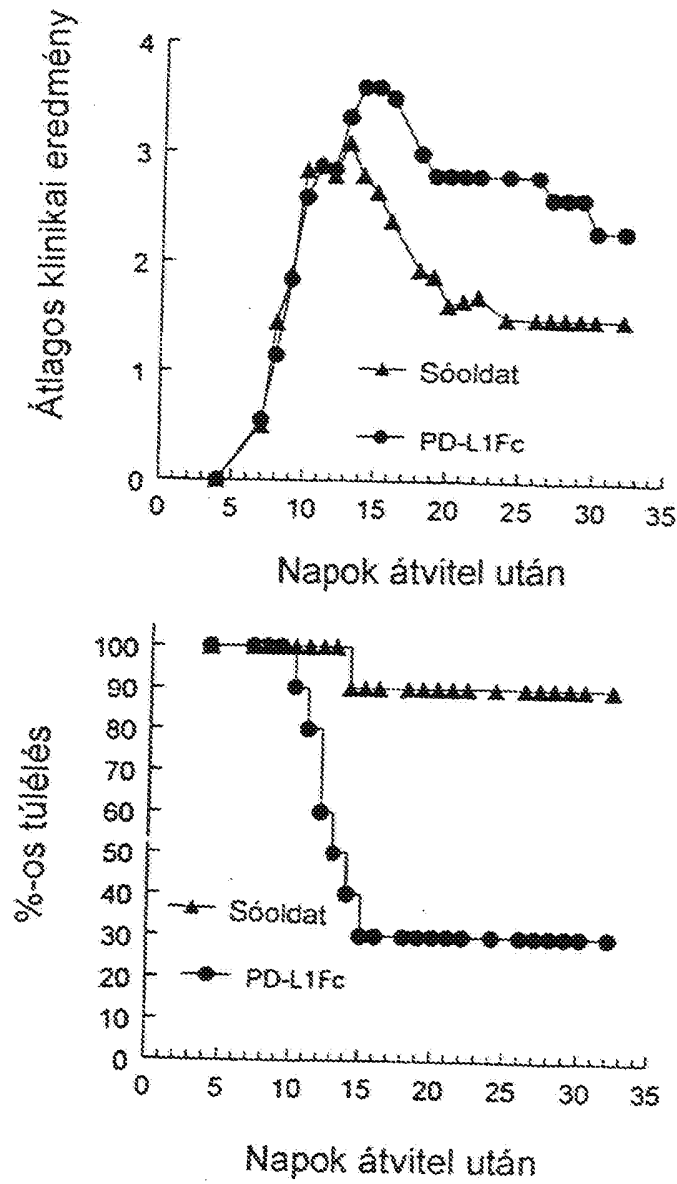
Inhibitor	IC50
10D9	0,5
11D12	0,7
B7-4-1	4
B7-4-6	19
B7-4-12	24

25. ábra

B7-4 kötés gátlása PD1 17-es klónjával



26. ábra



27. ábra