

4 263/89

37013/89

BÜZZÉTÉTELI
FÖLDVÁNY

50.093/BE

A

K I V O N A T

- 53673 -

Uj eljárás az LFA-1 leukocita adhéziós receptor
alfa-alegységének előállítására

Dana Farber Cancer Institute, Boston, Massachusetts,
Amerikai Egyesült Államok

A bejelentés napja: 1989. 08. 22.

Elsőbbségei: 1988. 08. 23. (07/235,227),

1989. 03. 09. (07/321,017)

Amerikai Egyesült Államok

A találmány tárgya eljárás LFA-1 alfa-alegység
előállítására, amely részt vesz azokban a folyamatokban,
amelynek során a sejtek felismerik a gyulladás helyét
és oda vándorolnak, valamint a gyulladás során a sejt
szubsztrátumaihoz kötődnek. A találmány tárgyai az
ilyen molekulák, az ilyen molekulák funkcionális szár-
mazékai, az ilyen molekulák azonosítására alkalmas
screening módszerek, valamint az ilyen molekulák te-
rápiás és diagnosztikai felhasználása.

Földvár

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY A

4263/89

37010/89

S.B.G. & K.
Budapesti Nemzetközi Ügyvédi
és Szabadalmi Iroda
1000 Budapest, Dalmázház u. 10.
Telefon: 153-3733, 131-4200

50.093/BE

-53673-

NR05 C12N15/12
G01N33/53

Uj eljárás az LFA-1 leukocita adhéziós receptor
alfa-alegységének előállítására

Dana Farber Cancer Institute, Boston, Massachusetts,
Amerikai Egyesült Államok

Feltalálók: SPRINGER Timothy Alan, Newton,
LARSON Richard, Boston,

Massachusetts, Amerikai Egyesült Államok

A bejelentés napja: 1989. 08. 22.

Elsőbbségei: 1988. 08. 23. (07/235,227),

1989. 03. 09. (07/321,017)

Amerikai Egyesült Államok

A találmány tárgya eljárás az LFA-1 leukocita
adhéziós receptor előállítására. A találmány tárgya
továbbá ennek a molekulának alfa-alegységét kódoló
DNS szekvenciák klónozása. A találmány részben

állami támogatással készült. A kormány bizonyos jogokkal rendelkezik ebben a találmányban.

Az immunrendszer feladata, hogy egy állatot megvédjen idegen betolakodóktól, úgymint baktériumoktól, vírusoktól, stb. A védekezési rendszer egy kiváló összefoglalóját adja Eisen, H.W. [Microbiology, 3. kiadás, szerk. Harper & Row, Philadelphia, PA, 290-295. és 381-418. oldal (1980)]. Az immun-rendszernek az a képessége, hogy az állati szervezetet idegen betolakodóktól megvédje, nagymértékben a leukocita néven ismert vérsejtek jelenlététől és működésétől függ. A leukocitáknak az a képessége, hogy ilyen védelmet nyújtsanak, attól függ, hogy ezek a sejtek képesek-e celluláris és extracelluláris szubsztrátumokhoz kapcsolódni.

A leukocitáknak például képeseknek kell lenniük arra, hogy az endoteliális sejtekhez kapcsolódjanak, és így a keringésből a lejátszódó gyulladásos folyamat helyére jussanak. Emellett kapcsolódniuk kell az antigén-bemutató sejtekhez, hogy normális immunválasz keletkezzen. Emellett képesnek kell lenniük arra, hogy a megfelelő célsejtekhez kapcsolódjanak, hogy a vírus-fertőzött (vagy rákos) sejtek lizise lejátszódhasson. A leukocitáknak továbbá képesnek kell lenniük arra, hogy különböző aktivált fehérjékben kapcsolódjanak (például az iC3b-hez, amely a komplement harmadik komponensének

aktivált formája), hogy hatékonyan tudjanak fagocitálni és eltávolítani a mikrobiális és eszt-törmelékét. Tehát a leukocita adhézió feltétele a normálisan működő gazdaszervezet védelmi rendszernek. Ennek a védelmi rendszernek a gátlása kívánatos olyan esetekben, mint például a transzplantáció, mivel a befogadó szervezet a transzplantált szövetet idegennek "látja", és immunválaszt kelt az adott szövettel szemben. Tehát a leukocita adhézió a transzplantált szövet és szervek kitaszításában is szerepet játszik. Így a leukocita adhézió képessé lehet arra, hogy megnöveljük egy állati szervezet képességét a fertőzés leküzdésére, vagy hogy elnyomjuk egy állatnak azt a képességét, hogy a transzplantált szövetet kilökje.

Ujabban a leukocita adhézióban résztvevő leukocita felszíni molekulákat hibridóma technológiával azonosították. Röviden, humán T-sejtek elleni monoklonális antitesteket [Davignon, D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 4535-4539 (1981)] és egér lépsejtek elleni monoklonális antitesteket [Springer, T., et al., Eur. J. Immunol, 9, 301-306 (1979)] azonosítottak, amelyek kötődnek a leukocita felszínéhez és gátolták a fent leírt kapcsolódós-kapcsolt funkciókat [Springer T. et. al., Fed. Proc., 44, 2660-2663 (1985)]. Az ezekkel az antitestekkel fel-

ismert molekulák egy leukocita adhéziós receptor készletet képeznek, amelyek az adhéziós receptor molekulák "L₁mfocita funkció-asszociált antigén-1 család" (vagy "LFA-1 család) néven ismertek.

Az adhéziós receptor molekulák LFA-1 családjába három, erős rokonságban lévő sejtfelszíni glikoproteint tartalmaz. Ezekről a glikoproteinekről kiderítették, hogy a gyulladásos folyamatban közvetítik a sejt-sejt kapcsolatokat. A glikoproteinek jelzése "LFA-1" (limfocita funkció-asszociált antigén-1), "Mac-1" és "p 150,95". Míg az LFA-1 a legtöbb leukocita felszínén megtalálható [Springer, T.A. et. al., Immunol. Rev., 68, 111-135 (1982), addig a Mac-1- és a p 150,95 elsődlegesen a makrofágokon, granulocitákon és más nagy granuláris limfocitákon található [Springer, T: A., et al., Immunol. Rev., 68, 111-135 (1982); Keizer, G. et. al., Eur. J. Immunol., 15, 1142-1147 (1985)].

Az LFA-1 glikoprotein család heterodimerekből áll, mindegyik tartalmaz egy alfa-alegységet, amely nem-kovalens kötésben van egy béta alegységgel. A család alfa-alegységeiről úgy találták, hogy különböznek egymástól, jelzésük CD11a, CD11b, és CD11c. A glikozilezett alfa-alegységek hozzávetőleges molekulásúlya 180, 170 illetve 150 kD. Ezzel szemben az adhéziós receptorok LFA-1 családjának béta alegységeit azonosnak találták, molekulásúlyuk

95 kD [Sanchez, Madrid, F. et al., J. Exper. Med. 158, 1785-1803 (1983); Keizer, G.D. et al., Eur. J. Immunol., 15, 1142-1147 (1985); Springer, T. Fed. Proc. 44, 2660-2663 (1985); Sanchez-Madrid, F. et al., J. Exper. Med. 158, 586-602 (1983)]

Jóllehet a glikoproteinek alfa-alegységei nem mutatják a béta-alegységekre jellemző erős homológiát, mégis a glikoproteinek alfa-alegységeinek alapos analizise felfedte, hogy lényeges hasonlóság van közöttük. Az adhéziós molekula glikoprotein család alfa- és béta-alegységei közötti hasonlóság összefoglalását Sanchez-Madrid, F. és munkatársai adják meg [J. Exper. Med., 158, 586-602 (1983); J. Exper. Med., 158 1785-1803 (1983); Miller, L. J. et al., J. Immunol, 138, 2381-2383 (1987)].

A receptorok LFA-1 családjának fontosságát először olyan vizsgálatokban ismerték fel, amelyek kimutatták, a monoklonális antitestek képességét (amelyek képesek akár a specifikus alfa-alegységekhez, vagy az általános béta-alegységhez kapcsolódni) az adhézió-függő leukocita funkciók gátlására [Sanchez-Madrid, F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 7489-7493 (1982); Beller, D. I. et al., J. Exper. Med., 156, 1000-1009 (1982)].

Ujabban az egyéneknek egy olyan csoportját azonosították, amelyek képtelenek az LFA-1 adhéziós

fehérje-család bármely tagja normális mennyiségének expressziójára leukocitáinak sejt-felületén. Ezt a betegséget "Leukocita Adhéziós Deficiencia"-nak, vagy "LAD"-nak nevezték, amelyek krónikus és ismétlődő infekciók, valamint más klinikai szimptómák jellemeznek [Anderson, D.C. et al., Fed. Proc., 44, 2671-2677 (1985); Anderson, D.C. et al., J. Infect. Dis., 152, 668-689 (1985)]. LAD betegekből származó leukociták ugyanazt az in vitro defektust mutatják, mint amik akkor figyelhető meg, ha normál egyedekből származó leukocitákat az LFA-1 család tagjaira specifikus antitestekkel antagonizálják. A LAD betegekről úgy találták, hogy képtelenek normál immunválaszt kifejezni. Erről a problémáról felfedték, hogy ennek oka az, hogy a LAD betegek leukocitái képtelenek celluláris és extracelluláris szubsztrátumokhoz való tapadásra (Anderson, D. C. et al., Fed. Proc., 44, 2675-2677 (1985); Anderson, D.C. et al., J. Infect. Dis., 152, 668-689 (1985)]. Ezek a vizsgálatok azt mutatják, hogy a gyulladásos reakciók gátoltak, ha a leukociták nem képesek normál módon tapadni, mivel a funkcionális adhéziós molekulák hiányoznak sejtjeik felületéről.

Összefoglalva az állati szervezet egészségének és életképességének fenntartásához a leukocitáknak arra van szükségük, hogy képesek legyenek más sejtekhez (például endoteliális sejtekhez) és fehérjékhez (pél-

dául az iC3b-hoz) való tapadásra. Ehhez a tapadáshoz kontaktusra van szükség, ami a leukociták felszínén jelenlévő specifikus receptor molekuláktól függ. Ezeket a sejt-felszíni receptor molekulákat egymáshoz nagyon hasonlóknak találták. Azok a betegek, akiknek a leukocitáiról hiányoznak ezek a sejt-felszíni molekulák, krónikus és ismétlődő fertőzéseket és más klinikai szimptomákat mutatnak.

Mivel leukocita adhézió vesz részt abban a folyamatban is, amely során az idegen szövetet azonosítják és kivasztják, ennek az eljárásnak a megértése lényeges jelentőségű a szervátültetésben, szövet-átültetésben, allergiában, onkológiában.

A találmány tárgyai leukocita sejt-felszíni adhéziós receptor molekulák, főleg az LFA-1 receptor molekula alfa-alegységének, klónozása és expressziója, rekombináns DNS-technológia alkalmazásával. A találmány magában foglalja az adhéziós molekulát magát a molekula funkcionális fragmentjeit, az ezeket a receptor molekulákat kódoló nukleinsavakat (azaz DNS, főleg cDNS), és az ilyen nukleinsavat tartalmazó plazmidokat. A jelen találmány magában foglalja még a receptor molekulák előállítását, amelyben rekombináns DNS technológia használható.

Részleteiben, a találmány tárgya az LFA-1 alfa alegység, vagy ennek funkcionális származéka, lényeg-

gében természetes szennyezések nélkül.

A találmány tárgya továbbá az említett LFA-1 alfa-alegység vagy annak funkcionális származéka, amely képes a sejt felszínén lévő molekulához kapcsolódni. (Ugymint ICAM-1 vagy LFA-1 béta-alegység).

A találmány tárgya továbbá az említett LFA-1 alfa alegység azzal jellemezve, hogy az alábbi csoportból legalább egy polipeptidet tartalmaz:

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

A találmány tárgya továbbá az akár az LFA-1 alfa-alegységet, akár funkcionális származékát expre-szálni képes rekombináns DNS molekula.

A találmány tárgya továbbá eljárás LFA-1 alfa-alegység tiszta formában való kinyerésére, ami a következő lépésekből áll:

- a) az LFA-1 alfa-alegységet expresszáló sejtek membránjából szolubizáljuk az LFA-1 alfa-alegységet, hogy oldatban lévő LFA-1 alfa-alegység preparátumot kapjunk,
- b) a szolubizált LFA-1 alfa-alegység preparátumot affinitás hordozóra visszük, ahol a hordozó LFA-1 alfa-alegység megkötésére képes, immobilizált antitestet tartalmaz,
- c) lehetővé tesszük, hogy az LFA-1 alfa-alegység az affinitás-hordozón lévő antitesthez kötődjön,
- d) a hordozóról eltávolítunk minden, az antitestet megkötni nem képes anyagot,
- e) az LFA-1 alfa-alegységet tiszta formában kinyerjük, az LFA-1 alfa-alegységet leoldva a hordozóról.

A találmány tárgya még eljárás a nem-specifikus védelmi rendszer válaszából származó gyulladás kezelésére (például késleltetett típusú túlérzékenység, graft versus host betegség, átültetett szövet kilökődése, átültetett szerv kilökődése, autoimmun betegségek, úgymint

lupus erythematosus, autoimmun tiroiditisz, kísérletes allergiás encefalomyelitisz (EAE), szklerózis multiplex, a cukorbetegség néhány formája, a Reynaud szindróma, reumatoid artritisz, stb.) emlősben, azzal jellemezve, hogy az ilyen kezelést igénylő betegnek gyulladáscsökkentő anyagot adunk, olyan mennyiségben, hogy az elegendő legyen az említett gyulladásos csökkentésére, és az említett gyulladáscsökkentő anyagot a következők közül választjuk: LFA-1 alfa-alegység; és az LFA-1 alfa-alegységnek egy funkcionális származéka.

A találmány része még a fenti módszer, ami a továbbiakban magában foglalja egy, a következők közül választott hatóanyag adagolását: LFA-1 béta-alegység és a LFA-1 béta-alegység funkcionális származéka.

A találmány vonatkozik továbbá a hematopoietikus daganatsejtek, azaz azok a sejtek, amelyeknek a vándorláshoz az LFA-1 család funkcionális tagjára van szükségük, metasztázisának gátlását szolgáló eljárásra, ami abban áll, hogy az ilyen kezelésre szoruló betegnek a metasztázis elnyomására alkalmas mennyiségű gyulladáscsökkentő anyagot adunk, és a gyulladáscsökkentő anyagot a következő csoportból választjuk: LFA-1 alfa-alegység, és az LFA-1 alfa-alegység funkcionális származéka.

A találmány vonatkozik továbbá az LFA-1 alfa-alegységet expresszázó daganatsejtek növekedésének gátlását célzó eljárásra, ami abban áll, hogy az ilyen kezelésre szoruló betegnek a növekedése gátlására elegendő mennyiségű toxint adunk, és a toxint a következő csoportból választjuk: az LFA-1 alfa-alegység toxinszármazéka vagy az LFA-1 alfa-alegység egyik tagja funkcionális származékának toxin-származéka.

(a) a betegnek kimutathatóan jelzett FLA-1 alfa-alegységet tartalmazó készítményt adunk, amely képes az ICAM-1-et vagy az LFA-1 más természetes ligandját expresszázó sejtek azonosítására, és

(b) kimutatjuk az LFA-1 alfa-alegységet.

A találmány vonatkozik továbbá olyan gyulladási folyamat kimutatásának és lokalizálásának diagnózisára alkalmas eljárásra, amely egy feltételezhetően gyulladási emlősben a specifikus védelmi rendszer válaszából ered, azzal jellemezve, hogy

(a) a beteg egy szövetmintáját az ICAM-1-et vagy az LFA-1 más természetes ligandumát expresszázó sejt azonosítására képes, kimutathatóan jelzett LFA-1 alfa-alegységet tartalmazó készítménnyel inkubáljuk, és

(b) kimutatjuk, az LFA-1 alfa-alegységet.

A találmány vonatkozik továbbé olyan gyulladásoo folyamat kimutatásának és lokalizálásának diagnózióára alkalmas eljárásra, amely egy feltételezhetően gyulladásoo emlősoben a specifikus védelmi rendszer válaszából ered, azzal jellemezve, hogy:

(a) a beteg egy szövetmintáját olyan nukleinsavat tartalmazó készitménnyel inkubáljuk, amely képes az LFA-1 alfa-alegység DNS-szekvenciájához és az LFA-1 alfa-alegység egy génjének mRNS szekvenciájához kötődni, és a kötődés alapján képes az ICAM-1-et vagy az LFA-1 más természetes ligandumát expresszó sejt azonosítására.

A találmány vonatkozik továbbé olyan gyulladásoo folyamat kimutatásának és lokalizálásának diagnózióára alkalmas eljárásra, amely egy feltételezhetően gyulladásoo emlősoben a specifikus védelmi rendszer válaszából ered, azzal jellemezve, hogy:

(a) a beteg egy szövetmintáját az ICAM-1-et vagy az LFA-1 más természetes ligandumát expresszó sejt azonosítására képes, kimutathatóan jelzett LFA-1 alfa-alegységet tartalmazó készitménnyel inkubáljuk, és

- (b) kimutatjuk az LFA-1 alfa-alegységet.

A találmány vonatkozik továbbá az ICAM-1-et vagy az LFA-1 más természetes ligandumát expresszázó daganatsejtek jelenlétének és helyének diagnosztizálására alkalmas eljárásra olyan betegben aki feltételezhetően ilyen sejtekkel rendelkezik, azzal jellemezve, hogy:

- (a) a betegnek olyan készítményt adunk be, amely az ICAM-1-hez vagy az LFA-1 más természetes ligandumához kapcsolódni képes kimutathatóan jelölt ligandumot tartalmaz, a ligandum lehet az LFA-1 alfa-alegysége vagy az LFA-1 alfa-alegységének funkcionális származéka, és

- (b) kimutatjuk a kötődő ligandumot.

A találmány vonatkozik továbbá az ICAM-1-et vagy az LFA-1 más természetes ligandumát expresszázó daganatsejtek jelenlétének és helyének diagnosztizálására alkalmas eljárásra, olyan betegben aki feltételezhetően ilyen sejtekkel rendelkezik, azzal jellemezve, hogy:

- (a) a beteg szövetmintáját olyan készítménnyel inkubáljuk, amely az ICAM-1-hez vagy az LFA-1 más természetes ligandumához kapcsolódni képes kimutathatóan jelölt ligandumot tartalmaz, a ligandum

lehet az LFA-1 alfa-alegysége vagy az származéka, és .

- (b) kimutatjuk a kötődő ligandumot, amely a szövetmintában lévő ICAM-1-hez kapcsolódva található.

Az ábrák rövid leírása

Az 1. ábra mutatja az LFA-1 alfa-alegység triptikus peptidjeinek fordított fázisu HPLC-s elválasztását. Az eluálást 280 nm-en (alsó profil) és 214 nm-en (felső profil) mért optikai denzitással követjük. A ponttal jelzett peptideket fehérje mikroszekvenálásnak vetettük alá. A profilon keresztül húzódó vonal az acetonitril százalékát mutatja.

A 2. ábra az LFA-1 alfa-alegység cDNS klónok restrikciós térképét mutatja, a restrikciós helyek jelzése: BalI (Bl), BamHI (B), BglII(Bg), ClaI (C), EcoRI (R) HincII (H). NruI (N), PstI (P), ScaI (Sc) és SmaI (S). A nyilak a szekvenálási stratégiát mutatják.

A 3. ábra az LFA-1 alfa-alegység nukleotid-szekvenciáját és az ebből származtatott aminosav szekvenciáját mutatja. A triptikus peptidek és a transzmembrán régió szekvenciáját vastag illetve árnyékolt vonallal húztuk alá. A feltételezett szerinfoszforilezési helyek be

be vannak keretezve. A 3'-nem transzlálódó régióban lévő aláhuzott nukleotidok egy Alu szekvenciának felelnek meg.

A 4. ábrán az LFA-1 alfa-alegység belső ismétlődő szakaszainak illesztését látjuk. Az illesztett ismétlődések felett a konszenzus kísérő szekvenciákat látjuk, míg a konszenzus kétértékű kation-kötő helyet és az előzőleg leírt kötő-helyeket alul mutatjuk. Csillag jelzi, hogy egy-nél több oxigén vesz részt a kation-kötésben.

Az 5. ábrán a humán LFA-1 alfa-alegységnek az integrin szupergén-család más tagjaival valamint a rágcsáló LFA-1 alfa-alegységével való illeszkedését látjuk. Az LFA-1 -ben és legalább egy integrinben azonos csoportok be vannak keretezve. A leukocita inszert területe figyelemre méltó. A kétértékű kationkötő helyeket tartalmazó homológ ismétlődéseket háromszögek jelzik. Az ECM receptor alfa-alegységében lévő proteáz hasítási helyeket nyilak jelzik. A transzmembrán régió alá van huzva.

A 6. ábrán az LFA-1 alfa-alegység L doménjének a von Willebrand faktorban lévő homológ doménnel való illeszkedését és összehasonlítását látjuk.

A 7. ábrán az L doménnel homológ domének evolúciós kapcsolatának, szematikus ábrázolását látjuk.

Az előnyös megvalósítási módok leírása

I. Az LFA-1 családba tartozó leukocita adhéziós fehérjék természete

A három leukocita adhéziós fehérje, a Mac-1 p150,95 és LFA-1 különböznek egymástól funkciójukban és a leukocita szubpopulációkban való expressziójukban. A Mac-1 és p150,95 fehérjék neutrofilekben és monocitákban expresszálódnak [Springer, T.A. et al., Biochemistry of Macrophages (CIBA Symposium 118); Pitman, London, 102-126. old. (1986)]. A vér monociták szöveti makrofágokká való differenciálódása során a p150,95 expressziója nagymértékben megnő a Mac-1 expressziója pedig lecsökken. [Schwartz, R. et al., Blood, 65, 974-983 (1985); Hogg, N. et al., Eur. J. Immunol., 16, 240-248 (1986)]. A p150,90 bizonyos típusú aktivált T és B limfocitákban is expresszálódik, de nem expresszálódik ezekben a sejtekben, ha a sejtek a vérben vannak [Kaligaris-Cappio, F. et al., Blood, 66, 1035-1042 (1985); Miller, L. J. et al., J. Immunol, 137, 2891-2900 (1986); Keizer, G.D. et al., J. Immunol, 138, 3130-3136 (1987)].

A Mac-1-et és a p150,95-et keringő neutrofilek és monociták intracelluláris vezikuláris kompartmentjei

expresszálják, a sejt felszínére gyulladási folyamatban résztvévő mediátorok mobilizálják (Todd, R.F. et al., J. Clin. Invest, 74, 1280-1290 (1984); Springer, T. A. et al., In. Biochemistry of Macrophages (CIBA Symposium 118), Pitman, London, 102-106. old. (1986); Lanier, L.L. et al., Eur. J. Immunol., 15, 713-718 (1985); Yancey, K.B. et al., J. Immunol, 135, 465-470 (1985)]. Ez a mobilizáció korrelál a megnövekedett tapadóképeséggel [Anderson, D.C., et al., Ann. Rev. Med. 38, 175-194 (1987)].

A Mac-1 vagy p150,95 elleni monoklonális antitestek gátolják a neutrofil aggregációt és az endoteliális sejtekhez való tapadást, valamint a fehérje-borított felületekhez, baktériumokhoz, protozoa parazitákhoz és gombákhoz tapadást [Harlan, J. M. et al., Blood 66, 167-178 (1985); Springer, T. A. et al., In Biochemistry of Macrophages (CIBA Symposium 118), Pitman, London, 102-106. old. (1986); Dana, N. et al., J. Immunol., 137, 3259 (1986); Bullock, W.D. et al., J. Exper. Med., 165, 195-210 (1987); Mosser, D. M. et al., J. Immunol., 135, 2785-2789 (1985)].

A Mac-1 az iC3b komplement komponensnek is receptora [Beller, D.I. et al., J. Exper. Med., 156, 1000-1009 (1982)]. A detergensben oldott Mac-1-ről és p150,95-ről kimutatták, hogy képesek az iC3b Sepharose-hez kötődni [Micklem, K. J. et al., Biochem. J. 231, 233-236 (1985)].

Az LFA-1 minden leukocitán megtalálható, kivéve a makrofágok egy alcsoportját. Monoklonális antitesttel végzett blokkolási vizsgálatok kimutatták, hogy az LFA-1 fontos a T-limfocitákat magába foglaló pusztításban, a T segítő limfocita válaszokban a természetes pusztításban és az antitest függő pusztításban [Springer, T.A. et al., Ann. Rev. Immunol., 5, 223-252 (1987)]. A célsejtekhez való tapadás egy olyan lépés, amelyet az LFA-1 ellenes antitestek gátolnak. A funkcionális vizsgálatok azt sugallják, hogy az LFA-1 számos ligandummal kölcsönhatásba lép, amelyek közül az egyik az ICAM-1 [Rothlein, R. et al., J. Immunol. 137, 1270-1274 (1986)].

Néhány citotoxikus T limfocita klónról azt találták, hogy hasonló mennyiségben expresszál p150,95-öt és LFA-1-et. Az LFA-1 és p150,95 alfa-alegységek elleni monoklonális antitestek hasonló mértékben gátolják az ilyen CTL klónok pusztító hatását és gátló hatásukban additívak [Leizer, G.D. et al., J. Immunol., 138, 3130-3136 (1987)]. Továbbá, a p150,95 alfa-alegységek elleni antitestekről kimutatták, hogy gátolják a monociták endotéliumhoz való tapadását [Keizer, G.D. et al., Eur. J. Immunol., 17, 1317-1322 (1987)].

II. Az LFA-1 alfa-alegység klónozása

A különböző módszerek közül bármelyiket használhatjuk az LFA-1 alfa-alegység klónozására. Az egyik ilyen módszer szerint a cDNS inszerteket (amelyek LFA-1 alfa-alegységet expresszáló sejtből származnak) tartalmazó ingázó-vektor génkönyvtárat vizsgálunk át. Ezt a vizsgálatot úgy hajtjuk végre, hogy sejteket transzfektálunk a vektorral, majd vizsgáljuk az LFA-1 alfa-alegység expressziót.

Az LFA-1 alfa-alegység klónozásának egy előnyös módszere során meg kell határozni az LFA-1 alfa-alegység molekulának, vagy a molekula egy triptikus peptidjének aminosav sorrendjét. A feladat végrehajtásához előnyösen az LFA-1 alfa-alegység molekulákat a termelő sejtekből tisztítjuk, monoklonális antitest affinitás-kromatográfiával, majd preparatív nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézissel ("SDS-PAGE") és elektroelúcióval izoláljuk [Miller, L. J. et al., *J. Immunol.*, 138, 2381-2383 (1987)]. Az alfa-alegység molekulákat brómciánnal, vagy proteázokkal, úgymint papainnal, kimotropszinnel vagy tripszinnel fragmentáljuk [Oike, Y., et al., *J. Biol. Chem.*, 257, 9751-9758 (1982); Liu, C. et al., *Int. J. Pept. Protein Res.*, 21, 209-215 (1983)].

Az alfa-alegységet előnyösen proteolitikusan, tripszinnel emésztjük. A kapott peptideket fordított fázisu HPLC-vel szétválasztjuk és aminosav sorrendjüket meghatározzuk. Ennek a munkának a végrehajtásához a fehérjét előnyösen automatizált szekvenátorral analizáljuk. Habár lehetséges a LFA-1 alfa-alegység teljes aminosav-szekvenciájának meghatározása, előnyös, ha a molekula peptid-fragmentjeinek szekvenciáját határozzuk meg. Az LFA-1 alfa-alegység egy előnyös előállítási forrása az SKW3 sejtvonal.

Egy peptid aminosav-szekvenciáját a továbbiakban az általánosan használt hárombetűs jelzésűkkel írjuk le, vagy az egybetűs jelzésűkkel. Ezeknek a hárombetűs és egybetűs jelzéseknek a listáját kézikönyvekben megtalálhatjuk [pl. Biochemistry, Lehninger, A., Orth Publishers, New York, N.Y. (1970)]. Ha egy szekvenciát vertikálisan listáznak ki, akkor az amino-terminálisnak a lista tetején kell lenni, a karboxi-terminálisnak pedig a lista alján. Hasonlóan, ha horizontálisan listáznak, akkor az amino-terminálisnak a baloldali végen kell lennie, míg a karboxi-terminálisnak a jobboldali végen.

Az aminosavakat -egy peptidben kötőjelekkel lehet elválasztani. Ezeknek a kötőjeleknek kizárólag az a céljuk, hogy megkönnyítsék egy szekvencia bemutatását. Teljesen illusztratív példaként a következő aminosav

szekvencia:

~~-Gly-Ala-Ser-Phe-~~

azt jelzi, hogy a Gly karboxi-csoportjához egy Ala csoport kapcsolódik és egy Ser csoport kapcsolódik az Ala csoport karboxi-csoportjához és a Phe csoport amino-csoportjához. A jelölés mutatja továbbá, hogy az aminosav-szekvencia a Gly-Ala-Ser-Phe tetrapeptidet tartalmazza. A jelölésnek nem célja, hogy az aminosav-szekvenciát erre a tetrapeptidre korlátozza, de szándék szerint magába foglalja

- 1) a tetrapeptidet, amelynek amino vagy karboxi végéhez egy vagy több aminosav kapcsolódik
- 2) a tetrapeptidet, amelynek mind az amino, mind a karboxi végéhez egy vagy több aminosav kapcsolódik,
- 3) a tetrapeptidet, amely nem tartalmaz további aminosavakat.

Ha egy vagy több megfelelő peptid fragment szekvenciáját meghatároztuk, megvizsgáljuk az ezek kódolására képes DNS szekvenciákat. Mivel a genetikai kód degenerált, egynél több kodont használhatunk egy bizonyos aminosav kódolására [Watson, J. D., In. Molecular Biology of the Gene 3rd. Ed. W.A. Benjamin, Inc. Menlo Park, CA, 356-357. oldal (1977)]. Analizáljuk a

peptid-fragmenteket hogy meghatározzuk azokat az aminosav szekvenciákat, amelyeket a legkisebb degenerációs fokkal rendelkező oligonukleotidok határoznak meg. Ezt előnyösen úgy hajtjuk végre, hogy olyan szekvenciákat azonosítunk, amelyek csak egyetlen kodon által kódolt aminosavakat tartalmaznak.

Jóllehet néha egy aminosav szekvenciát egyetlen oligonukleotid határoz meg, gyakran az aminosav szekvenciát sok hasonló oligonukleotid közül bármelyik meghatározhatja. Fontos, hogy jóllehet a csoport mindegyik tagja kódolja a kiválasztott peptid-fragmentet, és így potenciálisan ugyanazt az oligonukleotid szekvenciát tartalmazza mint a peptid-fragmentet kódoló gén, a csoportnak csak egyetlen tagja tartalmazza a gén nukleotid szekvenciájával azonos nukleotid szekvenciát. Mivel ez a tag jelen van a csoportban és képes a DNS-hez hibridizálódni a csoport többi tagjának jelenlétében is, ezért lehetséges az oligonukleotidokat szétválasztás nélkül, ugyanugy használni, mintha egyetlen oligonukleotidot használnánk, a peptidet kódoló gén klónozására.

Egy megfelelő oligonukleotidot vagy oligonukleotid csoportot, amely képes az LFA-1 alfa-alegység fragmentjét kódolni (vagy egy ilyen oligonukleotiddal vagy oligonukleotid csoporttal komplementer) azonosítunk (a fent leírt eljárást alkalmazva), megszintetizálunk és a

szakterületen ismert módon DNS-hez, vagy előnyösebben az LFA-1 alfa-alegység génjének expressziójára képes humán sejtéből származó cDNS-hez hibridizálunk. A nukleinsavak hibridizálását több szakkönyvben is leírják [Maniatis, T. et al., In: Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY (1982); és Haymes, B.D. et al., In: Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach, IRL Press, Washington, DC (1985)], amelyekre a továbbiakban hivatkozni fogunk. A használt DNS vagy cDNS forrást előnyösen feldusítjuk LFA-1 alfa-alegység szekvenciára nézve. Az ilyen dusítást legkönnyebben úgy végezhetjük, hogy olyan cDNS-t használunk, amelyet LFA-1 alfa-alegységet nagy mennyiségben termelő sejtéből izolált RNS-ből állítunk elő.

A leírt, vagy azokhoz hasonló technikákkal sikeresen klónozták a humán aldehid-dehidrogenáz gént [Hsu, L.C., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 3771-3775 (1985)], a fibronektint [Suzuki S. et al., Eur. Mol. Biol. Organ. J., 4, 2519-2524 (1985)], a humán ösztrogén receptor gént [Walter, P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 7889-7893 (1985)], a szöveti plazminogén aktivátort [Pennica D. et al., Nature, 301, 214-221 (1983)] és a humán placenta alkalikus foszfatáz cDNS-t [Kam, W. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 8715-8719 (1985)].

A genetikai kódot használva [Watson, J. D., In.: Molecular Biology of the Gene, 3rd. Ed., W.A. Benjamin, Inc., Menlo Park, CA (1977)] egy vagy több különböző oligonukleotid^{ot} lehet azonosítani, amelyek közül bármelyik képes az LFA-1 alfa-alegység triptikus peptidjét kódolni. Annak valószínűségét, hogy egy adott oligonukleotid valóban azonos az aktuális LFA-1 alfa-alegységet kódoló szekvenciával, azon az alapon becsülhetjük meg, hogy figyelembe vesszük az abnormális bázispárosodási kapcsolatokat és azt a frekvenciát, amellyel egy adott kodon egy eukarióta sejtben az adott aminosav kódolására felhasználdik. Ilyen "kodon-hasznosítási szabályokat" Lathe R. és munkatársai írnak le [J. Molec. Biol., 183, 1-12 (1985)]. A Lathe-féle "kodon-hasznosítási szabályokat" használva egyetlen oligonukleotidot, vagy egy oligonukleotid csoportot azonosítunk, amely az elméletileg "legvalószínűbb", az LFA-1 alfa-alegység^u triptikus peptid szekvencia kódolására képes nukleotid szekvenciát tartalmazza.

Az elméletileg "legvalószínűbb" oligonukleotidot tartalmazó oligonukleotid csoportot vagy oligonukleotidot, amely képes az LFA-1 alfa-alegység fragmentek kódolására, használjuk egy olyan komplementer oligonukleotid vagy oligonukleotid csoport azonosítására, amely képes a "legvalószínűbb" szekvenciával vagy szekvencia-csoporttal hibri-

zálni. Egy ilyen komplementer szekvenciát-tartalmazó oligonukleotidot használhatunk próbaként az LFA-1 alfa-alegység gén azonosítására és izolálására [Maniatis, T. et al., Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (1982)].

Igy, összegezve, az LFA-1 alfa-alegység peptid szekvenciának aktuális azonosítása lehetővé teszi az olyan elméletileg, "legvalószínűbb" DNS szekvencia vagy szekvencia-csoport azonosítását, amely ilyen peptidet képes kódolni. Az ezzel az elméleti szekvenciával komplementer oligonukleotid előállításával (vagy egy olyan oligonukleotid-csoport előállításával, amely komplementer a "legvalószínűbb" oligonukleotid csoporttal), olyan DNS molekulát (vagy DNS molekulák csoportját) kapunk, amely képes próbaként működni az LFA-1 alfa-alegység gén azonosításában és izolálásában.

A "legvalószínűbb" LFA-1 alfa-alegység triptikus peptidet kódoló szekvenciákkal komplementer egyszáru oligonukleotid molekulákat az átlagos szakértelemmel rendelkező szakember számára ismert eljárásokkal szintetizáljuk [Belagaje, R. et al., J. Biol. Chem., 254, 5765-5780 (1979); Maniatis, T. et al., In: Molecular Mechanismus in the Control of Gene Expression, Nierlich, D. P. et al., Eds. Acad. Press, NY (1976); Wu, R. et al., Prog. Nucl. Acid Res. Molec. Biol., 21, 101-141 (1978), Khorana, R. G.,

Science, 203, 614-625 (1979)1. A DNS szintézist e-
mellett még automatizált szintetizátorral is végezhetjük.

Az LFA-1 alfa-alegység génjét olyan eukarióta
DNS preparátumokból állíthatjuk elő, amelyekről felté-
telezzük, hogy tartalmazzák ezt a gént.

Az LFA-1 alfa-alegység fehérjét kódoló gén
azonosítása és klónozása céljából egy DNS vagy cDNS klón-
tárat vizsgálunk át abból a szempontból, hogy képes-e a
fent leírt oligonukleotid próbákkal hibridizálni. Megfe-
lelő DNS preparátumokat (például humán genomiális DNS)
enzimatikusan emésztünk vagy random módon tördelünk és re-
kombináns vektorokba ligálunk. Ezután azt vizsgáljuk, hogy
ezek a rekombináns vektorok mennyire képesek a fent leírt
oligonukleotid vektorokkal hibridizálódni. A hibridizálási
eljárások leírását megtaláljuk például a következő szak-
könyvekben: [Maniatis T. et al., Molecular Cloning, A La-
boratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring
Harbor, NY. (1982), vagy Haymes, B.T. et al., Nucleic Acid
Hybridization a Practical Approach, IRL Press Oxford, Eng-
land (1985)1. Az ilyen hibridizációra képes vektorokat vizs-
gáljuk tovább, hogy meghatározzuk a bennünk lévő LFA-1 alfa-
alegység szekvenciák méretét és természetét. Statiszti-
kai megfontolások alapján egy olyan gént, mint amely pél-
dával az LFA-1 alfa-alegység molekulát kódolja, egyértelműen

azonosítani kell (hibridizációs screeninggel) egy csak 18 nukleotidot tartalmazó oligonukleotid próbával.

A klónozott Mac-1 alfa-alegység gént, amelyet a fenti módszerrel kaphatunk meg, működőképesen egy expressziós vektorhoz kapcsoljuk, majd egy prokarióta vagy eukarióta sejtbe juttatjuk be a Mac-1 alfa-alegység fehérje előállítására. Az ilyen manipulációk technikáját a Maniatis féle kézikönyvben találjuk meg leírva, és jól ismertek a szakterületen.

III. AZ LFA-1 alfa-alegység expresszállása

A jelen találmány eredete, legalábbis részben, a LFA-1 molekula alfa-alegységét kódoló cDNS szekvencia felfedezése. Ezt a szekvenciát, vagy ennek a szekvenciának egy fragmentjét egy funkcionális promoterhez kapcsolva, lehetséges a Mac-1 alfa-alegységének (vagy ennek egy funkcionális származékának) expresszióját létrehozni egy sejtben vagy egy szervezetben.

Egy nukleinsav molekuláról, például DNS-ről akkor mondják, hogy "képes expresszálni" egy fehérjét, ha olyan nukleotid szekvenciákat tartalmaz, amelyek transzkripció és transzláció szabályozási információkkal rendelkeznek, és ezeket működőképesen polipeptidet kódoló nukleotid szekvenciákhoz kapcsoljuk. A működőképes kapcsolat olyan kapcsolat, amelyben a sza-

bályozó DNS szekvenciák és az expresszálni kívánt szekvenciák a gén expresszióját lehetővé tevő kapcsolatban vannak. A gén expressziójához szükséges szabályozó régiók pontos természete szervezetről szervezetre változhat, de általában tartalmaz egy promoter régiót, amely a prokarióták esetében tartalmazza mind a promotert (amely az RNS transzkripciójának iniciációját irányítja), mind azokat a DNS szekvenciákat, amelyek RNS-sé átírva jelzik a fehérje-szintézis kezdetét. Az eukarióta sejtekben lévő szabályozó szakaszok általában az RNS-szintézis iniciációjához elegendő promoter régiót tartalmaznak.

Két DNS szekvenciáról (azaz egy promoter régió szekvencia és egy LFA-1 alfa-alegység-kódoló szekvencia) akkor mondják, hogy működésileg össze vannak kapcsolva, ha a két DNS szekvencia közötti kapcsolat természete olyan, hogy

- 1) nem eredményez frame-shift mutációt,
- 2) nem gátolja a promoter régió szekvenciának azt a képességét, hogy irányítsa az LFA-1 alfa-alegység-kódoló szekvencia transzkripcióját, vagy
- 3) nem gátolja az LFA-1 alfa-alegység-kódoló szekvenciának azt a képességét, hogy a promoter-regió szekvenciáról átírható.

Egy promoter régió tehát akkor kapcsolódik működésileg egy DNS szekvenciához, ha a promoter képes az említett DNS szekvencia transzkripcióját befolyásolni.

A jelen találmány tartalmazza az LFA-1 alfa-alegység (vagy ennek funkcionális származéka) expresszióját akár prokarióta, akár eukarióta sejtekben. Az LFA-1 alfa-alegység (vagy ennek funkcionális származéka) prokarióta sejtekben (azaz, például *E. coli*, *B. subtilis*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, stb.) való expressziójához az szükséges, hogy az LFA-1 alfa-alegységet kódoló szekvenciát működésileg kapcsoljuk egy működőképes prokarióta promoterhez. Ezek a promoterek lehetnek konstitutívek, vagy előnyösebben szabályozhatók (azaz indukálható vagy derepresszálható). A konstitutív promoterek közé tartozik a lambda bakteriofág int promotere, a pBR322 béta-laktamáz génjének bla promotere, a pBR325 kloramfenikol acetil-transzferáz génjének CAT promotere, stb. Az indukálható prokarióta promoterek közé tartozik például a lambda bakteriofág fő jobb és baloldali promotere (P_L és P_R), az *E. coli* trp, recA, lacZ, lacI és gal promotere, a *B. subtilis* alfa-amiláz [Ulmanen, I. et al., *J. Bacteriol.*, 162, 176-182 (1985)] és szigma-28 specifikus promotere [Gilman H. I. et al., Gene, 32, 11-20 (1984)], a *Bacillus* bakteriofágok promoterei [Gryczan, T. J., In: *The Molecular Biology of the Bacilli*, Academic Press, Inc., NY. (1982)] és a *Streptomyces* promoterek [Ward, J. M. et al., *Mol. Gen. Genet.*, 203, 468-478 (1986)].

A prokarióta promotereket összefoglalja Glick, B.R. [J. Ind. Microbiol., 1, 277-282 (1987)]; Cenatiempo, Y. [Biochimie, 68, 505-516 (1986)] és Gottesman, S. [Ann. Rev. Genet, 18, 415-442 (1982)].

Egy prokarióta sejtben a megfelelő expresszióhoz a gént kódoló szekvenciától upstream riboszómális kötőhelyre van szükség. Ilyen riboszómális kötőhelyeket ír le például Gold, L. et al., [Ann. Rev. Microbiol, 35, 365-404 (1981)].

Ha eukarióta sejtben van szükség expresszióra, például élesztőben, fonalas gombákban, emlős sejtekben vagy növényi sejtekben, akkor az ilyen eukarióta sejtben transzkripció irányítására képes promotert kell használni. Az előnyös eukarióta promoterek közé tartozik az egér metallothionein I gén promotere [Hamer, D. et al., J. Mol. Appl. Gen., 1, 273-288 (1982)]; a Herpes virus TK promotere [McKnight, S., Cell, 31, 355-365 (1982)]; az SV40 korai promoter [Benoist, C. et al., Nature (London,) 290, 304-310 (1981)]; az élesztő gal4 gén promotere [Johnston, S.A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 79, 6971-6975 (1982)]; Silver, P.A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 81, 5951-5955 (1984)].

Amint a széles körben ismert, az eukarióta mRNS transzlációja az első metionint kódoló kodonnál kezdődik.

Ebből a szempontból előnyös, ha biztosítjuk, hogy a kapcsolat olyan legyen egy eukarióta promoter és egy LFA-1 alfa-alegységet (vagy ennek funkcionális származékát) kódoló DNS szekvencia között, hogy ne tartalmazzon közbeeső, metionin kódolására képes kodont, (azaz AUG-t). Az ilyen kodonok jelenlétének eredménye vagy fuzió-s fehérje keletkezése (ha az AUG kodon az LFA-1-et kódoló DNS-sel azonos leolvasási fázisban van), vagy frame-shift mutáció (ha az AUG kodon nincs a LFA-1-et kódoló szekvenciával azonos leolvasási fázisban).

Ha az LFA-1 fehérjét (vagy annak funkcionális származékát) kódoló DNS szekvenciát működésileg egy funkcionális promoterhez kapcsoljuk, a kapott strukturát előnyösen számos különböző módszerrel, juttathatjuk be a befogadó sejtbe: transzformációval, transzfekcióval, konjugációval, protoplaszt-fuzióval, elektroporációval, stb.

Az LFA-1 alfa-alegységet kódoló szekvenciát és a vele működésileg összekapcsolt promotert a befogadó sejtbe bejuttathatjuk nem-replikálódó DNS (vagy RNS) molekulaként, ami lehet lineáris molekula, vagy előnyösebben egy kovalensen zárt cirkuláris molekula. Mivel az ilyen molekulák nem képesek az önálló szaporodásra, ezért a LFA-1 alfa-alegység polipeptid expresszi-

ója a bejuttatott szekvencia időleges (transziens) expressziójának következménye. Egy másik lehetőség szerint állandó expresszió jöhet létre, ha a bejuttatott szekvencia beépül a gazdaszervezet kromoszómájába.

A bejuttatott szekvenciát előnyösen a gazdaszervezetben önálló replikációra képes plazmid vagy vírus vektorba építjük be. Erre a célra számos különböző vektor közül választhatunk. Egy bizonyos plazmid vagy vírus vektor szelekciójában a következő fontos faktorokat veszik figyelembe: milyen könnyen lehet a vektort tartalmazó befogadó sejteket felismerni, és elkülöníteni azoktól a befogadó sejtektől, amelyek nem tartalmazzák a vektort, a vektor példányszáma egy adott gazdasejtben; és szükség van-e a vektor "ingáztatására", különböző fajba tartozó gazdasejtek között. Azelőnyös prokarióta vektorok közé tartoznak a plazmidok, például azok, amelyek képesek *E. coli*-ban replikálódni (pBR322, ColE1, pSC101, pACYC184, ϕ VX, stb.) Ilyen plazmidokat ír le például Maniatis, T. et al., [Inn. Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (1982)]. A *Bacillus* plazmidok közé tartozik például a pC194, pC211, pT127, stb. Ezeket a plazmidokat Gryozan, T. foglalja össze [In: The Molecular Biology of the Bacilli, Academic Press, NY (1982), 307-329. old.l.

Megfelelő Streptomyces plazmid a pIJ101 [Kendall, K. J. et al., J. Bacteriol, 169, 4177-4183 (1987)], és megfelelők a streptomyces bakteriofágok, például a ØC31 [Chater, K.F. et al., In: Akadémiai Kiadó, Budapest, Hungary (1986), 45-54. oldall]. A Pseudomonas plazmidokat John, J. F. és munkatársai foglalják össze [Rev. Infect. Dis., 8, 693-704 (1986)] valamint Izaki, K. [Jpn. J. of Bacteriol, 33, 729-742 (1978)].

Az előnyös prokarióta plazmidok közé tartozik például a BPV, vakcinia, SV40, 2 mikronos, stb. vagy ezek származékai [Botstein, D. et al., Miami Winter Symp., 19, 265-274 (1982)]; Broach, J. R., In: The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Life Cycle and Inheritance, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 445-470 old. (1981); Brach, J. R., Cell, 28, 203-204 (1982); Bollon, D. P. et al., J. Clin. Hematol, Oncol. 10, 39-48 (1980); Maniatis, T., In: Cell Expression, Academic Press, NY, 563-608. old. (1980)].

IV. ALFA-1 alfa-alegység, vagy fragmentjeinek használata

A jelen találmány tárgya az LFA-1 receptor molekula alfa-alegységének nukleinsav és fehérje-szekvenciája. Ez a felfedezés lehetővé teszi a rekombináns DNS-technológia alkalmazását az LFA-1 alfa-alegység molekula

előállításában. Amint azt az alábbiakban tovább tárgyaljuk, a jelen találmány egyik megvalósítási módja, lehetővé teszi az LFA-1 molekula alfa-alegységének önmagában való alkalmazását gyulladáscsökkentő szerként. Az egyik előnyös megvalósítási mód szerint az LFA-1 molekula alfa-alegységét a béta-alegységgel kombinációban használjuk. Ezeket a kombinációkat számos különböző módszerrel elő lehet állítani. Például az LFA-1 béta alegységét az LFA-1 alfa-alegységtől külön állítjuk elő, majd a két molekulát összekeverjük. Az azonban előnyös, ha az LFA-1-nek mind az alfa-, mind a béta alegységét ugyanabban a gazdasejtben állítjuk elő, hogy megkönnyítsük spontán LFA-1 heterodimer molekulákba szerveződésüket. Az LFA-1 béta-alegységét (amely közös az LFA-1-ben és Mac-1-ben), akár kémiai szintézissel, akár rekombináns DNS technikával [Kishimoto, T.K. et al., Cell, 48, 681-690 (1987)] állítjuk elő. Az LFA-1 béta alegységének klónozását a 019.440 sorszámú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentésben írják le (1987 február 26. a bejelentés napja), amelyre a továbbiakban hivatkozunk.

A jelen találmány egyik része az LFA-1 receptor-molekula alfa-alegysége nukleinsav és fehérje szekvenciájának felfedezésére vonatkozik. Ez a felfedezés lehetővé teszi a rekombináns DNS technológia használatát az LFA-1 alfa-alegység funkcionális származékainak előállítására, amelyek a sejt-tapadás antagonistáiként működhetnek. Amint

azt a továbbiakban használjuk, a "sejt-tapadás antagonistája" kifejezés jelentése bármely olyan molekula, amely képes megakadályozni a sejt-sejt vagy sejt-szubstrátum összetapadását. Lehetséges annak meghatározása, hogy egy adott vegyület antagonistá-e ha leukocitáknak endotheliális sejtekhez tapadását vizsgáljuk. A leukocita aggregáció vizsgálatára alkalmas módszereket ismertet például Anderson, D.C. et al., [J. Immunol., 137, 15-27 (1986)] és Keizer, G. D. et al., [Eur. J. Immunol, 17, 1317-1322 (1987)], ezekre a továbbiakban hivatkozunk. A sejt-tapadás antagonistáit gyulladáscsökkentő anyagokként lehet használni.

Amint a továbbiakban használjuk az LFA-1 alfa-alegységének "funkcionális származéka" olyan vegyület, amely olyan biológiai aktivitással rendelkezik (akár funkcionális, akár szerkezeti), amely lényegét tekintve hasonló az LFA-1 alfa-alegység biológiai aktivitásához. A biológiai aktivitáshoz tartozik például, hogy képes-e az ICAM-1 vagy a Mac-1 természetes ligandumainak megkötésére, vagy képes-e megkötni az LFA családba tartozó glikoproteinek béta-alegységeit. Az ilyen megkötés gátolja az adhézióval kapcsolatos eseményeket, például

a limfociták kapcsolódását az endotél sejtekkel, antigén-bemutató sejtekhez vagy célsejtekhez.

Egy molekuláról akkor mondjuk, hogy "lényegében hasonló" egy másik molekulához, ha mindkét molekulának lényegében azonos a szerkezete, vagy ha a két molekulának lényegében hasonló a biológiai aktivitása. Az LFA-1 alfa-alegység "funkcionális származékai" közé tartoznak az LFA-1 alfa-alegységnek mind a fragmentjei, mind a variánsai. Az "LFA-1 alfa-alegység fragmentje" szakkifejezés jelentése a molekula bármely polipeptid töredéke. Az "LFA-1 alfa-alegység variánsa" szakkifejezés jelentése egy olyan molekula, amelynek szerkezete lényegében hasonló vagy a teljes molekulához, vagy annak egy fragmentjéhez, feltéve, hogy a "variáns" legalább egy olyan biológiai aktivitással rendelkezik, amely az LFA-1 alfa-alegység egy biológiai aktivitásához hasonlít, vagy az LFA-1 alfa-alegység egyik aktivitását gátolja. Így, feltéve, hogy egy molekula legalább egy olyan biológiai aktivitást hordoz, amely vagy hasonlít az LFA-1 egyik aktivitásához, vagy gátol egy ilyen aktivitást, az LFA-1 alfa-alegység egy "variánsának" tekintjük,

amint ezt a kifejezést az alábbiakban használjuk, akkor is, ha az egyik molekula egy vagy több olyan aminosavat tartalmaz, amely nem található a másik molekulában, vagy ha a két molekula, aminosav sorrendje nem azonos. Így például, ha egy vegyületből hiányzik (vagy a vegyület tartalmaz) egy vagy több aminosav(at), amely megtalálható (vagy hiányzik) a másik LFA-1 alfa-alegység vegyületben (vegyületből), akkor a vegyületet az LFA-1 alfa-alegységének tekintjük, ha a vegyület az LFA-1 alfa-alegysége biológiai aktivitásához hasonló (vagy azt gátló) biológiai aktivitással rendelkezik. A "biológiai aktivitás" szakkifejezés szándékai szerint magába foglalja mind a "katalitikus" mind a "szerkezeti" aktivitást (azaz azt a képességet, hogy megköt más molekulát, például az ICAM-1-et, a Mac-1 béta-alegységét, az anti-alfa-alegység LFA-1 antitestet, vagy a Mac-1 más természetes ligandumát, stb.)

A találmány tárgya eljárás az LFA-1 molekula alfa-alegység funkcionális származékainak előállítására. Az ilyen származékok előállításához, csak az LFA-1 alfa-alegységet kódoló DNS-t, RNS-t vagy (előnyösen) a cDNS-t kell mutagenizálni. A mutagenizis lehet random vagy helyspecifikus. A mutagenézis lehet továbbá spontán vagy indukált,

kémiai radioaktív vagy rekombináns technikák alkalmazásával.

A jelen találmány oltalmi körébe tartozónak véljük továbbá azokat a származékokat, amelyekből bizonyos aminosavak hiányoznak, vagy amelyek megváltoztatott aminosavakat tartalmaznak, mindaddig, amíg az ilyen származékok a sejtes adhéziót fokozzák vagy gátolják.

A kémiai mutagének közé tartoznak a bázis-analógok (ugymint például az 5-bróm-uracil vagy 2-aminopurin); a dezamináló ágensek (ugymint például a salétromos sav, hidroxilamin, stb.) az alkiláló anyagok (ugymint például a metil-metán-szulfonát, nitrozo-guanidin stb.) vagy az interkalálódó anyagok (ugymint például az akridin-oranzs, etidium-bromid, pszoralén, stb.). A sugárzással indukált mutációkat ultraibolya fénnnyel, gamma-, röntgen-sugárzással, stb. állíthatjuk elő. A nukleinsav molekulák mutagenizálásának technikáit a következő helyeken találjuk meg összefoglalva: Miller, J.H. [In: Experiments in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1972)] és Silhavy, T.J. et al., [In: Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984)].

A helyspecifikus mutagenézist használhatjuk arra, hogy az LFA-1 alfa-alegységet kódoló nukleinsav kívánt pontjain specifikus mutációkat hozzunk létre. Rövi-

den, az ilyen eljárásokhoz általában szükség van a kivánt és meghatározott szerkezettel rendelkező DNS szekvencia (oligonukleotid) kémiai szintézisére. Az ilyen oligonukleotidok szintézisére szolgáló eljárásokat Kakura és munkatársai írják le [Ann. Rev. Biochem., 53, 323-356 (1984)]. Az LFA-1 alfa-alegység fehérjét, vagy annak funkcionális származékát kódoló nukleinsav molekulát általában olyan kétszálu vektorban klónozzuk, ugymint M13-ban, ØX174-ben, stb., amelyeknek a szálait el lehet választani egymástól. A vektor egyik szálát ezután a szintetikus oligonukleotid jelenlétében inkubáljuk. Mivel az oligonukleotid DNS-e ellenőrizhetően meghatározott, ezért lehetséges olyan oligonukleotidot előállítani, amelyik a LFA-1 alfa-alegységet kódoló nukleinsav bármelyik régiójával képes bázis-párokat képezni. Ha a bázispárok létrejöttek az oligonukleotid és az egyszálu plazmid között, akkor lehetséges az oligonukleotid meghosszabbítása DNS-polimerázzal, kétszálu DNS-molekulákat létrehozva, amelyeket utána DNS ligázzal köthetünk össze. Ha ezt a kétszálu DNS molekulát bejuttatjuk egy sejtbe, akkor a szemikonzervatív DNS-replikáció eredményeképpen olyan utód-molekulák keletkeznek, amelyekben az oligonukleotid fragment beépült a LFA-1 alfa-alegységet kódoló szekvenciába.

A jelen találmány szerinti LFA-1 alfa-al-egységet va annak funkcionális származékait egy másik módszer szerint szintetikus kémiai uton állithatjuk elő, a peptid-szintézis jól ismert Merrifield vagy más technikát használva. Egy másik módszer szerint ezeket a molekulákat a nukleinsav molekulák kémiai szintézisével is előállithatjuk (például a foszfodiészter-szintézis technikával), amelyek expressziója a kívánt terméket eredményezi.

Igy, ha valaki az LFA-1 kódoló szekvencia egy meghatározott pontján pontmutációt akar bevinni és külső DNS-t, vagy egy ilyen szekvenciában normálisan előforduló nukleotidokat ki akar hagyni (deléciós mutáns) akkor olyan oligonukleotidokat kell tervezni, amely tartalmazza a kívánt mutációt vagy szekvenciát, és a fenti eljárást végre kell hajtani. Ahhoz, hogy ilyen mutációt vagy külső DNS szekvenciát bevigyünk az LFA-1 alfa-alegység egy meghatározott pontjára, a mutációt vagy a külső DNS-szekvenciát olyan kísérő DNS-szekvenciákkal kell körülvenni, amelyek komplementerek a mutagenizálni kívánt régió DNS szekvenciájával. [Jenkins, F. et al., Bioessays, 5, 244-247 (1986); Doerfler, W., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 23, 919-931 (1984); Kaina, B. Biol Zentralbl. 99, 513-531 (1980); Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci (USA), 82, 488-492 (1985);

Nisbet, I.T. et al., Gene Anal. Tech., 2, 23-29 (1985);
 Hines, J. C. et al., Gene, 11, 207-218 (1980);
 Messing J. et al., Nucl. Acids Res., 9, 309 (1981)1.

Mutációkat a rekombináns DNS technika alkalmazásával is elő lehet állítani. Például egy LFA-1 alfa-alegységet kódoló nukleinsav molekulát végig lehet vizsgálni, tartalmazznak-e restrikciós endonukleázok által felismert szekvenciákat. Az ilyen endonukleázokat lehet arra használni, hogy a felismerési helyüknél specifikusan elhasítsák a nukleinsavat. Olyan restrikciós endonukleázt használva, amely két pontot ismer fel (és ott vág is) az LFA-1-et kódoló szekvencián lehetséges egy fragmentet kihasítani a LFA-1 alfa-alegységet kódoló szekvenciából. Más megoldás szerint erre a célra két különböző restrikciós endonukleázt lehet használni. Az elhasított molekulát DNS ligáz jelenlétében inkubálva, lehetséges az LFA-1 alfa-alegységet kódoló szekvenciát újból összeligálni egyetlen szekvenciává (amelyből hiányzik a kivágott fragment). Ha a LFA-1 alfa-alegységet kódoló szekvencián nincs megfelelő restrikciós endonukleáz felismerési hely, akkor ilyen helyeket a fent leírt helyspecifikus mutagenézissel lehet bejuttatni a szekvenciákba.

Mutációkat más módszerrel úgy juttathatunk be, ha a LFA-1 alfa-alegységet kódoló szekvenciát elhasítva,

a szabad végeket egy exonukleázzal kezeljük. Ilyen kezeléssel nemcsak deléciók, hanem frame-shift és más típusu mutációk is bevihetők. Ez a technika arra is alkalmas, hogy a LFA-1 alfa-alegységet kódoló szekvenciába új restriktív endonukleáz szekvenciákat juttassunk be. A restriktív endonukleázok, DNS-ligázok és exonukleázok használatának módszereit például Maniatis, T. és munkatársai foglalják össze [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1982)]1.

A rekombinációs technikát arra is használhatjuk, hogy a LFA-1 alfa-alegység fehérjéből (vagy annak funkcionális származékából) és egy új polipeptidből álló fúziós fehérjét állítsunk elő. Ez az új polipeptid nem korlátozódik egy kiválasztott polipeptidre és tartalmazhat egyetlen aminosavat, vagy aminosavak csoportját, permutációját. Az ilyen fúziós molekulákat úgy állíthatjuk elő, hogy az új polipeptidet kódoló DNS szekvenciát egy, a LFA-1 alfa-alegységet vagy funkcionális származékát kódoló DNS-szekvenciához ligáljuk oly módon, hogy ne keletkezzen frame-shift mutáció. A LFA-1 alfa-alegységhez vagy funkcionális származékához fuzionáltatható polipeptidekre előnyös példák közé tartoznak például az eukarióta vagy prokarióta szignál szekvenciák [Gilbert, W. et al., 4 411 994 sor-

számu Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírás; Casadaban, M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 76, 4530-4533 (1979)], vagy olyan polipeptidek, amelyek megnövelik (vagy lecsökkentik) a LFA-1- alfa-alegység (vagy annak funkcionális származéka) stabilitását, biológiai fél-életidejét vagy aktivitását. A gén-fúziók módszerének egy kiváló összefoglalóját adják Silhavy, T. J. és munkatársai [Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984)].

Antitesteket (főleg monoklonális antitesteket) gerjeszthetünk a LFA-1 alfa-alegység vagy a rekombináns LFA-1-alfa-alegység fragmentjeivel végzett immunizációs válasszal. Az ilyen antitesteket használhatjuk arra, hogy megakadályozzuk néhány leukocitának az endoteliális sejtekhez kapcsolódását, így gyulladáscsökkentő anyagokként használhatjuk.

A fent leírt módszereket használva az LFA-1 alfa-alegység fragmentjeit előállíthatjuk és megvizsgálhatjuk hogy meghatározzuk, vajon antagonistái-e sejt-tapadásnak. A sejt-tapadás antagonistájának talált fragmenteket a jelen találmány szerint gyulladáscsökkentő anyagként használhatjuk.

A jelen találmány részben abból a felfedezésből származik, hogy a leukocita-szubsztrát adhézió és a leukocita-endoteliális sejt-tapadás az LFA-1 receptor molekulát magában foglaló kölcsönhatásokból származik. Mivel celluláris adhézióra van szükség ahhoz, hogy ezek a sejtek a gyulladás helyére vándoroljanak és/vagy a gyulladásához hozzájáruló különböző effektor funkciókat hajtsanak végre, ezért az ilyen celluláris adhéziót gátló anyagok gyengítik vagy megelőzik a gyulladást. Az LFA-1 receptor molekula jelen van a leukocita sejtek felszínén. Az ilyen sejteknek endoteliális sejtek egysejtes rétegéhez való tapadását az LFA-1 molekula befolyásolja.

Az LFA-1 molekuláknak a természetes ligandumaikkal (pl. ICAM-1, stb.) való kölcsönhatása különösen fontos a sejt-tapadásban. A tapadási folyamaton keresztül a limfociták folyamatosan képesek ellenőrizni, hogy egy állatban van-e idegen antigén. Jóllehet ezek a folyamatok általában kívánatosak, ezek okozzák a szerv-kilökődést átültetés után, a szövetátültetés utáni kilökődést és számos autoimmun betegséget. Tehát bármely módszer, amely képes legyengíteni, vagy gátolni a sejtek tapadását, nagyon kívánatos az átültetett szervet, szövetet kapott betegek-nél, vagy az autoimmun betegek-nél.

Az ezeket a kölcsönhatásokat antagonizáló

anyagok nagyon alkalmasak gyulladáscsökkentő anyagoknak emlősökben. Lényeges, hogy ezek az anyagok abban különböznek az általános gyulladáscsökkentő anyagoktól, hogy képesek szelektíven gátolni az adhéziót, nincs mellékhatásuk, mint például a szokásos anyagoknál telített nefrotoxicitás. Az LFA-1 vagy ICAM-1 alfa-alegységéhez, vagy az LFA-1 molekula más természetes ligandumához kapcsolódni képes anyagok használhatók a szerv- vagy szövet-kilökődés megakadályozására, a graft versus host betegség megakadályozására (azaz a gazdaszervezet szövetének kilökődése, amelyet az átültetett csontvelő vagy más limfocita-tartalmu vagy azt generáló szövet okoz), vagy az autoimmun válaszok módosítására, a sejthez kötött LFA-1-gyel interferálva a mellékhatásoktól való félelem nélkül (például a sejthez kötött ligandumával való kölcsönhatás, stb.)

Fontos, hogy az ilyen molekulák felismerésére képes anyagok használata lehetővé teszi, hogy még eltérő HLA-val rendelkező egyének között is lehessen szervátültetést végrehajtani.

Azok az anyagok, amelyek gátolják az LFA-1 receptor molekulának a természetes ligandumához való kötődését, képesek tehát gátolni az öszes fent leírt LFA-1 dependens funkciót. Ezek az anyagok tehát a jelen

találmány szerint lehetnek gyulladáscsökkentő anyagok. Az ilyen anyagok közé tartozik az LFA-1 alfa-alegység, az LFA-1 (azaz az alfa- és béta-alegységből álló heterodimer molekula), valamint a Mac-1 alfa-alegységhez, vagy ennek az alegységnek a fragmentjeihez kapcsolódni képes antitest. Az összes ilyen anyagot a jelen találmány szerint lehet használni. A jelen találmány szerinti gyulladáscsökkentő anyagok képesek a specifikus védelmi rendszer reakciója által okozott gyulladás kezelésére.

Az alábbiakban a "specifikus védelmi rendszer" szakkifejezés az immunrendszernek arra a komponensére vonatkozik, amely specifikus antigének jelenlétében reagál. Az ilyen sejtek közé tartoznak a limfociták és makrofágok. A gyulladásról akkor mondják, hogy a specifikus védelmi rendszer válaszából származik, ha a gyulladást a specifikus védelmi rendszer okozza, közvetíti, vagy azzal áll kapcsolatban. A gyulladás példái, amelyek legalább részben a specifikus védelmi rendszer válaszából erednek, a következők: antigénekre, például rubella vírusra adott válasz, autoimmun betegségek, késleltetett típusu túlérzékenységi válasz, amelyeket T-sejtek közvetítenek (amint azt például olyan egyéneknél látjuk, akik a Mantoux tesztben pozitívak), átültetett szerv vagy szövet kilökődése, graft versus host betegség (azaz a gazda-

szervezet szövetének kilökődése, amelyet csontvelő vagy más limfocita-tartalma vagy azt generáló szövet átültetése okoz) stb. Az LFA-1 alfa-alegység és funkcionális származékainak az a képessége, hogy antagonizálja az ilyen gyulladásos reakciókat, az adja az alapot gyógyászatban való felhasználásukra krónikus gyulladásos betegségek és autoimmun betegségek kezelésében, például lupus erythematosus, autoimmun tiroditisz, kísérleti allergiás inkefalomielitisz (EAE), szklerózis multiplex, a cukorbetegség néhány formája, Reynaud szindróma, reumatoid artritisz, stb.

Mivel az LFA-1 olyan sejtekben expresszálódik, amelyek képesek az endoteliális szövethez kapcsolódni, ezért az LFA-1 alfa-alegység vagy az LFA-1 (alfa- és béta-alegység) betegeknél való beadása lehetőséget kínál az endoteliális szövet láthatóvá tételére. Emellett az az eljárás diagnosztikai információval is szolgál a láthatóvá tett szöveten meglévő LFA-1 receptor molekula kötő-ligandumainak mennyiségéről és eloszlásáról. Ilyen alkalmazás esetén az LFA-1 alfa-alegységeket (vagy az LFA-1 alfa-béta receptor molekulákat) kimutathatóan megjelöljük radioaktív izotópok, affinitási jelek (pl. biotin,

avidin, stb.) fluoreszcens jelzések, paramágnessé atomok stb. felhasználásával. Az ilyen jelzések bevitelére alkalmas eljárások jól ismertek a szakterületen. Az antitesteket (vagy ezek fragmentjeit) kimutathatóan megjelölhetjük radioaktív izotópok, enzimes jelzések, fluoreszcens jelzések, paramágneses jelzések, elektron-sűrűség jelzések, toxin jelzések, stb. felhasználásával. Az előnyös toxin jelzések közé tartozik a diftéria-toxin, ricin és a kolera-toxin. Az ilyen jelzett molekulák adagolása egy betegnek azonosítja a gyulladós területeket. Az ilyen kimutatható jelzéseket a beteg immun-rendszere állapotának vizsgálatára is felhasználhatjuk. Az antitestek klinikai alkalmazását a diagnosztikai képalkotásban a következő szerzők foglalják össze: Grossman, H.B. [Urol. Clin. North Amer., 13, 465-474 (1986)], Unger, E.C. et al., [Invest Radiol, 20, 693-700 (1985)] és Khaw B.A. et al. [Science, 209, 295-297 (1980)].

A monocitáknak az a képessége, hogy spontán vándorolnak a gyulladós területekre, a LFA-1-től függ [Keizer, G.D. et al., Eur. J. Immunol, 17, 1317-1322 (1987)]. Az ilyen vándorlást gátolhatjuk, ha a betegnek Mac-1 alfa-alegységet vagy Mac-1-et (alfa- és béta-alegység) adunk.

Hasonlóképpen, a leukocitáknak azt a képességét, hogy az endoteliális sejtekhez tapadnak,

LFA-1-től függőnek találták. A jelen találmány szerinti bármely gyulladáscsökkentő anyag használható az ilyen aktivitások gátlására.

Az ICAM-okat (például az ICAM-1-et) bizonyos humán vírusok felismerik (például a főtipusba tartozó rinovírusok, amelyek megkötik az ICAM-1-et). Ezek a vírusok a felismerés következtében kötődnek a humán sejtekhez, ezzel közvetítik a vírus-fertőzést. Tehát a virális megbetegedések etiológiájában központi lépés ezen sejtreceptorok és a vírus közötti kölcsönhatás.

Azok az anyagok, amelyek elnyomják, versengenek vagy gátolják a vírusnak azt a képességét, hogy egy ICAM molekulához kapcsolódjanak, felhasználhatók a virális (főleg rinovirális) fertőzés kezelésében.

A jelen találmány egyik szempontja tehát az LFA-1 alfa-alegységnek vagy ennek funkcionális származékainak az a képessége, hogy az ICAM-1-gyel kölcsönhatásba lép, és ezzel vagy megakadályozza a sejt-vírus összetapadást és a vírus-fertőzést, vagy legyengíti vagy megszünteti az ilyen fertőzés erősségét, időtartamát.

A jelen találmány számára különösen érdekesek az LFA-1 alfa-alegységnek funkcionális származékai, ugyanígy az LFA-1 alfa-alegység vizoldható formái, az LFA-1 alfa-alegység fragmentjei, stb. Az ilyen anyagokat a beteg-

nek heterodimer formában adják be, amely a molekulát a CD-18 családba tartozó béta-alegység egy molekulájával együtt tartalmazza. A vírus-fertőzés fent leírt célját elérhetjük egyetlen anyaggal, illetve egy vagy több anyag kombinációjával.

A vírusfertőzés kezelése céljából a fent leírt, a jelen találmány szerinti anyagot (anyagokat) a betegnek például intranazális módon olyan dózisban adjuk be, amely lehetővé teszi, hogy az anyag(ok) elnyomja, versengjen vagy gátolja a vírusnak egy ICAM molekulához való kötődését.

Egy ilyen dózis általában (minden egyes beadott anyagra vonatkozóan) 0,01 pg/kg testsúlytól 1 mg/kg testsúlyig változik, habár kisebb vagy nagyobb mennyiségek is használhatók.

Vírusfertőzés kezelése céljából az ilyen anyag(ok) adagolását végezhetjük "profilaktikusan", vagy "terápiásan". Profilaktikus alkalmazás esetén az anyagot (anyagokat) előre beadjuk például a fertőzés előtt, közben vagy röviddel utána, de a vírusfertőzés szimptomáinak megjelenése előtt. Az anyag(ok) profilaktikus adagolása a bekövetkező fertőzés legyengítését vagy megakadályozását szolgálja. Terápiás adagolás esetén az anyagot (anyagokat) az aktuális vírusfertőzés egy szimptomájának megjelenésekor (vagy röviddel utána) adjuk be (ugymint például a vírus-

-indukálta orrfolyás megjelenése, stb. vagy a vírus kimutatása a testfolyadékokban, vagy a fertőzött beteg szérumában a vírussal szembeni antitestek kimutatása, stb.). Az anyag(ok) terápiás adagolása az aktuális fertőzés legyengítését szolgálja, ezzel csökkentve erősségét vagy időtartamát.

V. Az LFA-1 alfa-alegység adagolása

Az LFA-1 alfa-alegység terápiás hatásait elérhetjük, ha a betegnek az LFA-1 receptor molekulát (alfa- és béta-alegységek), a teljes LFA-1 alfa-alegység molekulát, vagy ezeknek bármely, terápiásan aktív funkcionális származékát adjuk be. Ezeket a molekulákat előállíthatjuk szintetikusán, vagy rekombináns DNS technológia felhasználásával. Az LFA-1 receptor, vagy alfa-alegység fragmentjeit emellett proteolízissel is előállíthatjuk. Ezeknek a molekuláknak a terápiás előnyeit fokozhatjuk funkcionális származékok használatával, amelyek hozzáadott plusz aminosavakat tartalmaznak a hordozóhoz való kötődés fokozására vagy az aktivitás növelésére.

A jelen találmány szerinti molekulákról azt mondjuk, hogy "természetes szennyezőanyagoktól lényegében mentesek", ha az őket tartalmazó készítmények lényegében mentesek azoktól az anyagoktól, amelyeket ezekben a termé-

kekben normálisan, természetesen megtalálunk.

A jelen találmány szerinti terápiás hatású molekulák adagolása esetén a beadott anyag dózisa változik, a beteg korától, súlyától, magasságától, szemétől, általános orvosi állapotától, előzetes kórtörténetétől, stb. függően.

A betegnek általában előnyösen 1 pg/kg-tól 10 mg/kg-ig (a beteg test súly-kilogrammja) terjedő tartományba eső dózisu LFA-1 alfa-alegységet (vagy annak funkcionális származékát) adunk, jóllehet alacsonyabb vagy magasabb dózist is használhatunk.

A jelen találmány szerinti molekulákat a betegeknek beadhatjuk intravénásan, intramuszkulárisan, szubkután, enterálisan vagy parenterálisan. Az adagolás lehet folyamatos infúzió illetve egyszeri vagy ismételt bolus.

A jelen találmány szerinti gyulladáscsökkentő anyagokat a gyulladás elnyomására alkalmas mennyiségben kell beadni a betegeknek. Egy mennyiségről akkor mondjuk, hogy elegendő a gyulladás elnyomására, ha az anyag dózisa az adagolás utjalehetővé teszi a gyulladás csökkentését vagy megakadályozását. A jelen találmány szerinti gyulladáscsökkentő anyagokat beadhatjuk a gyulladás megkezdődése előtt (hogy elnyomjuk a feltételezett gyulladást), vagy a gyulladás megkezdődése után.

Egy készítményről akkor mondjuk, hogy "gyógyászatiilag elfogadható", ha adagolását a beteg elviseli. Egy ilyen anyagról akkor mondjuk hogy "terápiásan hatásos mennyiségben" adagoljuk, ha az adagolt mennyiség fiziológiásan szignifikáns. Egy anyag akkor szignifikáns fiziológiásan, ha jelenléte a beteg fiziológiájában kimutatható változást eredményez. A jelen találmány szerinti molekulákat a gyógyászatiilag elfogadható készítmények előállítására ismert módszerekkel formulázhatjuk, amikor is ezek az anyagok vagy funkcionális származékaik gyógyászatiilag elfogadható hordozóval vannak elkeverve, kombinálva. A megfelelő hordozókat és formulálásukat, beleértve más humán fehérjéket, például a humán szérum-albumint, megtalálhatjuk a Remington's Pharmaceutical Sciences című kézikönyvben [16. kiadás, Osol, A., ed., Mack, Easton, PA (1980)]. Hogy hatékony adagolás céljára alkalmas gyógyászatiilag hatékony készítményt hozzunk létre az ilyen készítmények tartalmazzák az LFA-1 alfa-alegység terápiásan hatásos mennyiségét, illetve a fragmentek vagy funkcionális származékok terápiásan hatásos mennyiségét, megfelelő mennyiségű hordozó anyaggal együtt.

A hatás időtartamának szabályozására további gyógyszerészeti módszerek használhatók. Szabályozott felszabadulású készítményeket úgy állíthatunk elő, hogy polimereket használunk az LFA-1 alfa-alegység, fragmentjei vagy funkcionális származékai komplexének előállítására, vagy abszor-

beállítására. A szabályozott felszabadulást úgy valósíthatjuk meg, hogy megfelelő makromolekulákat (például poliészterek, poli-aminosavak, polivinil-pirrolidon, etilén-vinil-acetát, metil-cellulóz, karboximetil-cellulóz vagy protamin-szulfát), a makromolekulák megfelelő koncentrációját és a megfelelő beépítési módszert választjuk a kiszabadulás szabályozására. Másik lehetséges módszer a hatás időtartamának szabályozására a szabályozott kibocsátás esetén az LFA-1 alfa-alegység molekulák, fragmentjeik vagy funkcionális származékaik beépítése, polimer részecskékbe, amelyek anyaga poliészter, poli-aminosavak, hidrogélek, poli (tejsav) vagy etilén-vinilacetát kopolimerek. Egy másik módszer szerint, ahelyett hogy ezeket az anyagokat polimer részecskékbe foglalnánk, lehetséges ezeknek az anyagoknak mikrokapszulákba zárása, amelyeket előállíthatunk például koacervációs technikákkal vagy határfelületi polimerizációval, például hidroximetil-cellulóz vagy zselatin-mikrokapszulákba és poli-(metil-metakrilát) mikrokapszulákba, vagy kolloid gyógyszer-felszabadulási rendszerekbe, például liposzómákba, albumin mikroszférákba, mikroemulziókba, nanorészecskékbe és makroemulziókban lévő nanokapszulákba. Ezeket a technikákat összefoglalóan a Remington's Pharmaceutical Sciences (1980) könyvben írják le.

A találmány általános leírása után, a következő példákat adjuk meg illusztrálás céljából, amelyek

nem korlátozzák a találmány oltalmi körét.

1. példa

Az LFA-1 alfa-alegység tisztítása

Az LFA-1 SKW3 limfociták felszínén expre-
szálódik. Az LFA-1 alfa-alegység molekulát SKW3 sejtek-
ből tisztítjuk monoklonális antitest affinitéskromatog-
ráfiával, Miller, J. et al. módszerét használva [J. Immu-
nol., 137, 2891-2900 (1987), amely cikkre a továbbiakban
hivatkozunk. A TS/22 monoklonális antitestet, amely az
LFA-1 alfa-alegysége ellen készült, megtisztítjuk és CL-4B
Sepharose-hoz (Pharmacia) kapcsoljuk, (bromcián felhasz-
nálásával), 2 mg AB-t, 1 ml töltött égyra számítva. Az
SKW3 sejteket (42,2 g), melyeket az MIT törzsgyűjteményé-
ből szereztünk be, 300 ml lizis pufferben lizáljuk [Kurzin-
ger, K. et al., J. Biol. Chem., 257, 12412-12418 (1982)],
és a lizátumot két órán át 16000 x g-vel centrifugáljuk.
A felüluszt ezután egymás után átbocsátjuk egy aktivált és
kioltott CL-4B Sepharose-ból készült előoszlopon, majd egy
TS1/22 Sepharose oszlopon. A TS1/22 oszlopot ezután mossuk
[Kurzinger, K. et al., J. Biol. Chem., 257, 12412-12418
(1982)], és az LFA-1 alfa-alegységet 50 mM trietil-amin,
0,5 M NaCl, 0,1 % Triton X-100, 1 mM jóacetamid, 10 U/ml
aprotinin és 0,025 % NaN₃ összetételű oldattal oldjuk le

(pH = 11,5), majd a pH értékét azonnal semlegesre állítjuk. Az LFA-1 alfa-alegységet tartalmazó frakciókat összegyűjtjük, liofilezzük, majd 5 térfogat etanollal -20°C -on éjszakán át tárolva kicsapjuk.

A tisztított fehérjét redukáljuk és alkilezzük [Law, S.K.A. et al., EMBO J. 6, 915-919 (1987)]. Az LFA-1 alfa-alegységnek megfelelő csíkot 1 M KCl-dal tesszük láthatóvá, majd kivágjuk és elektroeluáljuk [Pellegrino, M.A. et al., Clin. Immunol. Immunopath., 3, 324-333 (1975)]. A tisztított alfa alegységet liofilezzük és 4 térfogat etanollal éjszakán át -20°C -on kicsapjuk. A csapadékot újra felfuszpendáljuk és 1 %-os tripszinnel emésztjük [Wong W.W. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 7711-7715 (1985)]. A triptikus fragmenteket HPLC-vel (Beckman) izoláljuk C4 fordított fázisu oszlopon [Vydac]. A peptideket 1 %-os trifluorecetsavban készült 0-60 %-os acetonitril gradienssel oldjuk le. Néhány csucst újra kromatografálunk izokratikusan, a következő egyenlet által meghatározott koncentrációju acetonitrilben:

$$F = (0.9E) ^{-2}$$

ahol F jelentése az az acetonitril térfogatszázalék izokratikus körülmények között egy peptidre, amely a lineáris gradienssel E térfogatnál eluálódott [Lathe, R. et al.,

J. Molec. Biol., 183, 1-12 (1985)1. A csucsokat 1,5 ml-es polipropilén csövekben gyűjtjük össze, és kisebb mint 50 μ l térfogatra koncentrálnak. Nyolc csucsot választunk ki mikroszekvenálásra. Az egyik, L64 jelű peptidnek a szekvenciáját használjuk a Lathe és munkatársai által javasoltak alapján [J. Molec. Biol., 1-12 (1985)1 egy oligonukleotid megszintetizálásához:

5'-GGGATGTTGTGGTCATGGATGGTGGGCTCAAT-3'

Összefoglalva, az LFA-1et először egy SKW3 jelű T limfoma sejtvonal lizátumából izoláljuk monoklonális antitest affinitás kromatográfiával, az α -alegységgel szembeni antitestet használva. Az α -alegységet tovább tisztítjuk preparatív SDS-PAGE-val, és a tisztított α -alegységet tripszinnel emésztjük majd a peptideket fordított fázisu HPLC-vel izoláljuk. Kilenc csucs peptid szekvenciáját határozzuk meg mikroszekvenálással (1. ábra). A legalacsonyabb kodon redundanciával rendelkező peptid-szekvenciát használjuk egyetlen olyan oligonukleotid szekvencia meghatározására, amely a leggyakrabban előforduló humán kodonokat tartalmazza [Lathe, R. et al., J. Molec. Biol., 183,1-12 (1985)1. Az LFA-1 alfa-alegység triptikus peptidjeinek szekvenciáját mutatjuk be az I. táblázatban.

Az LFA-1 alfa-egység triptikus peptidjeinek
szekvenciái

Csoportok	Aminosav szekvencia
95-107	X X D Q (N) T Y L S G L (E) Y L F
199-210	H M L L L T N T F G A I
254-260	Y I I G I G K
405-413	V L L F Q E X Q G
494-503	G E A I T A L T X I
541-554	I E G T Q V L S G I Q X F G
564-576	X(L)E(G)D(V/G)L A D V A V G A E
803-817	K V E M L K P H S E I X V S (T)
929-946	<u>I (E/Q) P S I H N I P X L E A V X G</u>

A zárójelek a bizonytalanságot mutatják a szekven-
ciában. Az aláhuzott csoportokat használjuk oligonukleo-
tid próbák előállításához.

2. példa

cDNS klónozás

Nagyobb mint 2kb méretű inszert beépülése
alapján szelektált és PMA-val (forbol-mirisztinsav)
indukált HL-60 sejtekből előállított lambda gt 10
klóntárból 5×10^5 rekombinánst [Corbi, A. et al.,
EMBO J., 6, 4023-4028 (1987)] szélesztünk 50 000 rekomb-

bináns per 150 mm-es lemez sűrűségben. A klóntárat amplifikáljuk [Woo, S.L.C., Met. Enzymol., 68, 389-395 (1979)], majd nitrocellulóz szűrőlapokat kezelünk Benton and Davis előírásai szerint [Benton, W.D. et al., Science, 196, 180-182 (1977)]. A szűrőket előhibridizáljuk 6 x SSC [0,6 M NaCl, 0,06 M nátrium-citrát], 0,05 % nátrium-foszfát és nátrium-pirofoszfát, 0,5 x SDS, 1x Denhardt és 100 µg/ml lazac-sperma DNS összetételű oldatban éjszakán át 42 °C-on. Az oligonukleotidot (szekvenciáját az előzőekben mutattuk meg) gamma-³²P-ATP-vel jelöljük, polinukleotid kinázt használva erre a célra. A filtereket éjszakán át hibridizáljuk az előhibridizáló pufferben 42 °C-on majd egymást követően mossuk 6 x SSC, 0,05 % nátrium-pirofoszfát oldatokkal 15-15 percig 50 °C-on. A filtereket elővillantott XAR-5 filmre helyezzük 6-20 órára. Azt a fagot, amely a kettős filteren jelet adott tarfolt-tisztításnak vetjük alá, majd cDNS inszertjeik méretét agaróz gélelektroforézissel határozzuk meg.

A 32-tagu oligonukleotid próbát használjuk husz klón izolálására a méretre szelektált, PMA-val indukált mieloid sejtekből előállított [Corbi, a. et al., EMBO J. 6 4023-4028 (1987)] lambda gt 10 10 klóntárból. Ezekről a sejtekről korábban kimutatták, hogy az LFA-1 alegységét szintetizálják [Miller, L.J. et al., J. Immunol.,

139, 842-847 (1987)]. Az inszert méretét meghatározzuk, és a leghosszabb klónt, a lambda 5L5-öt restriktív térképezük (2. ábra). Ez a klón tartalmazza az oligonukleotid próbának megfelelő nukleotid szekvenciát (85 %-ig azonos a "legjobb becslés" próbával). A nukleotid szekvencia kódolja még a triptikus peptidet, amelyet mikroszekvenálással határoztunk meg (16 csoportból 16), amely magába foglalja az oligonukleotid próbát, sőt azon túl is nyúlik. Ez a klón azonban nem kódolja a teljes fehérjét, mivel az open reading frame-en nem található meg az összes triptikus peptid-szekvencia. A lambda 5L5 5' 1,0 kb méretű EcoRI fragmentjét használjuk újabb 5×10^5 rekombináns átvizsgálására. További 14 klónt azonosítottunk, és a lambda 3R1, klón azonos restriktív térképpel rendelkezik az átlapoló régióban, emellett még egy 1,0 kb méretű 5' fragmentet tartalmaz. Ennek a plusz fragmentnek a restriktív térképét is meghatározzuk (2. ábra).

3. példa

Restriktív térképezése és nukleotid szekvenálás

A kiválasztott klónok restriktív térképét kettős és részleges emésztésekkel határozzuk meg [Maniatis T. et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold

Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
(1982)]]. A restriktációs fragmenteket vagy M13 mp 18 vagy M13 mp 19 fágba [Messing, J., *Met. Enzymol.*, 101, 20-78 (1983)] szubklónozzuk, vagy pGEM-3Z, 4Z, vagy 7Z-be (Promega). A pGEM-ben a fragmentek delécióit Exonukleáz III-mal vagy S1-gyel készítjük [Henikoff, S., *Gene*, 28, 351-350 (1984)]. A szekvenálást a didezoxi terminációs módszerrel végezzük [Sanger, F. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 5463-5467 (1977)]. A kódoló szekvenciát, az 5' és 3' nem transzlálódó régiókat meghatározzuk, 100, 83.1, illetve 33.7 százalékban, mindkét irányban.

Az átlapoló cDNS klónok 5139 nukleotidot tartalmaznak (3. ábra). Található egy 3510 nukleotid hosszúságú open reading frame, egy 94 nukleotid hosszúságú 5' nem-transzlálódó régió, és egy 1535 nukleotid hosszúságú 3' nem-transzlálódó régió, amely tartalmaz egy poliadenilézési helyet 15 nukleotiddal a poli(A) farok előtt. A 3' nem-transzlálódó régióon belül van egy tipikus AluI ismétlődés, amely két tandem rokon szekvenciát tartalmaz, ezek mindegyikét egy A-ban gazdag szegment határolja [Hardmen, N., *Biochem. J.*, 234, 1-11 (1986)]. Az Alu szekvencia 304 nukleotid hosszú és 78,8%-ban azonos a szokásos Alu család szekvenciájával.

4. példaSouthern és Northern Blot

A Southern blot-ot Corbi, A et al., leírása szerint végezzük [J. Exper. Med., 167, 1597-1607 (1988)]. 20 µg/ml sejt össz-RNS-t izolálunk SKW3, U937, IB4 vagy EJ sejtekből, 1 %-os formaldehid gélen elektroforetizáljuk, majd nitrocellulózra visszük át [Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York). A nylon membránt (Zeta probe, RioRad) előhibridizáljuk, majd hibridizáljuk 2 x SSC, 1 x Denhardt oldat, 0,1 % SDS és 10 µg/ml hering sperma DNS összetételű oldatban. A lambda 3R1 cDNS klón 5' végéről egy 1,8 kb méretű EcoRI fragmentet jelölünk nick transzlációval majd próbaként használjuk.

A Northern blot vizsgálat egy 5,5 kb méretű mRNS jelenlétét mutatja ki az SKW3, U937 és IB4 sejtekben, de jel nem detektálható az EJ sejtekben. A sejtben való eloszlás jól egyezik a cDNS klón méretével és az LFA-1 felületi expressziójával. A lambda 2L2 klónból származó 1,2 kb méretű 5' EcoRI-BamHI fragment felhasználásával végzett Southern blot analízis két, 10 és 8 kb méretű fragmenthez hibridizált [Corbi, A. et al., J. Exper. Med., 167, 1597-1607 (1988)]. Egy kozmid klóntárból izolált genomiális

klón tartalmazza ezt e két, azonos hosszúságú fragmentet. A két fragment egymással határos, és igazolja, hogy az LFA-1 egy példányban előforduló gén.

5. példa

Számítógépes elemzés

A homológia-kereséseket és a szekvenciák illesztését először a Microgenie DNA programmal (Beckman), FASTP-vel (Wilbur and Sigmann) az NBRF és NEW adatbázisokon (National Biomedical Research Foundation, Washington, DC) valamint FSTP-vel a SWISS-PROT adatbázison (Bionet) végeztük. Ezeket az illesztéseket optimalizáljuk az ALIGN (NBRF) (5585) és BENALIGN (Bionet) programokkal.

A hidrofobicitást Microgenie DNA programmal, valamint PEP-PLOT (5792) programmal (University of Wisconsin Genetics Computer Group) határozzuk meg. Az aminosav-szekvencia hidrofobicitási analízise azt mutatja, hogy az LFA-1 α -alegység egy tipikus, hidrofób transzmembrán, egy hidrofobitás szignálszekvenciából egy extracelluláris doménből, egyetlen hidrofób transzmembrán régióból és egy rövid citoplazmatikus farkból áll. A humán LFA-1 N-terminális részét a rágcsáló LFA-1 N-terminálisához való homológia alapján azonosítjuk (5. ábra). A humán LFA-1 55 %-ban azonos a rágcsáló LFA-1-gyel az első 20 aminosavban. Az N-terminális szekvenciát a peptidáz hasítás kon-

szenzus szekvenciájának (Ala-X-Ser/Pro) peptidje előzi meg. A leolvasási fázisban három feltételezett upstream transzkripciósi iniciációs hely (ATG) van. A 89-es nukleotid pozícióban lévő első iniciációs hely használata általában [Kozak, M., Nucl. Acid Res., 12, 857-872 (1984)], ennek eredményeképpen egy huszonöt tagból álló szignál-szekvenciát kapunk, számos poláris csoporttal az N-terminálisához közel, amelyek jellemzően megtalálhatók a szignál-szekvenciákban [von Heijne, G., J. Molec. Biol., 173, 243-251, (1984)]. A triptikus peptid mikroszekvenálása során meghatározott mind a 117 aminosav megtalálható a transzlálódó open reading frame-ben, megerősítve a cDNS klónok valódiságát. Az előzőket összerakva, ezek a tények azt mutatják, hogy az LFA-1 alfa-algység egy N-terminális 29+ aminosav szignál-szekvenciával rendelkezik, egy 1063 tagu extracelluláris doménnel, egy 29 aminosavból álló transzmembrán doménnel, valamint egy 53 aminosavból álló C-terminális citoplazmatikus farkkal.

Az extracelluláris doménben két darab, 49-63 aminosavból álló ismétlődő szakasz található. Ezen belső ismétlődő szakaszok közötti belső azonosság mértéke és statisztikai szignifikanciája legnagyobb a három utolsó ismétlődő szakasznál 24-33 %, $p < 10^{-2}$ -től $< 10^{-6}$ -ig.

Az utolsó három ismétlődés központi régiója számos kétértékű kation-kötő hellyel mutat homológiát (4. ábra). Az előzetes vizsgálatok kimutatták, hogy a fehérje funkcionális integritásához Mg^{2+} ionokra egyedül, vagy alacsonyabb koncentrációban Ca^{2+} ionokkal együtt van szükség [Rothlein, R. et al., J. Exper. Med., 163, 1132-1149 (1986)]. A három tandem ismétlődésnek a kétértékű kation-kötő helyekkel való analógiája azt sugallja, hogy az LFA-1 megköti a kétértékű kationokat. Az I-IV ismétlődésekből hiányzik a konszenzus kétértékű kation-kötő hely, de megőrizték a környező régiókat. Ezek a strukturális hasonlóságok felvetik a lehetőségét, hogy ezek az ismétlődések duplikációs eseményekből származtak.

Az érett fehérje molekulásulya $M_r = 126\ 193\ D$, és 12 N-kapcsolt glikozilezési hely (Asn-X-Thr/Ser) található az extracelluláris doménben. Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy ezen helyek közül legalább öt glikozilezve van és $M_r = 5000 - 10\ 000$ dalton molekulásulyu oligoszacharidokat tartalmaznak, ami jellemző a komplex N-kapcsolt szénhidrátokra [Dahms, N.M. et al., J. Immunol. 134, 3978-3986 (1985)]. Tehát a glikozilezési helyek közül 5-10-nek a használata az SDS-PAGE által meghatározott molekulásullyal egyező molekulásulyt jósol.

A rágcsáló LFA-1 N-ter minálisának meghatározása [Girma, J-P. et al., Blood 70, 605-611 (1987)],

valamint az LFA-1/Mac-1/p150,95 közös β alegységének elsődleges szerkezete azt sugallja, hogy az LFA-1 alfa-alegység tagja az integrin szuperfamilának. Az LFA-1 alfa-alegység meglepő homológiát mutat (35 %-os azonosság) a p150,95 és Mac-1 alfa-alegységgel, valamint kisebb mértékű (25 %-os azonosság) az ECM receptorok alfa-alegységével. Másrészt, az FNR, VNR és IIB 40 %-ban azonosak egymással. A leukocita integrinek emellett tartalmaznak még egy körülbelül 200 aminosavas inszerciót a fehérje N-terminális régiójához közel, amely nincs jelen a három szekvenált ECM receptorban (5. ábra). Továbbá az a régió, amelyben a proteáz hasítási hely előfordul a VNR-ban, FNR-ban és a gpIIB/IIIA-ban, az hiányzik az LFA-1 valamint a p150,95 és Mac-1 alfa-alegységekből, és korrelál azzal, hogy nincs proteolitikus processzálas az LFA-1 család alfa-alegységeinél. Egszében ezek a strukturális tulajdonságok az alfa-alegység integrinek két alcsaládját határozzák meg, a leukocita integrinek és az ECM integrinek.

Az integrin család összes alfa-alegysége az LFA-1-hez hasonló tandem ismétlődéseket tartalmaz, amelyekben feltételezett kétértékű kationkötő helyek vannak [Corbi, A. et al., EMBO J., 6, 4023-4028 (1987), Poncz, M. et al., J. Biol. Chem., 262, 8476-8482 (1987), Suzuki,

S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 8614-8618 (1986), Argaves, W.S. et al., J. Cell Biol., 105, 1183-1180 (1987), Ruoslahti, E. et al., Science, 238, 491-497 (1987)]. Azonban az LFA-1-ben és a p150-ben csak három ismétlődés tartalmaz feltételezett fém-kötő helyeket, míg az ECM receptorokban mind a négy ismétlődés tartalmaz fém-kötő helyeket. Az LFA-1-ben és más integrinokban lévő feltételezett kétértékű kationkötő helyek rokonságban állnak, de nem azonosak az integráris membrán fehérjék korábban leírt kétértékű kationkötő helyeivel. Számos típusú kétértékű kationkötő hely létezik. A helyek első csoportja alternáló D-X-D(N)-X-D(N) struktúrával rendelkezik. Ezek a helyek többek között megtalálhatók a Troponin C-ben, a parvalbuminban (5256) és a galaktóz-kötő fehérjében. Ezek a helyek egy EF hurok szerkezetet hoznak létre, és 6-7 kelációs hellyel rendelkeznek. Az LFA-1 és a többi integrin feltételezett kötő-helyei szintén rendelkeznek egy D-X-D(N)-X-D(N) elsődleges szerkezettel, számos G csoporttal a megőrzött kelációs hely között. A Z-pozícióban lévő csoportot azonban egy hidrofób csoport helyettesíti. Továbbá a kalcium-kötő hely előtti és utáni alfa hélix úgy tűnik hogy hiányzik az integrin helyekből [Corbi, A. et al., EMBO J., 6, 4023-4028 (1987)]. Ennek a különbségnek a jelentősége nem ismert, de részben felelős

lehet azért, hogy ezek a helyek előnyben részesítik a Mg^{2+} ionokat.

Az NBFR és Swiss-Protein adatbankok átvizsgálása felfedte, hogy ez az LFA-1 család specifikus domén, amelyre "L" doménként fogunk hivatkozni, jelentős homológiával rendelkezik a humán vWf A1 doménjével, a humán B komplement faktorra és a csirke kollagén mátrix fehérjével. Ezek a hasonlóságok az L domén teljes hosszára kiterjednek. Mivel a vWf három ismétlődő A doménnel rendelkezik (A1, A2, A3) (5790), a B komplement faktorban lévő domén analóg a 2-es komplement komponens (C2) (5789) hasonló doménjével, és a CMP 2 két ismétlődéssel rendelkezik (5778) az LFA-1 L domént hasonlítjuk az összes említett doménekhez az ALIGN program alkalmazásával. A C2 kivételével az összes illesztés statisztikailag szignifikáns (6. ábra).

Ezek a hasonlóságok egy valószínű funkcionális domént jelentenek az LFA-1 számára. Először a vWf A1 doménje az Ib glikoproteinhoz valamint a heparinhoz kötődik (5946), míg mind az A1, mind az A3 domén a kollagénhez való kötődésben vesz részt. Másodszor, a B faktorban található homológ domén a hasítási hely C-terminális oldalán található, ahol a B faktor hasad Bb faktorrá, valamint a szerin proteáz N-terminális oldalán [Mole, J.E. et al.,

J. Biol. Chem., 259, 3407-3412 (1984), Bently, D.R., Biochem. J., 239, 339-345 (1986)]. Ez a domén tehát abban a régióban található, amelyről várható hogy a ligandumával, a C3b-vel kölcsönhatásba lép. A kollagén mátrix fehérje szerkezetét részlegesen meghatározták, két ismétlődéssel rendelkezik, amelyeket egy epidermális növekedési faktor-szerű szekvencia választ el [Argaves, W.S., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 464-468 (1987)]. A CMP kölcsönhatásba lépő mind a kollagénnel [Argaves, W.S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 464-468 (1987)], mind a porc proteoglikánjával (7. ábra) [Paulsson, M. et al., Collagen Rel. Res., 4 219-229 (1984)].

Az LFA-1-et, a Mac-1-et és a p150,95-öt ujabban lokalizálták a 16p11 kromoszómán [Corbi, A. et al., J. Exper. Med., 167, 1597-1607 (1988)]. A leukocita integrin alfa-alegységeket kódoló gének szerkezetű hasonlósága és egymáshoz való közelsége azt sugallja, hogy egy ősi gén duplikálódott és eredményezte az integrin alfa-alegységek legalább két ágát, a leukocita integrineket és az ECM integrineket. Egy 180 aminosav hosszúságú domén inszertálódott a leukocita integrin alegység ősi génjébe, majd a gén duplikálódott, ez eredményezte az LFA-1-et, Mac-1-et és p150,95-öt. Ezeknek a doméneknek az LFA-1

család L-doménjéhez való hasonlósága azt sugallja, hogy ez az L-domén egy funkcionális domén lehet. Ezek a hasonlóságok továbbá azt is magukban foglalják, hogy egy ősi domén inszertálódott számos fehérjébe, majd különböző felismerési funkciók fejlődtek ki a hemosztázisban, a komplement aktiválásban és az immunválaszban.

Az alfa-alegység integrinek két csoportja közötti strukturális különbségek megfelelnek a funkcionális domének felismerési helyében lévő különbségnek, mivel az RGD-tartalmu fehérjék gátolják az FNR és gpIIb/IIIa kapcsolódását a megfelelő ligandumokhoz [Rouslahti, E. et al., Science, 238, 491-497 (1987)], míg egy RGDS peptid nem gátolja az LFA-1 és az ICAM-1 kölcsönhatását. Az ECM ligandumoktól eltérően, az ICAM-1 maga nem tartalmaz RGD szekvenciát és az immunoglobulin gén szupercsalád tagja. Mind a szerkezeti, mind a funkcionális adatok azt sugallják, hogy az integrin szupercsalád az alfa-alegységek két alcsaládjára osztható. A β_2 -vel asszociálódó alfa-alegységeknek ezek a szerkezeti és funkcionális tulajdonságai azonban nem csak a saját alcsaládjukra lehetnek jellemzők, mivel számos más integrin alfa-alegység rendelkezhet az LFA-1 családdhoz hasonló szerkezeti jellemzőkkel, mit például a proteolitikus hasítási hely hiányával [Charo, I.F. et al., Proc. Natl.

Acad. Sci. USA, 83, 8351-8355 (1986)1.

Az LFA-1 alfa-alegység szerkezetének felfedezése új evolúciós kapcsolatokat fedett fel az integrin alfa-alegységek között és egy lehetséges funkcionális domént sugall, valamint demonstrálja, hogy az LFA-1 alfa-alegység az integrin szupercsaládhoz tartozik, de egy további domént tartalmaz. Ez az L domén és a homológ domének egy fehérje "domén" családot képeznek, amelynek funkcionális jelentősége van. Mivel az LFA-1 felismerési helyre nem RGD, ezért az L doménnek funkcionális jelentősége lehet az LFA-1 alfa-alegységben, valamint a többi leukocita integrinben, Mac-1-ben, és a p150,95-ben. Azonban mivel az LFA-1 számos leukocita funkcióban vesz részt és több mint egy ligandummal rendelkezhet [Rothlein, R. et al., J. Immunol., 137, 1270-1274 (1986)1, ezért lehetséges, hogy az LFA-1 alfa-alegységben egynél több funkcionális domén található. Az is érdekes ha boncoljuk a citoplazmatikus faroknak a citoszkeletonnal való kölcsönhatásait, és azt, hogy ezek a kölcsönhatások milyen szerepet játszanak a szignalizációban. Az alfa- és béta-alegységek cDNS klónjainak hozzáférhetősége lehetővé teszi, hogy vizsgáljuk ezeket a szerkezet-funkció összefüggéseket.

Jóllehet a találmányt a specifikus megvalósítási módokkal kapcsolatban irtuk le, az érthető, hogy al-

kalmas további módosításokra, és ez a szabadalmi bejelentés szándékaink szerint a találmány bármely variációját, felhasználását, vagy adaptálását védi, általánosságban a találmány elveit, és beleértve a jelen leírástól való olyan eltéréseket amelyek a szakterületen ismertek és alkalmazhatók a leirt lényeges tulajdonságokra, amint az a csatolt igénypontokból kiderül.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. LFA-1 alfa-alegység, vagy funkcionális származéka, azzal jellemezve, hogy lényegében mentes a természetes szennyezőktől.

2. Az 1. igénypont szerinti LFA-1 alfa-alegység vagy annak funkcionális származéka, azzal jellemezve, hogy az LFA-1 alfa-alegység képes a sejt-felületén lévő molekulához kötődni.

3. A 2. igénypont szerinti LFA-1 alfa-alegység azzal jellemezve, hogy a sejt felületén lévő molekula ICAM-1 vagy az LFA-1 más természetes liganduma.

4. Az 1. igénypont szerinti LFA-1 alfa-alegység azzal jellemezve, hogy a molekula képes az LFA-1 béta alegységhez kapcsolódva létrehozni az LFA-1 heterodimert.

5. A 4. igénypont szerinti LFA-1 alfa-alegység, azzal jellemezve, hogy a heterodimer képes az ICAM-1 vagy az LFA-1 más természetes ligandumának megkötésére.

6. A 2. igénypont szerinti LFA-1 alfa-alegység, azzal jellemezve, hogy a legalább még egy polipeptidet tartalmaz a következő csoportból:

- a. P-P-R-A-G-R-H;
- b. I-I-T-D-G-E-A;

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

7. A 2. igénypont szerinti LFA-1 alfa-al-egység funkcionális származéka, azzal jellemezve, hogy a funkcionális származék az LFA-1 alfa-alegység egy fragmentje.

8. A 2. igénypont szerinti LFA-1 alfa-alegység funkcionális származéka, azzal jellemezve, hogy a funkcionális származék az LFA-1 alfa-alegység egy variánsa.

9. A 2. igénypont szerinti LFA-1 alfa-alegység funkcionális származéka, azzal jellemezve, hogy a funkcionális származék az LFA-1 alfa-alegység egy analógja.

10. A 2. igénypont szerinti LFA-1 alfa-al-egység funkcionális származéka, azzal jellemezve, hogy a funkcionális származék az LFA-1 alfa-alegység egy kémiai

származéka.

11. Rekombináns DNS molekula, azzal jellemezve, hogy az LFA-1 alfa-alegységet vagy funkcionális származékát expresszálja.

12. A 11.igénypont szerinti DNS-molekula, azzal jellemezve, hogy az LFA-1 alfa-alegység vagy funkcionális származéka legalább egy polipeptidet tartalmaz a következő csoportból:

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

13. Eljárás gyulladás kezelésére emlősben, mely a specifikus védekezési rendszer válaszából származik, azzal jellemezve, hogy az ilyen kezelést igénylő alanynak gyulladáscsökkentő anyagot adunk olyan mennyiségben, hogy elnyomja a gyulladást, és az említett gyulladáscsökkentőt a következő csoportból választjuk: LFA-1 alfa-alegység; és az LFA-1 alfa-alegység funkcionális származéka.

14. A 13. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy még az LFA-1 béta-alegységet is, vagy a béta-alegység funkcionális származékát is adagoljuk.

15. A 14. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az LFA-1 alfa-alegységet rekombináns nukleinsav-molekula expressziójával állítjuk elő, és az LFA-1 alfa-alegység az LFA-1 béta-alegységgel asszociálódva LFA-1 heterodimer keletkezik.

16. A 13. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a gyulladás megkezdődése előtt beadjuk.

17. A 13. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a gyulladás-csökkentő anyagot enterális vagy parenterális úton adjuk be.

18. A 17. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a parenterális ut lehet intramuszku-

lárís, intravénás és szubkután.

19. A 13. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a gyulladás egy késleltetett típusu túlérzékenységi reakció.

20. A 13. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a gyulladás egy pszoriázis szimptóma.

21. A 13. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a gyulladás egy autoimmun betegség szimptóma.

22. A 21. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az autoimmun betegség lehet Reynaud's szindróma, autoimmun tiroiditisz, EAE, szklerózis multiplex, reumatoid artritisz és lupus eritematosus.

23. A 13. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a gyulladás átültetett szerv kilökődésére adott válasz.

24. A 13. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a gyulladás szövetátültetés kilökődésére adott válasz.

25. A 13. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a gyulladás graft versus host betegségre adott válasz.

26. Eljárás hematopoietikus tumor sejtek, amely sejtek az LFA-1 család egy funkcionális tagját igénylik a vándorláshoz, metasztázisának elnyomására, azzal jellemezve, hogy az ilyen kezelésre szoruló betegnek egy gyulladáscsökkentő anyagból a metasztázis elnyomásához elegendő mennyiséget adunk, a gyulladáscsökkentő anyag lehet LFA-1 alfa-alegység, valamint az LFA-1 alfa-alegységnek egy funkcionális származéka.

27. Eljárás az LFA-1 alfa-alegységet expresszáló tumorsejtek növekedésének elnyomására, azzal jellemezve, hogy az ilyen kezelésre szoruló betegnek az említett növekedés elnyomásához elegendő mennyiségű toxint adunk, az említett toxin lehet az LFA-1 alfa-alegység toxin-származéka, vagy az LFA-1 alfa-alegység egy tagjának toxin-derivatizált funkcionális származéka.

28. Eljárás a feltehetően gyulladással rendelkező emlős alanyban a speciális védelmi rendszer válaszából eredő gyulladás jelenlétének és helyének diagnosztizálására, azzal jellemezve, hogy

- (a) az említett alanyban az ICAM-1-et vagy az LFA-1 más természetes ligandumát expresszáló sejt azonosítására alkalmas, detektálhatóan jelölt LFA-1 alfa-alegységet tartalmazó készítményt adunk, és

- (b) detektáljuk az említett LFA-1 alfa-al-egységet.

29. Eljárás a feltehetően gyulladással rendelkező emlős alanyban a specifikus védelmi rendszer válaszból eredő gyulladás jelenlétének és helyének diagnosztizálására, azzal jellemezve, hogy:

- (a) az említett alanyban egy szövetmintáját az LFA-1 alfa-alegység DNS szekvenciájához, valamint az LFA-1 alfa-alegység génjének mRNS szekvenciájához kötődni képes nukleinsav molekulát tartalmazó készítménnyel inkubáljuk, mikoris az említett kapcsolódás képes az ICAM-1-et vagy az LFA-1 más természetes ligandumát expresszáló sejt azonosítására, és
- (b) kimutatjuk, az említett nukleinsav molekulát.

30. A 29. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az említett nukleinsav molekula az alábbi polipeptidek közül kódol legalább egyet:

- a. P-P-R-A-G-R-H;
b. I-I-T-D-G-E-A;
c. D-W-A-G-G-F-L;

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

31. Eljárás a feltehetően gyulladással rendelkező emlős alanyban a specifikus védelmi rendszer válaszából eredő gyulladás jelenlétének és helyének diagnosztizálására, azzal jellemezve, hogy:

- (a) az említett alany szövetmintáját az ICAM-1-et vagy az LFA-1 más természetes ligandumát expresszáló sejt azonosítására alkalmas, detektálhatóan jelölt LFA-1 alfa-alegységet tartalmazó készítménnyel inkubáljuk, és
- (b) detektáljuk az említett LFA-1 alfa-alegységet.

32. A 31. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az említett LFA-1 alfa-alegység az említett szövetmintában az ICAM-1-hez kapcsolódik.

33. Eljárás ICAM-1-et, vagy az LFA-1 más természetes ligandumát expresszázó tumorsejt jelenlétének és helyének diagnosztizálására ilyen sejteket feltehetően tartalmazó alanyban, azzal jellemezve, hogy

(a) az említett alanyban az említett ICAM-1-hez vagy az LFA-1 más természetes ligandumához kapcsolódni képes, detektálhatóan jelölt kötő-ligandumot tartalmazó készítményt adunk, az említett ligandum lehet az LFA-1 alfa-alegység, valamint az LFA-1 alfa-alegység funkcionális származéka, és

(b) kimutatjuk az említett kötő-ligandumot.

34. Eljárás ICAM-1-et, vagy az LFA-1 más természetes ligandumát expresszázó tumorsejt jelenlétének és helyének diagnosztizálására ilyen sejteket feltehetően tartalmazó alanyban, azzal jellemezve, hogy:

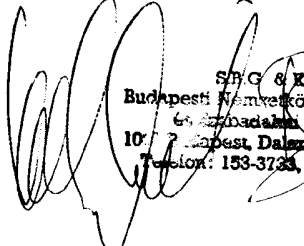
(a) az említett alanyban a szövetmintáját az említett ICAM-1-hez, vagy az LFA-1 más természetes ligandumához kapcsolódni képes detektálhatóan jelzett kötőligandumot tartalmazó készítménnyel inkubáljuk, az említett

ligandum lehet az LFA-1 alfa-alegysége és az LFA-1 alfa-alegység funkcionális származéka, és

- (b) az említett szövetmintában lévő említett ICAM-1-hez kötődő említett kötőligandumot ki-mutatjuk.

35. Eljárás vírusfertőzés kezelésére, azzal jelle-mezve, hogy az ilyen kezelésre szoruló betegnek az LFA-1 alfa-alegységet, vagy annak funkcionális származékát tar-talmazó készítményt adjuk hatásos mennyiségben.

A meghatalmazott


S.N.G. & K.
Budapesti Nemzetközi Ügyvédi
és Szabadalmi Iroda
1072 Budapest, Dalmáczy u. 10.
Telefon: 153-3733, 131-4300

Földes + Pálvadász

Földes

h263/87

37010/89

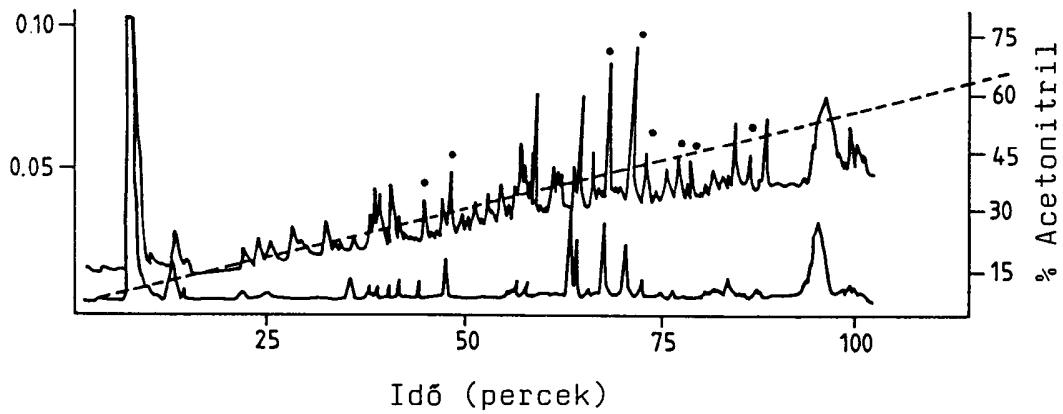
50.093/BE

B/1

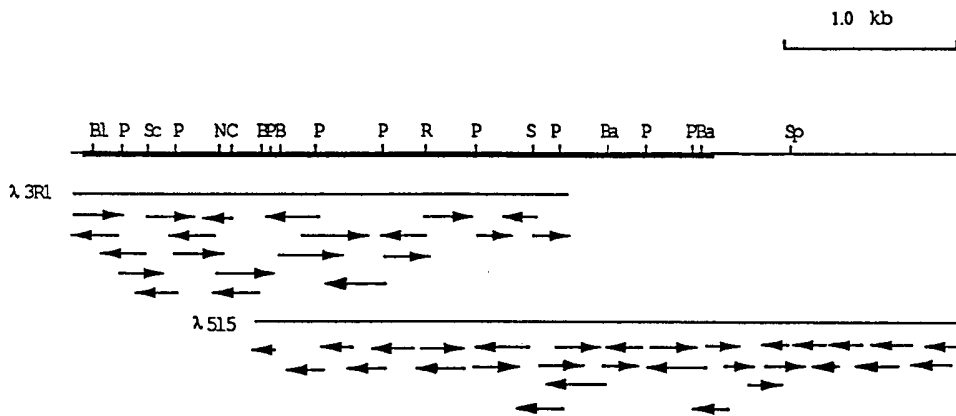
KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

- 53673 -

1. ÁBRA



2. ÁBRA



SBG & K.
 Budapest Nemzetközi Ügyvédi
 és Szakértői Iroda
 106 Budapest, Dalgafőház u. 10.
 Telefon: 353-3734, 131-4309

4. ÁBRA

Környező konszenzus szekvencia (LFA-1): YFGYSV-----LAVGAP

Környező konszenzus szekvencia (integrins): SYFG-SV-----LVVVGAP

I	7	G	A	R	S	F	S	P	P	R	A	G	R	H	F	G	Y	R	V	L	O	V	-----	V	I	V	G	A	P	G	E	-	G	N	S	T	G	S	-	L	Y	Q	C	Q	S	G	T	G	H	54															
II	57	P	V	T	L	R	G	S	N	Y	T	S	K	Y	L	G	-	M	T	L	A	T	D	-	P	T	D	G	-	S	I	L	A	C	D	-	P	G	L	-	S	R	T	C	D	O	N	T	Y	L	S	G	-	L	C	Y	L	L	107						
III	314	K	Q	D	L	T	S	F	N	M	E	L	S	S	G	I	S	A	D	L	S	-	-	-	-	R	G	H	A	V	V	G	A	V	G	A	K	D	W	A	-	-	-	-	G	F	L	D	L	K	A	D	L	Q	D	D	T	F	I	G	366				
IV	367	N	E	P	L	J	P	-	E	V	R	A	C	Y	L	G	Y	T	T	W	I	P	S	R	Q	-	-	K	T	S	L	L	A	S	G	A	P	R	-	Y	Q	H	M	G	R	V	L	L	F	Q	E	P	Q	G	G	H	W	S	421						
V	422	Q	V	Q	T	I	H	G	T	Q	I	G	S	I	F	G	G	E	L	C	G	V	L	D	V	D	O	D	G	E	T	E	L	L	I	G	A	P	L	F	Y	G	E	Q	R	G	R	V	F	I	Y	Q	R	R	Q	L	G	F	E	E	V	S	483		
VI	484	E	L	O	G	D	P	G	Y	P	L	G	R	I	F	G	E	A	T	A	L	T	I	N	G	D	G	L	V	D	-	V	A	V	G	A	P	L	E	Q	-	-	-	-	G	A	V	Y	L	I	F	N	G	R	H	G	L	S	P	Q	P	S	Q	542	
VII	543	R	I	E	G	T	Q	V	L	S	G	I	Q	W	F	G	R	S	I	H	G	V	K	D	L	E	G	D	G	L	A	D	-	V	A	V	G	A	E	S	-	Q	M	I	V	L	S	R	P	V	V	D	M	V	T	L	M	S	F	S	P	A	E	I	604

Kétértékű kationkötő hely konszenzus D-DGDG-ID--E

Kétértékű kation koordinációs helyek +X +Y +Z -Y -X -Z

Kétértékű kation-kötő helyek

Parvalbumin CD	51	DEDKSGFIEEDE
	90	DSDDGKIGVDE
Troponin C	27	DADGGDISVKE
	63	DEDSGTIDFEE
	103	DRNADGYIDPEE
	139	DKNNDGRIDFDE
Galaktóz-kötő fehérje	134	DLNKDGGQIQ-IE*

S.E.G. & K.
 Budapesti Nemzetközi Ügyvédi
 és Szakirodalmi Iroda
 1071 Budapest, Deákminéró 107
 Telefon: 183 3733, 181-9200



5 . B . Á B R A

855
868
863
705
699
708

855
868
863
705
699
708

936
952
948
797
793
802

936
952
948
797
793
802

988
1007
1003
880
874
870

988
1007
1003
880
874
870

1069
1095
1091
970
966
960

1145
1137
1144
1008
1018
1008

1069
1095
1091
970
966
960

1145
1137
1144
1008
1018
1008

LFA1
MAC1
P150
I1B
VNR
FNR

LFA1
MAC1
P150
I1B
VNR
FNR

LFA1
MAC1
P150
I1B
VNR
FNR

LFA1
MAC1
P150
I1B
VNR
FNR

LFA1
MAC1
P150
I1B
VNR
FNR

LFA1
MAC1
P150
I1B
VNR
FNR

[Handwritten signature]

S.I.G & K.
Budapesti Nemzetközi Ügyvédi
és Szakértői Iroda
106 Budapest, Dalmatinák u. 10.
Telefon: 183-3733, 131-4800

6. ÁBRA

LFA1 130 VDLVFLDGGSSMLQDEFFQKILDFMKDVA--KRLSNTSYDFAVQFSTISYKTEFFLSDYV
 MAC1 133 SDIAPLIDGSGSITIPHLFRMKKEFVSTVMEQLKKSRT--DFSLDQISZLFRHFTFKRFQ
 P150 131 QDIIVFLIDGSGSISSRNFATMMNFVRAMISQFQRPST--DFSLDQISZLFRHFTFKRFQ
 VWFA1 513 LDLVFLIDGSSNISEAEFEVLKAFVVDKRLRI-SQKWVR--DAAVVEYHDGSHAYIGLK
 VWFA2 734 LDVAFVLEGSDDKIGEALEFNRKKEFMEQLQRMDV-GQDSIH--VTVLQYSYMTVEYVFFS
 VWFA3 927 LDVILIDGSSSFPASYFDEMKSFAKAFISKANIGPRLTQ--VSVLQYGSITTIDVPWN
 244 MNIYLVLDGSSISIGASNFTGAKKCLVNLIEKVASYGVKPRYGLVTYATNPNINWVKVSEAD
 CMP2 195 LDLVFLIDGSSKSVRFENFELVKKETINQ-IVESLEV--SEKQVGLVQYSSSV-RQEFPL
 CMP1 1 -----VGVINYASAV-KNEFSL

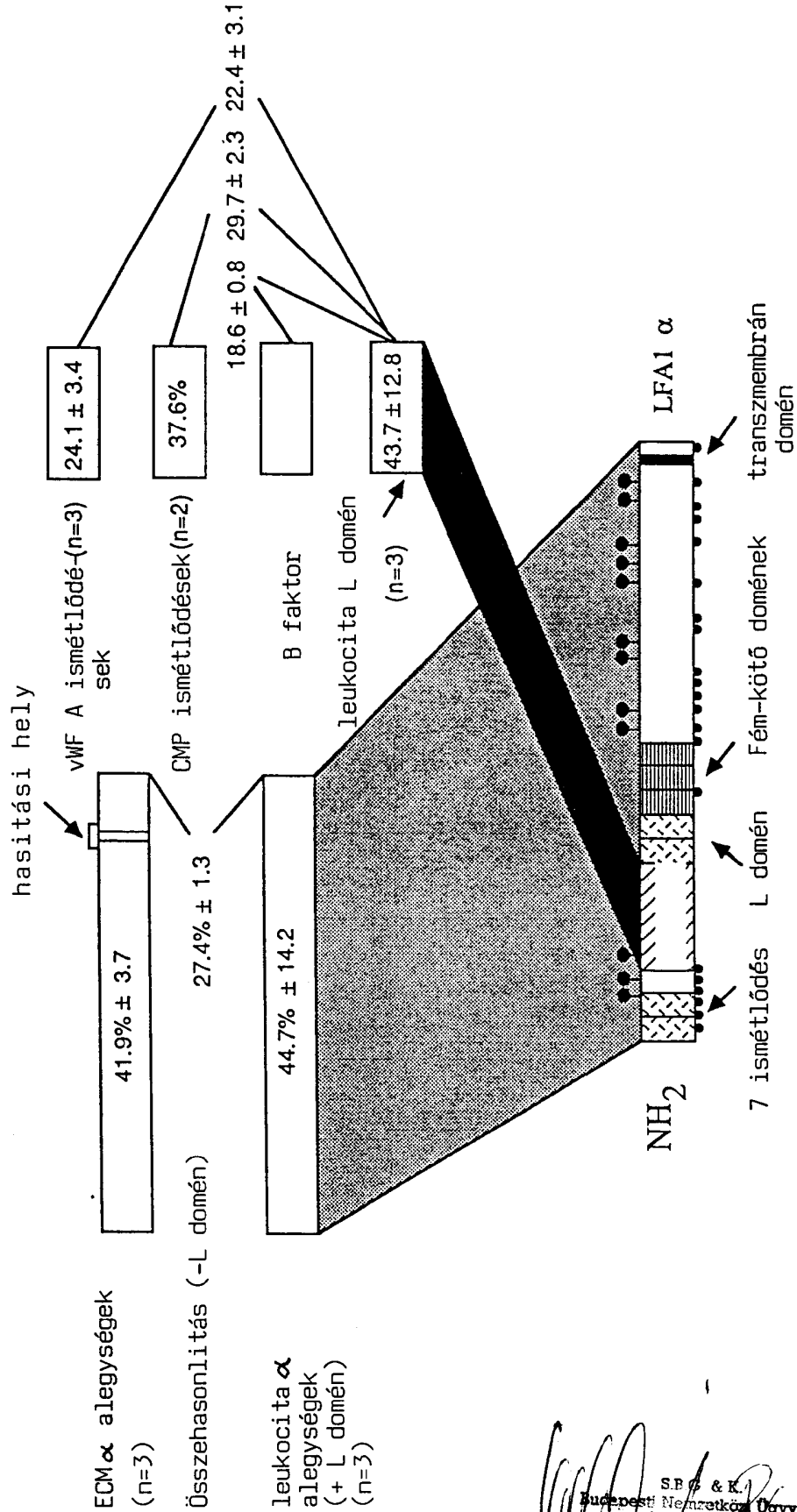
LFA1 KAKDPDALLRHKHMLL-----TNTFGAT-NIVATEVFREELGARPDATKVL-----U
 MAC1 NNFMPRLQKPIITQLGR-----THTATGII-NVVPELFNITNGARKNAFKITL-----V
 P150 RTSNPLSLDASVHLQGGF-----THTATAIQ-NVVHRLFHASYGARRDATKIL-----U
 VWFA1 DRFRPSELRRIASQVKYAG-----SQVSTSEVLKYLFLQIFSKILRFEASRIA-----LL
 VWFA2 EAQSKGDIQRVRREIRYQGGNR-----TNTGLAL-RYLSDSHSELVSCDRECAPNLV-----Y
 VWFA3 VVPEKAHLSLQDVQREGGSPQIGDALGFAN-RYLTSE-----GARFSASGAV-----VI
 CMP2 SS-NAGVTVRQLNEINVEDHKLKSGTNTKALQAVYSMHSWDDVPEQWNRTRH-----VII
 1 GQFKNKDIKAA-VKKMAYMEG-----TNTGQAL-KVLVDSFISIAMGAREVVPKRVG-----I
 CMP1 KTHQKAE-LQAVARIEPLSTG-----TNTGLAL-QFAISRAESDTEGARLRSFNTNKVAI-----

LFA1 IITDGE-ATDS-ENIDA--AKD--ITRYIIGIGKHFQIKESQET-DHKFASKPASEFVK
 MAC1 VITDGEKFGDFLYEDVPEADREGVIRVMIGQDAPFSEKSRQE-LNTIASKPFRDHVF
 P150 VITDGRKREGDLDYREVIPMAAAGIIRYAIQVGLMQRNRSWKE-LNDIASKPQSEHIF
 VWFA1 LMASQEPQRMSRNFVRYVQGLNKKKVIIVIPVIGPPHANLQIR-----LIERQA-PENKAFV
 VWFA2 MVTGNPASDEYKRL-PGDIQ-----VVPIGVGPPNANVQE-----LERIGW-PNAP
 VWFA3 LVTLV-SVDSVDAADARS---NRVTVFFIGIDRYDAAQ-----LRIILG-PAGDSNV
 CMP2 LMTDGLHNMGGDPITVDE-----ITDILLIIGNDRKNPR---EDYLDVYVFGVGP-LGN
 1 VFTDGRSQDYIT---DNAKKAKLGFRRFAVGVNAV-----EDELREIASEVVAEHYF
 CMP1 VVITDGRPQDGVQ-VSRRARQASTEIF---AIGVGRVD-----NHTLRQIASEPLDDHD

LFA1 IITD-FAKLLFTELOKKIIVIEGTSKQDLTSPNELLSSSI 327
 MAC1 QVNN-FAALNTIQNQLREKIFAIEGTQTGSSSFEHEMSQE 337
 P150 KVED-FAALKIQNQLREKIFAIEGTETTSSSSFELEMAQE 335
 VWFA1 LSS-VLE-LEQRDELVSYLCDLAPAPPPTLFFPAQVTVGP 717
 VWFA2 IITDQDEITLPREAPLQVLRQ-CSEGLDIPPLSPAPD 922
 VWFA3 VKLQRIEDLPTMVI-LGN-----SFLIKLCSGFVRI 1115
 QVNNALASK-KDNEQHVFK-VKDMENLELVFYQMIDESQSL 450
 CMP2 YTA-DFRTISNIGKLLQMKIIVEEDPCECKSVKFTKV 393
 CMP1 YVESYSVIERLTHKGFDEAFVVSDLCATGDHDCEQICI 172

S.B.G. & K.
 Budapesti Nemzetközi Ügyvédi
 és Számviteli Iroda
 1051 Budapest, Dalmatinás u. 10.
 Telefon: 153-3733, 151-4200

7. ÁBRA



S.P. & K.
 Budapesti Nemzetközi Ügyvédi
 és Szabadalmi Iroda
 Budapest, Dalmányi u. 10.
 Tel.: 153-8733, 131-4800