

**Eljárások bőr rendellenességeinek kezelésére vagy prevenciójára CD2-
kötőágens alkalmazásával**

5

KIVONAT

10 A találmány tárgyát képezi CD2-kötőágens, például CD2/LFA-3-kölcsönhatás inhibitorának (például LFA-3/IgG fúziós polipeptid) alkalmazása kiegészítő ágenssel, például UVB-
besugárzással kombinációban gyulladásos vagy autoimmun rendellenesség, például pszoriázis
(pikkelysömör), atópiás dermatitisz vagy más olyan epidermális vagy dermális rendellenességek
kezelésére, amelyeket abnormális T-sejt-aktivitás vagy proliferáció jellemez.

jellemző a bna ϕ
2022. április

Eljárások bőr rendellenességeinek kezelésére vagy prevenciójára CD2-kötőágensek alkalmazásával

A találmány tárgyát képezi CD2-kötőágens, például CD2/LFA-3-kölcsönhatás (például LFA-3/IgG fúziós polipeptid) inhibitorának alkalmazása egy kiegészítő ágenssel, például UVB-besugárzással kombinációban egy rendellenesség, például pszoriázis (pikkelysömör) vagy más olyan epidermális vagy dermális rendellenességek kezelésére, amelyeket abnormális T-sejt-aktivitás vagy proliferáció jellemez.

Ismeretes, hogy a bőr rendellenességei, például pszoriázis, ekcéma, mycosis fungoides, aktinikus keratózis és lichen planus az Egyesült Államok lakosságának 1-2 %-át sújtja, évente 150.000-200.000 új eset fordul elő [J. Invest. Dermatol. 73, 402-13 (1979)]. Ezek közül számos bőr-rendellenességet jellemez fokozott T-sejt-aktiválódás és abnormális antigénbemutatás a dermiszben és az epidermiszben [Cooper, "Immunoregulation in the Skin", "Cutaneous Lymphoma, Curr. Probl. Dermatol.", szerk. van Vloten és mtsai., 19, 69-80., 73., 74. és 76. old. (1990)]. Például kontakt allergiás dermatitisz esetén megfigyelték intrakután T-sejtek aktiválódását. Ismeretes, hogy atópiás dermatitiszben szenvedő páciensek bőre megnövekedett számú Langerhans-sejtet tartalmaz [Cooper, "Immunoregulation in the Skin", "Cutaneous Lymphoma, Curr. Probl. Dermatol.", szerk. van Vloten és mtsai., 19, 74. old. (1990)]. Pszoriázisos bőrben megnövekedett számú antigénbemutató sejt van, amelyek között egyaránt vannak Langerhans-sejtes és nem-Langerhans-sejtes, II. osztályú MHC-antigént bemutató sejtek [Cooper, "Immunoregulation in the Skin", "Cutaneous Lymphoma, Curr. Probl. Dermatol.", szerk. van Vloten és mtsai., 19, 75. old. (1990)].

Kután T-sejtes limfómát malignus, klonális T-sejt-populációk expanziója jellemzi a dermisben és az epidermisben. Kórosan elváltozott epidermális sejtek megnövekedett számú CD1⁺DR⁺-antigénbemutató sejteket tartalmaznak [Cooper, "Immunoregulation in the Skin", "Cutaneous Lymphoma, Curr. Probl. Dermatol.", szerk. van Vloten és mtsai., 19, 76-77. old. (1990)].

A fentebb említett bőrbetegségek esetén alkalmazott, jelenleg ismert terápiák limitáltak. Szteroidok vagy ciklosporin-A általánosan alkalmazott pszoriázis, lichen planus, urticaria (csalánkiütés), atópiás dermatitisz, UV-károsodás, pyoderma gangrenosis (üszkös bõrgennyedés), vitiligo (foltos festékhány), okuláris cicatricialis pemfigoid, alopecia areata (foltos hajhullás) valamint allergiás és irritáló kontakt dermatitisz és kután T-sejtes limfóma kezelésében.

Továbbá, az említett néhány bőr-rendellenesség esetén különböző terápiákat alkalmaznak, például retinoidokat, PUVA-t, nitrogén-mustárt, interferont, kemoterápiát, metotrexátot, fényterápiát (például UV-fényt és PUVA-t), antibiotikumokat és antihisztaminokat [általánosságban lásd: Fitzpatrick, "Dermatology in General Medicine", 3. kiadás, McGraw Hill (1987)]. UV-fényt alkalmazó terápiákban, UVA- és UVB-terápiában egyaránt, a bőrt 320-400 nm-es (UVA-sugárzás) vagy 290-320 nm-es (UVB-sugárzás) UV-sugárzás hatásának teszik ki. A PUVA-terápia egy fotokemoterápia-forma, amelyben pszoralént vagy pszoralén-alapú vegyületet többször alkalmaznak topikálisan a bőr érintett régióján, amelyet azután UVA-sugárzás hatásának tesznek ki. Egy másik, proliferatív bőrbetegségek, különösen pszoriázis és mycosis fungoides kezelésére szolgáló módszerben fotodinamikus terápiát (PDT) alkalmaznak.

Az ilyen terápiáknak ismert mellékhatásai vannak. Ciklosporin-A legismertebb hátránya immunszuppresszióra visszavezethető toxicitás, valamint vese és idegi toxicitás. Szteroidok jól ismert mellékhatása például Cushing-szindróma indukálása. A fentebb említett többi terápia mellékhatása lehet például bőrrák, csontvelő és szervi toxicitások, inszalag elmeszesedés (kalcifikáció), májfibrózis és más rendellenességek. Fényterápia esetén, bőrbetegségek hosszabb kezelése ilyen típusú terápiákkal jelentős akut és krónikus mellékhatásokat eredményezhet, például eritémát, pruritus (bőrviszketés), bőrrákot és fény-indukált, krónikus bőrkárosodást [Stern és mtsai., N.E. of Med. 300, 809-812 (1979)].

Ennek megfelelően, igény van javított terápiás gyógymódokra olyan bőrbetegségek prevenciójára és kezelésére, amelyekben fokozott T-sejt-aktiválódás és abnormális antigénbe-mutatás tapasztalható.

A találmány szerinti megoldás részben arra a felismerésre alapul, hogy CD2-kötőagens, például LFA-3/IgG fúziós polipeptid, és egy kiegészítő ágens, például UVB-besugárzás, nagymértékben hatékony pszoriázisos kóros elváltozások kezelésére. A kiegészítő ágens egy olyan ágens, amely az alábbi tulajdonságok közül eggyel vagy többel rendelkezik: (i) csökkenti interferon- γ (IFN- γ) termelését és/vagy mennyiségeit; (ii) csökkenti a T-sejtek, különösen a CD69⁺-T-sejtek számát az érintett szövetben; (iii) csökkenti CD40-ligandum (CD40L, azaz CD154) expressziójának mértékét; vagy (iv) növeli a T-sejt-pusztulást, például apoptózis mértékét. Bár nem kívánunk ragaszkodni semmilyen elmélethez, feltételezzük, hogy a kezelés Th1-típusú sejtek számának és aktivitásának csökkentésén keresztül hat pszoriázisos kóros elváltozásokban. Ennek megfelelően, a találmány tárgyát képezik eljárások és készítmények abnormális T-sejt-aktivitással vagy proliferációval jellemzett, epidermális vagy dermális rendellenességek kezelésére vagy prevenciójára.

A találmány tárgyát képezi általánosságban eljárás bőr-rendellenesség, például abnormális (például megnövekedett mértékű) T-sejt-, például Th1-típusú T-sejt-aktivitással vagy proliferációval jellemzett, epidermális vagy dermális rendellenesség kezelésére vagy prevenciójára egy alanyban. Az eljárásban:

- 5 Beadunk az alanynak CD2-kötőágenst, például LFA-3-kötőágenst, vagy CD2/LFA-3-kölcsönhatás inhibitorát, például CD2-kötőágenst egy kiegészítő ágenssel kombinációban, például olyan ágenssel, amely az alábbi tulajdonságok közül eggyel vagy többel rendelkezik: (i) csökkenti interferon- γ (IFN- γ) termelését és/vagy mennyiségeit; (ii) csökkenti a T-sejtek, például memória effektor T-limfociták számát (például CD8/CD45 RO+ sejtek vagy CD4/CD45 RO+ sejtek), különösen a CD69⁺-T-sejtek számát az érintett szövetben; (iii) csökkenti CD40-ligandum (CD40L) expressziójának mértékét; vagy (iv) növeli a T-sejt-pusztulást, például apoptózis mértékét, ezzel kezeljük vagy megelőzzük a bőr-rendellenességet.
- 10

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a bőrbetegséget az alábbiak közül egy vagy több jellemzi: (i) megnövekedett mennyiségű IFN- γ , például fokozott T-sejtes IFN- γ -termelés; (ii) T-sejt-populációk, például CD3-, CD4-, CD8-, CD45- és/vagy CD69-pozitív T-sejtek megnövekedett mennyiségei; (iii) fokozott CD40-ligandum-expresszió; vagy (iii) keratinocita hiperproliferáció.

15

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a bőr-rendellenesség krónikus gyulladásos rendellenesség, például pszoriázis.

20 A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a a bőr-rendellenesség autoimmun rendellenesség, például krónikus autoimmun rendellenesség, például pszoriázis.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a bőr-rendellenesség az alábbiak közül egy vagy több: pszoriázis, atópiás dermatitisz, kután T-sejtes limfóma, például mycosis fungoides, allergiás és irritáló kontakt dermatitisz, vitiligó (foltos festékhány), okuláris cicatricialis pemfigoid vagy urticaria (csalánkiütés). A bőr-rendellenesség előnyösen pszoriázis, atópiás dermatitisz, allergiás dermatitisz vagy alopecia areata. A legelőnyösebben a rendellenesség pszoriázis.

25

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a CD2-kötőágens a CD2/LFA-3-kölcsönhatás inhibitora, például anti-CD2-ellenanyag-homológ; LFA-3 szolubilis CD2-kötő fragmense; LFA-3 CD2-kötő fragmense egy másik molekula-részlethez, például egy plazmafehérje egészéhez vagy részletéhez, például egy immunoglobulin [például IgG (például IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, IgA (például IgA1, IgA2), IgD és IgE, de előnyösen IgG] vagy fragmensének (például immunoglobulin konstans régió) egészéhez vagy részletéhez, szérum

30

albuminhoz (például humán szérum albuminhoz) vagy szintetikus hidrofíli polimerhez (például pegilálással PEG-hez) kapcsolva, például fuzionálva; CD2-kötő kisméretű molekula vagy peptidmimetikum; például fág-„display” vagy peptideket tartalmazó kombinatorikus könyvtár alkalmazásával azonosított, CD2-kötő polipeptid-fragmens.

5 A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a CD2-kötőagens LFA-3 CD2-kötő fragmense, amely fuzionálva van immunoglobulin kapocsrégiójának és nehéz lánc konstans régiójának, vagy ezek részletének egészéhez vagy részletéhez (például LFA-3/IgG fúziós polipeptid, például olyan nukleotid- és aminosav-szekvenciával rendelkező, LFA-3/IgG fúziós polipeptid, ami 7. és 8. azonosítószámú szekvenciaként van bemutatva a 6,162,432. számú
10 USA-beli szabadalmi leírásban, melyet a kitanítás részének tekintünk). Még egy másik előnyös LFA-3/IgG fúziós fehérje az 1. ábrán bemutatott aminosav-szekvenciával rendelkezik, és ugyanezen az ábrán bemutatott nukleotidszekvencia kódolja.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a CD2-kötőagens szolubilis LFA3-polipeptid, például a 6,162,432. számú USA-beli szabadalmi leírásban (melyet a kitanítás részének tekintünk) bemutatott, 3. azonosítószámú szekvenciával rendelkező LFA-3-szekvencia 1-92., 1-80., 50-65., 20-80. aminosavai közül választott polipeptid.
15

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a CD-kötőagens egy anti-CD-ellenanyag-homológ, monoklonális anti-CD2-ellenanyag (például rekombináns, például kiméra vagy humanizált anti-CD2-ellenanyag) vagy antigénkötő fragmense (például Fab-fragmens, Fab'-fragmens, F(ab')2-fragmens, F(v)-fragmens, vagy anti-CD2-ellenanyag-homológ intakt immunoglobulin nehéz lánc).
20

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a CD2-kötőagens tartalmaz egy első molekularészletet, amely CD2-t képes kötni, és egy második molekularészletet, amely effektor sejteket képes toborozni. Az első molekularészlet lehet LFA-3 CD2-kötő fragmense, például a leírás szerinti fragmense, vagy egy ellenanyag-homológ, amely CD2-t képes kötni, például a leírás szerinti ellenanyag-homológ. A második molekularészlet lehet egy polipeptid, amely effektor sejteket képes toborozni, például természetes killer-sejteket (ölősejteket) (NK). A második részlet előnyösen lehet: immunoglobulin konstans régiójának fragmense, például egy leírás szerinti immunoglobulin-fragmens; vagy egy Fc-receptort (például FcγRI vagy FcγRII) kötni képes ellenanyag-homológ.
25
30

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a CD2-kötőagens kiméra, például fúziós polipeptid, amely LFA-3 CD2-kötő fragmensét és effektor sejteket toborozni képes polipeptidet tartalmaz. A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a kiméra vagy fú-

ziós polipeptid LFA-3 CD2-kötő fragmensét, például a leírás szerinti fragmensét, vagy CD2-t kötni képes ellenanyag-homológot, például a leírás szerinti ellenanyag-homológot, és immunoglobulin konstans régiójának fragmensét, például egy leírás szerinti immunoglobulin-fragmenst; vagy egy Fc-receptort kötni képes ellenanyag-homológot tartalmaz.

5 A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a CD2/LFA-3-kölcsönhatás inhibitora LFA-3-kötő ágens, például anti-LFA-3-ellenanyag-homológ; CD2 szolubilis LFA-3-at kötő fragmense; CD2 LFA-3-kötő fragmense egy másik molekula-részlethez, például egy plazmafehérjéhez, például egy immunoglobulinhoz [például IgG (például IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, IgA (például IgA1, IgA2), IgD és IgE, de előnyösen IgG] vagy fragmenséhez
10 (például immunoglobulin konstans régióhoz), szérum albuminhoz (például humán szérum albuminhoz) fuzionálva vagy pegilálva; LFA-3-kötő kisméretű molekula vagy peptidmimetikum; például fág-„display” vagy peptideket tartalmazó kombinatorikus könyvtár alkalmazásával azonosított, LFA-3-kötő polipeptid-fragmens.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, az LFA-3-kötőágens egy anti-
15 LFA-3-ellenanyag-homológ, monoklonális anti-LFA-3-ellenanyag (például rekombináns, például kiméra vagy humanizált anti-LFA-3-ellenanyag) vagy antigénkötő fragmense (például Fab-fragmens, Fab'-fragmens, F(ab')₂-fragmens, F(v)-fragmens, vagy anti-LFA-3-ellenanyag-homológ intakt immunoglobulin nehéz lánc).

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a kiegészítő ágens olyan ágens,
20 amely közvetlenül vagy közvetve az alábbiak közül egyet vagy többet okoz: (i) csökkenti interferon- γ (IFN- γ) termelését és/vagy mennyiségeit; (ii) csökkenti a T-sejtek, például memória effektor T-limfociták számát (például CD8/CD45 RO⁺ sejtek vagy CD4/CD45 RO⁺ sejtek), különösen a CD69⁺-T-sejtek számát az érintett szövetben; (iii) csökkenti CD40-ligandum (CD40L) expressziójának mértékét; vagy (iv) növeli a T-sejt-pusztulást, például apoptózis
25 mértékét. Ilyen hatásokat eredményezhet az alábbiak közül egy vagy több: T-sejtek, például memória effektor T-limfociták (például CD8/CD45 RO⁺ sejtek vagy CD4/CD45 RO⁺ sejtek) számának vagy aktivitásának csökkenése; IFN- γ -termelő immunsejtek (például T-sejtek) számának vagy aktivitásának csökkenése; IFN- γ lekötése vagy más módon történő inaktiválása; sejtmediált (például effektor sejt-mediált) T-sejt-pusztulás (például IFN- γ -termelő immunsejtek
30 pusztulásának) indukálása. Kiegészítő ágens lehet például: fényterápia (például UVA, UVB vagy PUVA); metotrexát; retinoidok; ciklosporin; etretinát; citokin-inhibitor, például makrolaktám (például pimecrolimus); IFN- γ -kötő ágens, például anti-IFN γ -ellenanyag vagy

antigénkötő fragmense; IFN γ antagonistája, vagy IFN γ -receptor, például ellenanyag vagy antigénkötő fragmense, amely gátolja az IFN γ -receptor kölcsönhatását, kisméretű molekula vagy peptidmimetikum-inhibitor.

5 A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a kiegészítő ágens az alábbiak közül választjuk: UV-besugárzás, például UVA vagy UVB besugárzás, PUVA-besugárzás, metotrexát, retinoidok, ciklosporin, etretinát, makrolaktám (például tacrolimus, azaz FK506) vagy ascomycin-makrolaktám (például pimecrolimus), vagy ezek bármilyen kombinációja. Az előnyösen alkalmazott ágens UVB-besugárzás.

10 A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, az eljárás olyan lépést tartalmaz, amelyben az alanyban szimptomákat vagy citokin-mennyiségek, például IFN γ -mennyiségek, vagy immunsejt-populáció [például T-sejtek, például memória effektor T-limfociták (például CD8/CD45 RO⁺ sejtek vagy CD4/CD45 RO⁺ sejtek); IFN γ -termelő sejtek] változásait követjük. Az alanyban ezt kezelés előtt, kezelés alatt és azután követhetjük, hogy egy vagy több kezelési elemet alkalmaztunk. A követés eredményét felhasználhatjuk annak eldöntésére, hogy
15 szükséges-e további kezelés ugyanilyen ágensekkel, vagy további kezelés szükséges további ágensekkel. Általában a citokin-mennyiségek vagy kiválasztott immunsejtek [például T-sejtek, például memória effektor T-limfociták (például CD8/CD45 RO⁺ sejtek vagy CD4/CD45 RO⁺ sejtek); vagy IFN γ -termelő sejtek] számának csökkenése jelzi a rendellenesség javulását az alanyban.

20 A kezelést kombinálhatjuk még más ágensekkel is. Tehát, a találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, az eljárásban: beadunk az alanynak egy olyan ágens, amely T-sejt-receptorral társult kostimulátor szignált képes gátolni, például B7-CD28-, ICAM-LFA-1- vagy CD40-CD40L-kölcsönhatás inhibitorát, vagy ezek bármilyen kombinációját. Az ágens lehet bármilyen molekula (például ellenanyag vagy fragmense, szolubilis polipeptid, kisméretű
25 molekula vagy peptidmimetikum, amely képes zavarni a ligandum (például B7, ICAM, CD40) és a megfelelő „ellen”-ligandum (például CD28, LFA-1, CD40L) által kialakított kölcsönhatást. Az ágens előnyösen LFA-1-re vagy CD40L-re specifikus ellenanyag-homológ, például humanizált anti-LFA-1-ellenanyag.

30 A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, az eljárásban továbbá: beadunk az alanynak topikálisan alkalmazható ágens, például egy vagy több szteroidot, vitamint (például D-vitamint), kátrányt, antralint, makrolidot vagy makrolaktámot, például tacrolimust (FK506) vagy ascomycin-makrolaktámot (például pimecrolimus-t).

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, az alany emlősszervezet, például főemlős, előnyösen magasabb rendű főemlős, például ember. A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, az alany epidermális vagy dermális rendellenességben szenvedő páciens (például pszoriázis enyhe, mérsékelt vagy súlyos formájában szenved).

5 A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a bőr-rendellenesség epidermális, dermális vagy hipodermális szövetet sújt. A bőr-rendellenesség előnyösen epidermális szövetet sújt.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a CD2-kötőágenst és a kiegészítő ágenst egyidejűleg adjuk be. A találmány más előnyös megvalósítási módjai szerint, a CD2-
10 kötőágenst és a kiegészítő ágenst egymás után adjuk be, például először beadjuk a CD2-kötőágenst, azután a kiegészítő ágenst, vagy fordítva. A CD2-kötőágenst és a kiegészítő ágenst be lehet adni topikális terápiával kombinálva [amelyben például szteroidot, vitamint (például D-vitamint), kátrányt, antralint, makrolidot vagy makrolaktámot, például tacrolimust (FK506) vagy ascomycin-makrolaktámot (például pimecrolimus-t) adunk be].

15 A találmány más előnyös megvalósítási módja szerint, a CD2-kötőágenst és a kiegészítő ágenst megfelelő sorrendben adjuk be. Például CD2-kötőágens beadását követhetik megfelelő sorrendben alkalmazott topikális terápiák, például szteroid-terápia, azután vitaminkezelés (például D3-vitamin-kezelés), azután antralin. Topikális ágenseket bármilyen kombinációban és bármilyen sorrendben lehet alkalmazni.

20 A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a CD2-kötőágenst és a kiegészítő ágenst egymáshoz elegendően közel, például térben és időben közel adjuk be, így a kívánt hatás, például az IFN γ -mennyiségek csökkentése, vagy szimptómák csökkentése nagyobb mértékű, mint amit akkor figyelnénk meg, ha a kiegészítő ágenst CD2-kötőágens nélkül adnánk be, vagy a CD2-kötőágenst a kiegészítő ágens nélkül adnánk be.

25 A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a CD2-kötőágenst akkora időtartam alatt adjuk be, amely alatt az IFN γ mennyiségei lecsökkennek az IFN γ -csökkentő ágens hatására. Például a CD2-kötőágenst be lehet adni egy alanynak, pszoriázis enyhe formájában szenvedő páciensnek topikális terápiával egyidejűleg, előtte vagy utána, amelyben egy vagy több szteroidot, vitamint (például D-vitamint), kátrányt, antralint, makrolidot vagy makrolaktámot, például tacrolimust (FK506) vagy ascomycin-makrolaktámot (például pimecrolimus-t),
30 vagy ezek bármilyen kombinációját adjuk be. Olyan alanyoknak, akik például pszoriázis mérsékelt és erős formájában szenvedő pácienseknek, a CD2-kötőágenst sugárterápiával (például UVB-kezelés és/vagy PUVA) egyidejűleg, előtte vagy utána adhatjuk be. A találmány más elő-

nyös megvalósítási módjai szerint, a CD2-kötőágenst fényterápiával (például UVB-kezelés és/vagy PUVA) egyidejűleg, előtte vagy utána adhatjuk be, kombinációban egy vagy több retinoiddal, metotrexáttal vagy ciklosporinnal. A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, pszoriázis mérsékelt és erős formájában szenvedő pácienseket CD2-kötőágenssel bármely időpontban lehet kezelni az alábbiakat tartalmazó kezelési rendben: fényterápia és retinoidok, azt követően metotrexát, azt követően ciklosporin.

A találmány néhány előnyös megvalósítási módjai szerint, a CD2-kötőágenst szisztémásan adjuk be (például intravénásan, intramuszkulárisan, infúziós berendezéssel vagy szubkután). A találmány más előnyös megvalósítási módja szerint, a CD2-kötőágenst lokálisan adjuk be (például topikálisan) az érintett területre, például pszoriázisos elváltozáshoz.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a CD2-kötőágens LFA-3/IgG fúziós polipeptid, és szisztémásan adjuk be. A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, az LFA-3/IgG fúziós polipeptidet egy alanynak egyszer egy héten adjuk be tizenkét hetes terápiás kezelési időtartam alatt.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a kiegészítő ágenst lokálisan adjuk be, például fényhatást, például UVA-, UVB- vagy PUVA-sugárzást alkalmazunk. A találmány más előnyös megvalósítási módjai szerint, a kiegészítő ágenst (például metotrexátot, orálisan retinoidokat, ciklosporint, makrolaktámot, például tacrolimus-t vagy pimecrolimus-t) szisztémásan adjuk ki.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a kiegészítő ágens UVB, például ultraibolya fény 290-320 nm tartományban, előnyösebben közeli hullámhossz-tartományba eső UVB 311 nm-en.

A találmány tárgyát képezi a CD2-kötőágens és a kiegészítő ágens beadására szolgáló módszerek bármilyen kombinációja.

A CD2-kötőágenst és a kiegészítő ágenst beadhatjuk a betegség aktív szakasza alatt, vagy enyhülése alatt, vagy a kevésbé aktív szakasza alatt. A CD2-kötőágenst és a kiegészítő ágenst beadhatjuk kezelés előtt, kezeléssel egyszerre, kezelés után, vagy a betegség enyhülése alatt.

A találmány tárgyát képezi egy másik vonatkozásában eljárás pszoriázis kezelésére egy alanyban. Az eljárásban:

Az alanynak beadunk egy olyan fúziós polipeptidet, amely LFA-3 CD2-kötő fragmensét tartalmazza IgG konstans régiójának fragmenséhez fuzionálva, kombinációban akkora mennyiségű UVB-vel, amely interferon- γ -mennyiségeket képes csökkenteni az alany epi-

dermiszében, ezáltal kezeljük vagy megelőzzük a pszoriázist. Az itt bemutatott kombinációs kezelési eljárás előnyösen a betegség szignifikánsan fokozott mértékű enyhülését eredményezheti (akár teljes gyógyulást is) és/vagy szignifikánsan meghosszabbodott időtartam alatt enyhül vagy szűnik meg a betegség ahhoz viszonyítva, amit bármelyik ágenst egymagában alkalmazva elérnénk.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, az LFA-3 fragmense fuzionálva van immunoglobulin kapocsrégiójának és nehéz lánc konstans régiójának egészéhez vagy részletéhez, például egy LFA-3/IgG fúziós polipeptid, amely a 6,162,432. számú USA-beli szabadalmi leírásban (melyet a kitanítás részének tekintünk) bemutatott, 7. azonosítószámú nukleotidszekvenciával rendelkező nukleinsav kódol, és 8. azonosítószámú szekvenciával rendelkezik. Még egy másik előnyös LFA-3/IgG fúziós fehérje az 1. ábrán bemutatott aminosav-szekvenciával rendelkezik, és ugyanezen az ábrán bemutatott nukleotidszekvencia kódolja.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a CD2-kötő LFA3-poliipeptid a 6,162,432. számú USA-beli szabadalmi leírásban (melyet a kitanítás részének tekintünk) bemutatott, 3. azonosítószámú szekvenciával rendelkező LFA-3-szekvencia 1-92., 1-80., 50-65., 20-80. aminosavait tartalmazza.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, az eljárás olyan lépést tartalmaz, amelyben az alanyban szimptómákat vagy citokin-mennyiségek, például IFN γ -mennyiségek, vagy immunsejt-populáció [például T-sejtek, például memória effektor T-limfociták (például CD8/CD45 RO+ sejtek vagy CD4/CD45 RO+ sejtek); vagy IFN γ -termelő sejtek] változásait követjük. Az alanyban ezt kezelés előtt, kezelés alatt és azután követhetjük, hogy egy vagy több kezelési elemet alkalmaztunk. A követés eredményét felhasználhatjuk annak eldöntésére, hogy szükséges-e további kezelés ugyanilyen ágensekkel, vagy további kezelés szükséges további ágensekkel. Általában a citokin-mennyiségek vagy kiválasztott immunsejtek [például T-sejtek, például memória effektor T-limfociták (például CD8/CD45 RO+ sejtek vagy CD4/CD45 RO+ sejtek); vagy IFN γ -termelő sejtek] számának csökkenése jelzi a rendellenesség javulását az alanyban.

A kezelés tartalmazhat még más ágensekkel való kombinációt. Tehát, a találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, az eljárásban: beadunk az alanynak egy olyan ágens, amely T-sejt-receptorral társult kostimulátor szignált képes gátolni, például B7-CD28-, ICAM-LFA-1- vagy CD40-CD40L-kölcsönhatás inhibitora, vagy ezek bármilyen kombinációja. Az ágens lehet bármilyen molekula (például ellenanyag vagy fragmentum, szolubilis polipeptid, kis-

méretű molekula vagy peptidmimetikum, amely képes zavarni a ligandum (például B7, ICAM, CD40) és a megfelelő „ellen”-ligandum (például CD28, LFA-1, CD40L) közötti kölcsönhatást. Az ágens előnyösen LFA-1-re vagy CD40L-re specifikus ellenanyag-homológ, például humanizált anti-LFA-1-ellenanyag.

5 A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, az eljárásban továbbá: beadunk az alanynak topikálisan alkalmazható ágenst, például egy vagy több szteroidot, vitamint (például D-vitamint), kátrányt vagy antralin.

10 A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, az alany emlősszervezet, például főemlős, előnyösen magasabb rendű főemlős, például ember, például epidermális vagy dermális rendellenességben szenvedő páciens (például pszoriázis enyhe, mérsékelt vagy súlyos formájában szenved).

15 A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a fúziós polipeptidet és az UVB-t egyidejűleg alkalmazzuk. A találmány más előnyös megvalósítási módjai szerint, a CD2-kötőágenst és a kiegészítő ágenst egymás után adjuk be, például először beadjuk a fúziós fehérjét, azután az UVB-kezelést alkalmazzuk, vagy fordítva. Ha az UVB-t alkalmazzuk először, a fúziós fehérjét addig kell beadni, amíg az UVB terápiás hatásai, például IFN- γ -mennyiségének csökkenése, még folyamatban van. Ha a fúziós fehérjét adjuk be először, az UVB-t addig kell alkalmazni, amíg a fúziós fehérje terápiás hatása, például IFN- γ -mennyiségének csökkenése, még folyamatban van.

20 A fúziós polipeptidet és az UVB-kezelést topikális terápiával [amelyben például szteroidot, vitamint (például D-vitamint), kátrányt, antralin, makrolidot vagy makrolaktámot, például tacrolimust (FK506) vagy ascomycin-makrolaktámot (például pimecrolimus-t) adunk be] lehet kombinálni. A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a fúziós polipeptidet és az UVB-t megfelelő sorrendben alkalmazzuk. A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, CD2-kötőágens beadását követhetik megfelelő sorrendben alkalmazott topikális terápiák, például szteroid-terápia, azután vitamin-kezelés (például D3-vitamin-kezelés), azután antralin.

Topikális és/vagy szisztémás ágenseket bármilyen kombinációban és bármilyen sorrendben lehet alkalmazni.

30 A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a fúziós polipeptidet és az UVB-t ágenst egymáshoz elegendően közel, például térben és időben közel alkalmazzuk, így a kívánt hatás, például az IFN γ -mennyiségek csökkentése, vagy szimptómák csökkentése nagyobb

mértékű, mint amit akkor figyelnénk meg, ha az UVB-t fúziós polipeptid nélkül alkalmaznánk, vagy ha a fúziós polipeptidet az UVB nélkül adnánk be.

A találmány néhány előnyös megvalósítási módjai szerint, a fúziós polipeptidet szisztémásan adjuk be (például intravénásan, intramuszkulárisan, infúzióval, például infúziós berendezéssel vagy szubkután). A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a fúziós polipeptidet egy alanynak egyszer egy héten adjuk be tizenkét hetes terápiás kezelési időtartam alatt.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a kiegészítő ágens UVB, például ultraibolya fény 290-320 nm tartományban, előnyösebben közeli hullámhossz-tartományba eső UVB 311 nm-en.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, az UVB-t lokálisan alkalmazzuk, például fényhatást alkalmazunk, például UVB-sugárzást.

A fúziós polipeptidet és/vagy UVB-t alkalmazhatjuk a betegség aktív szakasza alatt, vagy enyhülése alatt, vagy a kevésbé aktív szakasza alatt.

A találmány tárgyát képezi egy másik vonatkozásában eljárás egy rendellenesség, például gyulladásos rendellenesség kezelésére egy alanyban. A gyulladásos rendellenesség lehet krónikus gyulladásos rendellenesség, például a normálistól eltérő (például megnövekedett mértékű) T-sejt-, például Th1-típusú T-sejt-aktivitással vagy proliferációval jellemzett, krónikus gyulladásos rendellenesség. Az eljárásban:

Beadunk az alanynak CD2/LFA-3-kölcsönhatás inhibitorát, például a leírás szerinti inhibitorot, kombinációban egy kiegészítő ágenssel, például egy leírás szerinti ágenssel, ezzel kezeljük vagy megelőzzük a krónikus gyulladásos rendellenességet.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, az eljárás továbbá olyan lépést tartalmaz, amelyben citokin-mennyiségek, például IFN γ -mennyiségek, vagy immunsejt-populáció [például T-sejtek, például memória effektor T-limfociták (például CD8/CD45 RO+ sejtek vagy CD4/CD45 RO+ sejtek); vagy IFN γ -termelő sejtek] változásait követjük, amelyben a citokin-mennyiségek, például IFN γ -mennyiségek, vagy immunsejt-populáció csökkenése jelzi a rendellenesség javulását az alanyban.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a krónikus gyulladásos rendellenesség pszoriázis.

A találmány tárgyát képezi egy másik vonatkozásában eljárás egy rendellenesség, például autoimmun rendellenesség kezelésére egy alanyban. Az autoimmun rendellenesség lehet

krónikus autoimmun rendellenesség, amelyet a normálistól eltérő (például megnövekedett mértékű) T-sejt-, például Th1-típusú T-sejt-aktivitás vagy proliferáció jellemez. Az eljárásban:

5 Beadunk az alanyak CD2/LFA-3-kölcsönhatás inhibitorát, például a leírás szerinti inhibitor, kombinációban egy kiegészítő ágenssel, például egy leírás szerinti ágenssel, ezzel kezeljük vagy megelőzzük az autoimmun rendellenességet.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, az eljárás továbbá olyan lépést tartalmaz, amelyben citokin-mennyiségek, például IFN γ -mennyiségek, vagy immunsejt-populáció [például T-sejtek, például memória effektor T-limfociták (például CD8/CD45 RO⁺ sejtek vagy CD4/CD45 RO⁺ sejtek); vagy IFN γ -termelő sejtek] változásait követjük, amelyben a
10 citokin-mennyiségek, például IFN γ -mennyiségek, vagy immunsejt-populáció csökkenése jelzi a rendellenesség javulását az alanyban.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, az autoimmun rendellenesség pszoriázis, cukorbetegség, artritisz (reumatoid artritisz, fiatalkori reumatoid artritisz, oszteoartritisz, pszoriázisos artritisz), szklerózis multiplex, encefalomyelitisz, miaszténia gravisz, szisztémás lupusz eritematózus, autoimmun pajzsmirigy-gyulladás, dermatitisz, (beleértve atópiás dermatitist és ekcémás dermatitist).
15

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, az autoimmun rendellenesség a testfelszínen vagy a testfelszín közelében lévő sejtet, szövetet vagy szervet érint, például epidermális, dermális, okuláris, bukkális és/vagy nasopharyngealis nyálkahártyát. A találmány
20 más előnyös megvalósítási módja szerint, az autoimmun rendellenesség olyan sejtet, szövetet vagy szervet érint, amelyet meg lehet közelíteni célba juttató eszközzel, például endoszkóppal vagy injekciós tűvel.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, az autoimmun rendellenesség pszoriázis vagy dermatitisz (beleértve atópiás dermatitist és ekcémás dermatitist).

25 A találmány tárgyát képezi egy másik vonatkozásában eljárás pszoriázis kezelésére vagy megelőzésére egy alanyban. Az eljárásban beadunk az alanyak CD2/LFA-3-kölcsönhatás inhibitorát, például CD2-kötőágenst kombinációban egy ágenssel az alábbiak közül: besugárzás (például UVB- vagy PUVA-sugárzás), metotrexát, retinoid (például orális retinoid) és ciklosporin, ezáltal pszoriázist kezelünk vagy megelőzünk.

30 A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, az ágens besugárzás, például UVB-sugárzás.

A találmány tárgyát képezi egy másik vonatkozásában eljárás T-sejt-aktivitás vagy proliferáció [például memória effektor T-limfociták (például CD8/CD45 RO+ sejtek vagy CD4/CD45 RO+ sejtek); vagy IFN γ -termelő sejtek aktivitásának vagy proliferációjának] modulálására. Az eljárásban:

5 A T-sejtet érintkeztetjük CD2/LFA-3-kölcsönhatás inhibitorával, például CD2-kötőágenssel kombinációban egy kiegészítő ágenssel, például egy leírás szerinti ágenssel akkora mennyiségben, amely elegendő a moduláláshoz, például a T-sejt-aktivitás vagy proliferáció mértékének csökkentésére.

10 Az eljárásban lehet alkalmazni sejtmertes körülményeket (például helyreállított rendszert) tenyészetben lévő sejteken, például *in vitro* vagy *ex vivo* (például T-sejteket tartalmazó tenyészetet). Például sejteket lehet tenyészteni *in vitro* tenyésztési tápközegben, és a leírás szerinti inhibitort és/vagy egy ágenszt hozzá lehet adni a tenyésztési tápközeghez. A találmány egy másik előnyös megvalósítási módja szerint, T-sejteket kiveszünk az alanyból az érintkeztetési lépés előtt. A kezelt sejteket azután visszavisszük az alanyba. Más módszer szerint, az eljárást
15 egy alanyban lévő sejteken végezzük, például *in vivo* terápiás (terápiás vagy profilaktikus) eljárás részeként.

A találmány tárgyát képezi egy másik vonatkozásában készítmény (például gyógyászati készítmény), amely CD2/LFA-3-kölcsönhatás inhibitorát, például a leírás szerinti CD2/LFA-3-kölcsönhatás inhibitorát tartalmazza kombinációban egy kiegészítő ágenssel, például leírás szerinti ágenssel, és gyógyászatilag elfogadható hordozót tartalmaz.
20

A találmány tárgyát képezi egy másik vonatkozásában reagenskészlet, amely CD2/LFA-3-kölcsönhatás inhibitorát, például a leírás szerinti CD2/LFA-3-kölcsönhatás inhibitorát tartalmazza kombinációban egy kiegészítő ágenssel, például leírás szerinti ágenssel, és utasításokat tartalmaz arra vonatkozóan, hogyan alkalmazzuk az ilyen ágensek kombinációit.

25 A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a CD2/LFA-3-kölcsönhatás inhibitora LFA-3/Ig fúziós polipeptid. Az LFA-3/Ig fúziós polipeptid előnyösen liofilizálva van.

A találmány szerinti megoldás más tulajdonságai és előnyei nyilvánvalóbbak lesznek az alábbi részletes leírás és szabadalmi igénypontok alapján.

Ábrák rövid leírása:

30 Az 1. ábrán bemutatunk egy LFA-3/IgG fúziós fehérje aminosav-szekvenciáját és nukleotidszekvenciáját. A szignálpeptid megfelel az 1. ábrán, az 1-28. aminosavaknak; az érett LFA-3-régió megfelel az 1. ábrán, a 29-120. aminosavaknak; és az IgG1-régió megfelel az 1. ábrán, a 121-351. aminosavaknak.

A „CD2” kifejezés a leírásban olyan CD2-poliipeptidet jelent, amely természetesen előforduló LFA-3-poliipeptiddel képes kölcsönhatást létesíteni (például kötődni képes hozzá), és amely a 6,162,432. számú USA-beli szabadalmi leírásban (melyet a kitanítás részének tekintünk) ismertetett, 5. azonosítószámú aminosav-szekvenciával rendelkezik vagy azzal homológ (például legalább 85%-ban homológ); vagy amelyet (a) természetesen előforduló, emlősszervezetből származó CD2-nukleinsavszekvencia (például a 6,162,432. számú USA-beli szabadalmi leírásban ismertetett, 5. azonosítószámú szekvencia, a szabadalmi leírást a kitanítás részének tekintjük); (b) természetesen előforduló, emlősszervezetből származó CD2-nukleinsavszekvenciának megfelelő, degenerált nukleinsavszekvencia; (c) természetesen előforduló, emlősszervezetből származó CD2-nukleinsavszekvenciával (például a 6,162,432. számú USA-beli szabadalmi leírásban ismertetett, 5. azonosítószámú szekvencia, a szabadalmi leírást a kitanítás részének tekintjük) legalább 85%-ban homológ nukleinsavszekvencia; vagy (d) olyan nukleinsavszekvencia kódol, amely a fenti nukleinsavszekvenciák valamelyikével hibridizálódni képes az alábbi körülményekkel ekvivalens körülmények között: körülbelül 20°C és 27°C közötti hőmérsékleten T_m alatt és 1 M nátrium-kloridban, például olyan nukleinsavszekvencia, amely a fenti nukleinsavszekvenciákhoz sztringens körülmények között képes hibridizálódni, például nagymértékben sztringens körülmények között.

A leírásban „LFA-3” olyan LFA-3-poliipeptidet jelent, amely természetesen előforduló CD2-poliipeptidhez képes kötődni, és amelyet a 6,162,432. számú USA-beli szabadalmi leírásban (melyet a kitanítás részének tekintünk) ismertetett, 1. vagy 3. azonosítószámú aminosav-szekvenciával rendelkezik vagy azzal homológ (például legalább 85%-ban homológ); vagy amelyet (a) természetesen előforduló, emlősszervezetből származó LFA-3-nukleinsavszekvencia (például a 6,162,432. számú USA-beli szabadalmi leírásban ismertetett, 1. vagy 3. azonosítószámú szekvencia, a szabadalmi leírást a kitanítás részének tekintjük); (b) természetesen előforduló, emlősszervezetből származó LFA-3-nukleinsavszekvenciának megfelelő, degenerált nukleinsavszekvencia; (c) természetesen előforduló, emlősszervezetből származó LFA-3-nukleinsavszekvenciával (például a 6,162,432. számú USA-beli szabadalmi leírásban ismertetett, 1. vagy 3. azonosítószámú szekvencia, a szabadalmi leírást a kitanítás részének tekintjük) legalább 85%-ban homológ nukleinsavszekvencia; vagy (d) olyan nukleinsavszekvencia kódol, amely a fenti nukleinsavszekvenciák valamelyikével hibridizálódni képes az alábbi körülményekkel ekvivalens körülmények között: körülbelül 20°C és 27°C közötti hőmérsékleten T_m alatt és 1 M nátrium-kloridban, például olyan nukleinsavszekvencia, amely a fenti nukleinsavszekvenciákhoz sztringens körülmények között képes hibridizálódni, például nagymértékben

sztringens körülmények között.

A leírásban a „CD2-kötőágens” kifejezésen olyan ágenst értünk, amely CD2-vel kölcsönhatást képes létesíteni (előnyösen kötődik hozzá), és előnyösen CD2/LFA3-kölcsönhatást képes modulálni (előnyösen csökkenteni) és/vagy CD2-jeltovábbítást képes modulálni. CD2-kötőágens

5 kötések lehetnek például: természetesen előforduló CD2-ligandum szolubilis LFA-3-kötő frgmentei; LFA-3 vagy CD2-kötő frgmentének szolubilis fúziói egy másik fehérjével vagy polipeptiddel, például immunoglobulinnal vagy frgmentével, LFA-3/CD2 fúziós polipeptid; CD2-t kötni képes ellenanyagok, például rekombináns, monoklonális, kiméra, CDR-átültetett, humanizált, humán vagy rágcsálóból származó ellenanyagok; és kisméretű molekulák vagy

10 peptidmimetikumok.

A leírásban a „LFA-3-kötőágens” kifejezésen olyan ágenst értünk, amely LFA-3-al kölcsönhatást képes létesíteni (előnyösen kötődik hozzá) és előnyösen CD2/LFA3-kölcsönhatást képes modulálni (előnyösen csökkenteni) és/vagy CD2-jeltovábbítást képes modulálni. LFA-3-kötőágens

15 kötések lehetnek például: természetesen előforduló LFA-3-ligandum szolubilis CD2-kötő frgmentei; CD2 vagy LFA-3-kötő frgmentének szolubilis fúziói egy másik fehérjével vagy polipeptiddel, például immunoglobulinnal vagy frgmentével, LFA-3/CD2 fúziós polipeptid; LFA-3-at kötni képes ellenanyagok, például rekombináns, monoklonális, kiméra, CDR-átültetett, humanizált, humán vagy rágcsálóból származó ellenanyagok; és kisméretű molekulák vagy peptidmimetikumok.

20 „LFA-3/IgG” fúziós polipeptid egy olyan fúziós polipeptid, amely olyan LFA-3-szekvenciát tartalmaz, amely CD2-t képes kötni, és immunoglobulin-szekvencia egészét vagy részletét tartalmazza, például olyan immunoglobulin-szekvenciareészletet, amely Fc-receptorral képes kölcsönhatást létesíteni. Az LFA-3-szekvencia lehet teljes hosszúságú LFA-3 vagy CD2-kötő frgmente. A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, az LFA-3-szekvencia

25 humán LFA-3, és előnyösen olyan szekvencia, amely az alany egyik vagy mindkét alléljával azonos. A találmány más előnyös megvalósítási módjai szerint, a fúziós polipeptid módosított LFA-3-szekvenciát tartalmaz, például olyat, amely humán LFA-3-szekvenciától legalább 1, de kevesebb, mint 3, 4, 5 vagy 6 aminosavat. (Humán LFA-3 teljes aminosav-szekvenciája megtalálható a 6,162,432. számú USA-beli szabadalmi leírásban, 1. vagy 3. azonosítószámú szekvencia

30 venciaként, a szabadalmi leírást a kitanítás részének tekintjük). Egy különösen előnyös LFA-3/IgG fúziós fehérjét a 6,162,432. számú USA-beli szabadalmi leírásban közölt, 7. azonosítószámú nukleotidszekvenciával rendelkező nukleinsav kódol, és 8. azonosítószámú szekvenciaként bemutatott aminosav-szekvenciával rendelkezik, a szabadalmi leírást a kitanítás részének

tekintjük. Még egy előnyös LFA-3/IgG fúziós fehérje (melyet a leírásban “nagy splicing termék”-nek is jelölünk) az 1. ábrán bemutatott aminosav-szekvenciával rendelkezik, és ugyanezen az ábrán bemutatott nukleotidszekvencia kódolja. A szignálpeptid megfelel az 1. ábrán az 1-28. aminosavaknak; az érett LFA-3-régió megfelel az 1. ábrán a 29-120. aminosavaknak; és az IgG1-régió megfelel az 1. ábrán a 121-351. aminosavaknak.

A leírásban „szolubilis LFA-3-poliipeptid” vagy „szolubilis CD2-poliipeptid” olyan LFA-3- vagy CD2-poliipeptidet jelent, amely nem képes magát biológiai membránba horgonyozni. Ilyen szolubilis peptidek lehetnek például olyan CD2- és LFA-3-poliipeptidek, amelyekből hiányzik membránt átívelő domén elégséges része, amely szükséges a poliipeptid horgonyozásához, vagy úgy vannak módosítva, hogy a membránt átívelő domén nem funkcionális. A leírásban szolubilis LFA-3-poliipeptidek közé tartozik teljes hosszúságú vagy rövidített (például belső deléciókkal), PI-kapcsolt LFA-3.

A leírásban az „ellenanyag-homológ” kifejezésen olyan fehérjét értünk, amely egy vagy több poliipeptidet tartalmaz az alábbiak közül: immunoglobulin könnyű láncok, immunoglobulin nehéz láncok és ezek antigénkötő fragmensei, amelyek egy vagy több antigént képesek megkötni. Egynél több poliipeptidet tartalmazó, ellenanyag-homológot felépítő poliipeptid-komponensek adott esetben diszulfid-kötéssel vagy másféle kovalens keresztkötéssel lehetnek összekapcsolva. Ennek megfelelően, ellenanyag-homológok lehetnek intakt IgA, IgG, IgE, IgD, IgM immunoglobulinok (valamint ezek altípusai), amelyekben az immunoglobulin könnyű láncai lehetnek kappa vagy lambda típusúak. Ellenanyag-homológok közé tartoznak olyan intakt immunoglobulin-részek is, amelyek megőrizték antigénkötő specifitásukat, például Fab-fragmensek, Fab'-fragmensek, F(ab')₂-fragmensek, F(v)-fragmensek, nehéz lánc monomerjei vagy dimerjei, könnyű lánc monomerjei vagy dimerjei, egy nehéz láncból és egy könnyű láncból álló dimerek, és hasonlók.

A leírásban „humanizált rekombináns ellenanyag-homológ” kifejezésen olyan ellenanyag-homológot értünk, amely rekombináns DNS-technológia alkalmazásával lett előállítva, amelyben humán immunoglobulin könnyű láncából vagy nehéz láncában lévő néhány vagy összes aminosav, amely nem szükséges az antigénkötéshez, szubsztituálva van nem-humán emlősszervezetből származó immunoglobulin könnyű vagy nehéz láncában lévő, megfelelő aminosavakkal.

A leírásban „kiméra rekombináns ellenanyag-homológ” kifejezésen olyan ellenanyag-homológot értünk, amely rekombináns DNS-technológia alkalmazásával lett előállítva, amelyben immunoglobulin könnyű láncának, nehéz láncának vagy mindkettőnek kapocsrégiója és

konstans régiója, egészben vagy részben szubsztituálva van más immunoglobulin könnyű láncból vagy nehéz láncából származó, megfelelő régiókkal.

A leírás szerinti szekvenciákhoz hasonló vagy homológ (például legalább körülbelül 85%-ban homológ) szintén a találmány tárgyát képezik. A találmány néhány bizonyos előnyös megvalósítási módja szerint, a szekvencia-azonosság lehet körülbelül 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% vagy nagyobb mértékű. Ezzel alternatív módon, lényegi azonosság áll fent, ha a nukleinsav-szegmensek szelektív hibridizációs körülmények között (például nagymértékben sztringens körülmények között) hibridizálódni képesek a komplementer szálhoz. A nukleinsavak jelen lehetnek egész sejtekben, sejtizátumokban, vagy részlegesen tisztított vagy lényegi módon tisztított formában.

A két szekvencia közötti „homológia” vagy „szekvencia-azonosság” (a kifejezéseket a leírásban felcserélhető módon használjuk) kiszámítását az alábbiak szerint végezzük. A szekvenciákat egymás alá rendezzük optimális összehasonlítás céljából (például réseket lehet bevenni az első és második aminosav-szekvencia vagy nukleinsavszekvencia közül egyikbe vagy mindkettőbe optimális alárendezés céljából, és nem-homológ szekvenciákat figyelmen kívül lehet hagyni összehasonlításban). A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a referencia-szekvencia hossza alárendezési célokból a teljes referencia-szekvencia legalább 30%-a, előnyösen legalább 40%-a, előnyösebben legalább 50%-a, sőt, még előnyösebben legalább 60%, és még előnyösebben legalább 70%-a, 80%-a, 90%-a, 100%-a. Azután összehasonlítjuk az aminosavakat vagy nukleotidokat a megfelelő aminosav-helyzetekben vagy nukleotid-helyzetekben. Ha az első aminosav-szekvenciában egy pozíciót ugyanolyan aminosav vagy nukleotid foglal el, mint a második szekvencia megfelelő helyzetében, akkor a molekulák azonosak ebben a helyzetben (a leírásban az aminosav vagy nukleinsav „azonosság” kifejezést ekvivalensen használjuk az aminosav vagy nukleinsav „homológia” kifejezéssel). Két szekvencia közötti százalékos azonosság a szekvenciákban azonos helyzetek számának függvénye, figyelembe véve a rések számát, és az egyes rések hosszát, amelyek bevitelére szükség volt a két szekvencia optimális egymás alá rendezéséhez.

Szekvenciák összehasonlítására és két szekvencia közötti százalékos azonosság meghatározására matematikai algoritmust is lehet alkalmazni. A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, két aminosav-szekvencia közötti százalékos azonosságot Needleman és Wunsch által leírt [J. Mol. Biol. 48, 444-453 (1970)] algoritmussal határozzuk meg, amely a GAP-programba van beépítve, a GCG-szoftver-csomagban (rendelkezésre áll <http://www.gcg.com>), Blossom62-mátrix vagy PAM250-mátrix alkalmazásával, és a „gap

weight” (rés-súlyozó tényező) 16, 14, 12, 10, 8, 6, 5 vagy 4, és a „length weight” (hossz-súlyozó tényező) 1, 2, 3, 4, 5 vagy 6. A találmány még egy másik előnyös megvalósítási módja szerint, két nukleotidszekvencia közötti százalékos azonosságot a GCG-szoftver-csomagban (rendelkezésre áll <http://www.gcg.com>) lévő GAP-programmal határozzuk meg, 5 NWSgapdna.CMP-mátrix alkalmazásával, és a „gap weight” (rés-súlyozó tényező) 40, 50, 60, 70 vagy 80, és a „length weight” (hossz-súlyozó tényező) 1, 2, 3, 4, 5 vagy 6. Egy különösen előnyös paraméter-készlet (és egy olyan készlet, amelyet akkor kell alkalmazni, ha a kísérletet végző személy bizonytalan abban, hogy milyen paramétereket kell alkalmazni annak meghatározása céljából, hogy egy molekula megfelel-e a találmány szerinti azonossági vagy homológiafeltételeknek) Blossum62 „scoring” mátrix, amelyben a „gap penalty” („büntetőpont”) 12, „gap extend penalty” (büntetőpont) 4 és „frameshift gap penalty” 5. 10

A leírásban a „homológ” kifejezés szinonim a „hasznos” kifejezéssel, és azt jelenti, hogy a kérdéses szekvencia egy vagy több aminosav-szubsztitúcióval különbözik egy referencia szekvenciától (bár kevés aminosav-inszerció vagy delécio is jelen lehet). Jelenleg, egy referencia szekvenciához viszonyított homológia vagy hasonlóság mértékének számítására előnyösen 15 BLAST- illetve Pfam-algoritmusokat alkalmaznak, amelyeket a Washingtoni Egyetemről lehet beszerezni <http://blast.wustl.edu> és <http://pfam.wustl.edu> címeken az egyes esetekben, az algoritmus alapértelmezésként megadott vagy ajánlott paramétereit alkalmazva a számított szekvencia-rokonság szignifikanciájának meghatározására. Két aminosav- vagy nukleotidszekvencia közötti százalékos azonosságot E. Meyers és W. Miller által leírt [CABIOS 4, 11-17 (1989)] algoritmus alkalmazásával határozzuk meg, amely az ALIGN-programba (2.0 verzió) van beépítve, „PAM120 weight residue” táblázat alkalmazásával, ahol „gap length penalty” (büntetőpont): 12 és „gap penalty” (büntetőpont): 4. 20

A leírásban „sztringens körülmények között hibridizálódni képes” kifejezésen hibridizációs és mosási körülményeket értünk. A sztringens körülmények szakember számára ismertek, és leírásuk megtalálható a „Current Protocols in Molecular Biology” című könyvben, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1.-6.3.6. fejezetekben. Ebben leírnak vizes és nem-vizes közegben végezhető módszereket, és bármelyiket lehet alkalmazni. Sztringens hibridizációs körülmények például előnyösen olyanok, amelyben hibridizáció 6X nátrium-klorid/nátrium-citrátban (SSC), körülbelül 45°C-on történik, azután egy vagy több mosás történik 0,1% SDS-t tartalmazó 0,2X SSC-ben, 50°C-on. Egy másik példa szerint, sztringens hibridizációs körülmények olyanok, amelyben hibridizáció 6X SSC-ben, körülbelül 45°C-on történik, azután egy vagy több mosás történik 0,1% SDS-t tartalmazó 0,2X SSC-ben, 55°C-on. Egy további példa 25 30

szert, sztringens hibridizációs körülmények olyanok, amelyben hibridizáció 6X SSC-ben, körülbelül 45°C-on történik, azután egy vagy több mosás történik 0,1% SDS-t tartalmazó 0,2X SSC-ben, 60°C-on. Sztringens hibridizációs körülmények előnyösen olyanok, amelyben a hibridizáció 6X SSC-ben, körülbelül 45°C-on történik, azután egy vagy több mosás történik 0,1% SDS-t tartalmazó 0,2X SSC-ben, 65°C-on. Különösen előnyös, nagymértékben sztringens hibridizációs körülmények között (és olyan körülmények között, amelyet akkor kell alkalmazni, ha a kísérletet végző személy bizonytalan abban, hogy milyen körülményeket kell alkalmazni annak meghatározása céljából, hogy egy molekula megfelel-e a találmány szerinti hibridizációs feltételeknek) a hibridizáció 7% SDS-t tartalmazó 0,5 M nátrium-foszfátban, 65°C-on történik, azután egy vagy több mosás történik 1% SDS-t tartalmazó 0,2X SSC-ben, 65°C-on.

Nyilvánvaló, hogy a találmány szerinti polipeptidek tartalmazhatnak további konzervatív vagy nem-esszenciális aminosav-szubsztitúciókat, amelyek nincsenek lényegi hatással a polipeptid funkcióira. Azt, hogy egy adott szubsztitúció tolerálható-e, azaz nem befolyásol-e hátrányosan kívánt biológiai tulajdonságokat, például kötési aktivitást, Bowie, J. U. és munkatársai által leírtak szerint [Science 247, 1306-1310 (1990)] lehet meghatározni.

Egy „konzervatív aminosav-szubsztitúció” olyan, amelyben az aminosav hasonló oldallánccal rendelkező aminosavval van helyettesítve. Hasonló oldallánccal rendelkező aminosav-családokat a szakirodalomban definiálnak. Ezek a családok: bázikus oldallánccal rendelkező aminosavak (például lizin, arginin, hisztidin), savas oldallánccal rendelkező aminosavak (például aszparaginsav, glutaminsav), nem-töltött, poláros oldallánccal rendelkező aminosavak (például glicin, aszparagin, glutamin, szerin, treonin, tirozin, cisztein), apoláros oldallánccal rendelkező aminosavak (például alanin, valin, leucin, izoleucin, prolin, fenilalanin, metionin, triptofán), béta-elágazással rendelkező oldallánccal rendelkező aminosavak (például treonin, valin, izoleucin) és aromás oldallánccal rendelkező aminosavak (például tirozin, fenilalanin, triptofán, hisztidin).

„Nem-esszenciális” aminosavak olyan aminosavak, amelyeket egy hibrid-ellenanyag vad típusú szekvenciájában meg lehet változtatni anélkül, hogy egy biológiai aktivitás eltűnne, vagy előnyösebben lényegi módon megváltozna, míg egy „esszenciális” aminosav ilyen változást eredményez.

Bőr rendellenességei

A találmány szerinti eljárások emlősszervezetben, például főemlősben vagy emberben előforduló, fokozott mértékű T-sejt-aktiválódással és abnormális antigénbemutatással jellemzett bőr-rendellenességek prevenciójára vagy kezelésére alkalmasak, CD2/LFA-3-

kölcsönhatást gátló inhibitorok beadásával. Ilyen rendellenességek lehetnek pszoriázis, UV-károsodás, atópiás dermatitisz, kután T-sejtes limfóma, például mycosis fungoides, allergiás és irritáló kontakt dermatitisz, lichen planus, alopecia, például alopecia areata (foltos hajhullás), pyoderma gangrenosis (üszkös bőrgennyedés), vitiligo (foltos festékhiány), okuláris cicatricialis pemfigoid és urticaria (csalánkiütés). Nyilvánvaló, hogy bőr-rendellenességek, például pyoderma gangrenosis és urticaria kezelésére és profilaxisára szolgáló eljárások a találmány által igényelt oltalmi körbe tartoznak. Ez utóbbi bőr-rendellenességek ciklosporin-A-érzékeny bőrbetegségek, és ezért kialakulásukban T-sejt-aktiválódás szerepet játszik. A találmány szerinti eljárásokat előnyösen pszoriázis, atópiás dermatitisz, allergiás dermatitisz vagy alopecia areata, és előnyösebben pszoriázis profilaxisára és kezelésére alkalmazzuk.

A találmány szerinti eljárásokat bármilyen alanyban, például emlősszervezeten, előnyösen emberen végezhetjük. A leírásban az „alany” kifejezésen értünk humán szervezeteket és nem-humán állatokat. Humán szervezetek lehetnek előnyösen humán páciensek, akiket fokozott T-sejt-aktiválódással és abnormális antigénbemutatással jellemzett bőr-rendellenesség sújt a dermiszben és az epidermiszben. A találmány szerinti „nem-humán állatok” kifejezésen értünk minden gerincest, például emlősszervezetet, például nem-humán főemlősöket (különösen magasabb rendű főemlősöket), juhot, kutyát, rágcsálót (például egerek vagy patkányt), tenge-
rimalacot, kecskét, sertést, macskát, nyulakat, marhát, valamint nem-emlősszervezeteket, például csirkéket, kételtűeket, hüllőket stb.

20 **CD2/LFA-3-kölcsönhatás inhibitorai**

A CD2/LFA-3-kölcsönhatás bármilyen inhibitora alkalmazható a találmány szerinti eljárásokban. Ilyen inhibitorok lehetnek anti-LFA-3 ellenanyag-homológok, anti-CD2 ellenanyag-homológok, szolubilis LFA-3-polipeptidek, szolubilis CD2-polipeptidek, kisméretű molekulák (például 2500 Da kisebb molekulatömeggel rendelkező kémiai ágensek, előnyösen 1500 Da-nál
25 kisebb molekulatömeggel rendelkező vegyületek, például egy kisméretű szerves molekula, például kombinatorikus könyvtár terméke), LFA-3-at és CD2-t mimetizáló ágensek és származékaik. Előnyösen alkalmazott inhibitorok szolubilis LFA-3-polipeptidek és anti-LFA-3 ellenanyag-homológok.

Úgy lehet könnyen meghatározni konkrét szolubilis CD2-polipeptidek, szolubilis LFA-3-polipeptidek, anti-LFA-3-ellenanyag-homológok, anti-CD2-ellenanyag-homológok vagy CD2-t és LFA-3-at mimetizáló ágensek alkalmazhatóságát a találmány szerinti eljárásokban, hogy vizsgáljuk, milyen mértékben képesek gátolni az LFA-3/CD2-kölcsönhatást. Ezt a képességet például egyszerű sejt-kötő vizsgálati eljárás alkalmazásával vizsgálhatjuk, amely lehetővé

teszi annak vizuális elemzését (nagyítva), hogy a feltételezett inhibitor milyen mértékben képes gátolni LFA-3-at és CD2-t hordozó sejtek közötti kölcsönhatást. Jurkat-sejtek előnyösen alkalmazhatók CD2⁺ szubsztrátként, és juhból származó vörösvértestek vagy humán JY-sejtek előnyösen alkalmazhatók LFA-3⁺ szubsztrátként. A találmány szerinti megoldásban alkalmazható szolubilis polipeptidek, ellenanyag-homológok és mimetizáló ágensek kötési jellemzőit ismert módon lehet vizsgálni úgy, hogy például az ellenanyag-homológot, polipeptidet vagy ágenszt radioaktívan jelöljük (például ³⁵S-el vagy ¹²⁵I-al), és azután a jelölt polipeptidet, mimetizáló ágenszt vagy ellenanyag-homológot CD2⁺ vagy LFA-3⁺ sejtekkel megfelelő módon érintkeztetjük. A kötési tulajdonságokat enzimmal megfelelően jelölt, szekunder ellenanyag alkalmazásával is lehet vizsgálni. Rozettaképződéssel járó, kompetitív vizsgálati eljárásokat is lehet alkalmazni Seed és munkatársai által leírtak szerint [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 3365-69 (1987)].

Anti-LFA-3 és anti-CD2 ellenanyag-homológok

Sokféle típusú, anti-LFA-3 vagy anti-CD2 ellenanyag-homológot lehet alkalmazni a találmány szerinti eljárásokban. Ilyenek lehetnek monoklonális ellenanyagok, rekombináns ellenanyagok, kiméra rekombináns ellenanyagok, humanizált rekombináns ellenanyagok, valamint a fentiek antigénköti részei.

Az anti-LFA-3-ellenanyag-homológok közül, előnyösen monoklonális anti-LFA-3-ellenanyagokat alkalmazunk. Előnyösebben hibridómával termeltetett, monoklonális anti-LFA-3-ellenanyagokat alkalmazunk, az alábbi nyilvántartási számmal rendelkező hibridómák közül: ATCC HB 10693 (1E6), ATCC HB 10694 (HC-1B11), ATCC HB 10695 (7A6) és ATCC HB 10696 (8B8), vagy TS2/9-ként ismert monoklonális ellenanyag [Sanchez-Madrid és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 7489-93 (1982)] alkalmazásával. Legelőnyösebben olyan monoklonális anti-LFA-3-ellenanyagokat alkalmazunk, amelyet az alábbi nyilvántartási számmal rendelkező hibridómákkal termeltettünk: ATCC HB 10695 (7A6) és ATCC HB 10693 (1E6).

Anti-CD2-ellenanyag-homológok közül előnyösen monoklonális anti-CD2-ellenanyagokat, például olyan anti-CD2 monoklonális ellenanyagokat alkalmazunk, amelyek T11₁-epitóra specifikus ellenanyagok, például TS2/18 [Sanchez-Madrid és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 7489-93 (1982)].

Monoklonális ellenanyagok előállítására szolgáló technológia jól ismert. Röviden összefoglalva, egy immortális sejt vonalat (tipikusan mieolóma-sejteket) fuzionálunk egy adott antigént tartalmazó preparátummal immunizált emlősszervezetből származó limfocitákkal (tipi-

kusan splenocitákkal), és az eredményül kapott hibridóma-sejtek tenyészetének felülúszóját szkrínéljük az antigénre specifikus ellenanyagokra. Általános ismertetést lásd Kohler és munkatársai, Nature 256, 495-97 (1975). A találmány szerinti megoldás céljaira hasznosan alkalmazható immunogének lehetnek CD2-t vagy LFA-3-at hordozó sejtek, valamint LFA-3-at, CD2-t tartalmazó, sejtmentes preparátumok, vagy megfelelő receptoraikat kötő fragmenseik (például olyan CD2-fragmensek, amelyek LFA-3-hoz képesek kötődni, vagy LFA-3-fragmensek, amelyek CD2-höz képesek kötődni).

Az immunizálást standard eljárások szerint végezzük. A dózisegységek és az immunizálási rend az immunizálandó emlős fajtól, immunológiai állapotától, az emlősszervezet tömegétől stb. függ. Egy tipikus eljárásban, az immunizált emlősállatoktól vért veszünk, és az egyes vérmintákból származó szérumot vizsgáljuk az adott ellenanyagok jelenlétére, megfelelő szkrínelési vizsgálati eljárások alkalmazásával. Például alkalmas anti-LFA-3 vagy anti-CD2-ellenanyagokat úgy lehet azonosítani, hogy az immunszérumot arra teszteljük, hogy képes-e blokkolni Jurkat-sejtek rozettaképzését juhból származó vörösvértestekkel, amelynek oka a megfelelő sejtek felszínén lévő LFA-3 és CD2 jelenléte. Hibridóma-sejtek előállítására alkalmazott limfocitákat olyan immunizált emlősökből izolálunk, amelyek szérumait pozitívként teszteltük a kívánt ellenanyagok jelenlétére, ilyen szkrínelési vizsgálati eljárások alkalmazásával.

Az immortalis sejtvonal (például mielóma-sejtvonal) tipikusan ugyanabból az emlős fajtól származik, mint a limfociták. Előnyös immortalis sejtvonalak lehetnek egérből származó mielóma-sejtvonalak, amelyek érzékenyek hipoxantint, aminopterint és timidint tartalmazó tápközegben („HAT-tápközeg”) való tenyésztésre.

Tipikusan, HAT-érzékeny, egérből származó mielóma-sejteket fuzionálunk egérből származó splenocitákkal, polietilén-glikol („PEG”) 3350 alkalmazásával. A fúzió eredményeként létrejövő hibridóma-sejteket azután HAT-tápközegben szelektáljuk, amely elpusztítja a nem-fuzionált és a nem termelő, fuzionált mielóma-sejteket (nem fuzionált splenociták néhány nap múlva elpusztulnak, mivel nem transzformálódtak). Kívánt ellenanyagot termelő hibridómákat a hibridóma-tenyészet felülúszóinak szkrínelésével detektálunk, például arra vonatkozóan, hogy képesek-e blokkolni Jurkat-sejtek adhézióját juhból származó vörösvértestekkel. A monoklonális jelleg igazolása céljából, a hibridóma-tenyészeteket tipikusan szubklónozzuk limitáló hígítás alkalmazásával.

Anti-LFA-3 vagy anti-CD2 monoklonális ellenanyagok termelése céljából, ilyen szkrínelési vizsgálati eljárásokban pozitívnak tesztelt hibridóma-sejteket tápközegben tenyésztünk

5 olyan körülmények között, és elegendő ideig ahhoz, ami lehetővé teszi, hogy a hibridóma sejtek a monoklonális ellenanyagokat a tenyésztési tápközegekbe szekretálják. Hibridóma-sejtekre alkalmazható szövettenyésztési technikák és tenyésztési tápközegek jól ismertek. A kondicionált hibridóma-tenyészet felülúszóját elkülöníthetjük, és a kívánt ellenanyagokat adott esetben tovább tisztíthatjuk jól ismert módszerek alkalmazásával.

10 Más módszer szerint, a kívánt ellenanyagot úgy termeltetjük, hogy a hibridóma-sejteket pristánnal szenzibilizált egér hasüregébe injektáljuk. A hibridóma-sejtek proliferálnak a hasüregben, ellenanyagokat szekretálnak, amelyek felhalmozódnak az aszcitesz-folyadékban. Az ellenanyagokhoz úgy juthatunk, hogy fecskendővel kivesszük az aszcitesz-folyadékot a hasüregből.

15 A találmány szerint alkalmazható, anti-CD2- és anti-LFA-3-ellenanyag-homológok lehetnek rekombináns ellenanyagok is, amelyeket a kívánt ellenanyagból származó immunoglobulin könnyű és nehéz láncait kódoló DNS-el transzformált gazdasejtek termelnek. Rekombináns ellenanyagokat jól ismert géntechnológiai technikák alkalmazásával állíthatunk elő. Lásd például a 4,816,397. számú USA-beli szabadalmi leírást, amelyet a kitanítás részének tekintünk.

20 Rekombináns ellenanyagokat előállíthatunk például a kívánt ellenanyagnak megfelelő, immunoglobulin könnyű és nehéz láncait kódoló cDNS vagy genomi DNS klónozásával olyan hibridóma-sejtből, amely találmány szerint alkalmazható ellenanyag-homológot termel. A polipeptideket kódoló cDNS-t vagy genomi DNS-t azután expressziós vektorokba inszertáljuk úgy, hogy mindkét gén működőképesen van kapcsolva saját transzkripció és transzlációs expressziós szabályzó szekvenciájához. Az expressziós vektort és az expressziós szabályzó szekvenciákat úgy választjuk ki, hogy kompatibilisek az expresszióra alkalmazott gazdasejttel. Tipikusan mindkét gént ugyanabba az expressziós vektorba inszertáljuk.

25 Prokarióta vagy eukarióta gazdasejteket lehet alkalmazni. Az expresszió eukarióta gazdasejtekben előnyös, mert ilyen sejtekben nagyobb valószínűséggel szerveződik és szekretálódik megfelelő konformációt felvett, immunológailag aktív ellenanyag, mint prokarióta sejtekben. Azonban, ha a nem megfelelő konformáció („folding”) miatt bármilyen ellenanyag inaktív, jól ismert módszerek alkalmazásával renaturálható [Kim és Baldwin, Ann. Rev. Biochem. 51, 30 459-89 (1982)]. Az is lehetséges, hogy a gazdasejtek intakt ellenanyagok részeit termelik, például könnyű lánc dimerjeit vagy nehéz lánc dimerjeit, amelyek szintén alkalmasak találmány szerinti ellenanyag-homológként.

Nyilvánvaló, hogy a fentebb leírt eljárás variációi is alkalmasak a találmány szerinti megoldásban. Például kívánatos lehet gazdasejt transzformálása ellenanyag-homológ könnyű láncát vagy nehéz láncát (de mindkettőt nem) kódoló DNS-el. Szintén rekombináns DNS-technológiát alkalmazhatunk az egyik vagy mindkét könnyű és nehéz láncot kódoló, néhány
5 vagy az összes olyan DNS eltávolítására, amely nem szükséges a megfelelő, CD2- vagy LFA-3-receptor kötéséhez. Ilyen rövidített DNS-molekulákból expresszált molekulák hasznosan alkalmazhatók a találmány szerinti eljárásokban. Továbbá, elő lehet állítani olyan bifunkciós ellenanyagokat, amelyekben az egyik nehéz lánc és az egyik könnyű lánc anti-CD2- vagy anti-LFA-3-ellenanyag-homológ, és a másik nehéz lánc és a másik könnyű lánc CD2-től vagy LFA-
10 3-tól különböző antigénre, vagy CD2 vagy LFA-3 más epitópjára specifikus.

Kiméra rekombináns anti-LFA-3 vagy anti-CD2 ellenanyag-homológokat úgy lehet előállítani, hogy gazdasejtet transzformálunk olyan alkalmas expressziós vektorral, amely a kívánt immunoglobulin könnyű és nehéz láncait kódoló DNS-t tartalmazza, amelyben immunoglobulin nehéz és/vagy láncának kapocsrégióját és konstans régióit kódoló DNS teljes egészében vagy
15 részben szubsztituálva van más fajból származó immunoglobulin könnyű vagy nehéz láncát kódoló DNS megfelelő régiójával. Ha az eredeti rekombináns ellenanyag nem humán eredetű, és az inhibitort embernek szándékozzuk beadni, a megfelelő humán szekvenciák szubsztituálása előnyös. Kiméra rekombináns ellenanyag például egérből származó variábilis régiókkal és humán kapocsrégióval és konstans régióval rendelkezik [lásd például a 4,816,397. számú USA-
20 beli szabadalmi leírást; Morrison és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6851-55 (1984); Robinson és mtsai., PCT/US86/02269. számú nemzetközi közzétételi iratot; Akira és mtsai., EP 184,187. számú európai közzétételi iratot; Taniguchi, M., EP 171,496. számú európai közzétételi iratot; Neuberger és mtsai., WO 86/01533. számú nemzetközi közzétételi iratot; Better és mtsai., Science 240, 1041-1043 (1988); Liu és mtsai., PNAS 84, 3439-3443 (1987); Liu és
25 mtsai., J. Immunology 139, 3521-3526 (1987); Sun és mtsai., PNAS 84, 214-218 (1987); Nishimura és mtsai., Canc. Res. 47, 999-1005 (1987); Wood és mtsai., Nature 314, 446-449 (1985); és Shaw és mtsai., J. Natl. Cancer Inst. 80, 1553-1559 (1988)].

Humanizált rekombináns anti-LFA-3- vagy anti-CD2-ellenanyagokat úgy lehet előállítani, hogy az antigénkötésben közvetlenül szerepet nem játszó, variábilis Fv-régió szekvenciáit
30 helyettesítjük humán, variábilis Fv-régiókból származó, ekvivalens szekvenciákkal. Humanizált ellenanyagok előállítására szolgáló módszereket leírtak [Morrison, S. L., Science 229, 1202-1207 (1985); Oi és mtsai., BioTechniques 4, 214 (1986); és Queen és mtsai., 5,585,089., 5,696,761. és 5,693,762. számú USA-beli szabadalmi leírásban, melyeket a kitanítás részének

tekintünk]. Ezekben a módszerekben olyan nukleinsavszekvenciákat izolálunk, manipulálunk és expresszálunk, amelyek egészben vagy részben, immunoglobulin legalább egyik nehéz vagy könnyű láncának variábilis Fv-régióit kódolják. Ilyen nukleinsavak forrásai szakember számára jól ismertek, például előállíthatunk ilyeneket anti-LFA-3- vagy anti-CD2-ellenanyagot termelő hibridómákból. A humanizált ellenanyagot kódoló nukleinsavakat vagy fragmenseit azután alkalmas expressziós vektorba lehet klónozni.

Humanizált vagy CDR-átültetett ellenanyag-molekulákat vagy immunoglobulinokat CDR-átültetéssel vagy CDR-szubsztitúcióval lehet előállítani, amelyben egy immunoglobulin egy, két vagy az összes CDR-jét helyettesíteni lehet [lásd például 5,225,539. számú USA-beli szabadalmi leírás; Jones és mtsai., *Nature* 321, 552-525 (1986); Verhoeyan és mtsai., *Science* 239, 1534 (1988); Beidler és mtsai., *J. Immunol.* 141, 4053-4060 (1988); Winter, 5,225,539. számú USA-beli szabadalmi leírás, amelyek mindegyikének tartalmát kifejezetten a kitanítás részének tekintjük]. Winter leírt egy CDR-átültetést alkalmazó módszert, amelyet a találmány szerinti, humanizált ellenanyagok előállítására lehet alkalmazni [GB 2188638A. számú UK-beli szabadalmi bejelentés, benyújtva 1987. március 26.; Winter, 5,225,539. számú USA-beli szabadalmi leírás, amelyek mindegyikének tartalmát kifejezetten a kitanítás részének tekintjük]. Egy konkrét humán ellenanyag valamennyi CDR-jét helyettesíteni lehet nem-humán CDR legalább egy részletével, vagy csak néhány CDR-t helyettesíteni lehet nem-humán CDR-ekkel. Csak annyi CDR-t kell helyettesíteni, amennyi egy előre meghatározott antigén, például LFA-3 vagy CD2 kötéséhez szükséges.

A találmány által igényelt oltalmi körbe tartoznak humanizált ellenanyagok is, beleértve immunoglobulinok, amelyekben konkrét aminosavak szubsztituálva, deletálva vagy hozzáadva vannak. Különösen előnyös humanizált ellenanyagok a vázrégióban rendelkeznek aminosavszubsztitúciókkal, például az antigénkötés javítása céljából. Például humanizált ellenanyag-lánc akceptor-vázrégiójában kevés, kiválasztott aminosavat helyettesíteni lehet a megfelelő, donor aminosavakkal. A szubsztitúció előnyös helyei lehetnek a CDR-el szomszédos aminosavak, vagy azok, amelyek képesek CDR-el kölcsönhatást létesíteni (lásd például 5,585,089. számú USA-beli szabadalmi leírást). Donor-aminosavak kiválasztására kritériumokat leírtak az 5,585,089. számú USA-beli szabadalmi leírásban, például az 5,585,089. számú USA-beli szabadalmi leírás 12-16. oszlopában, amelyek tartalmát a kitanítás részének tekintjük. Immunoglobulin-láncok, beleértve ellenanyagok humanizálására Padlan és munkatársai leírtak más technikákat is (EP 519596 A1. számú európai közzétételi irat, közzétéve 1992. december 23.).

Human LFA-3 vagy CD2 ellen termeltetett, humán monoklonális ellenanyagokat (mAb-
ket) az egerben működő rendszer helyett inkább a teljes humán immunrendszert hordozó,
transzgenikus egerek alkalmazásával lehet termeltetni. A kérdéses antigénnel immunizált, ilyen
transzgenikus egerekből származó splenocitákat alkalmazzuk olyan hibridómák előállítására,
5 amelyek humán fehérjéből származó epitópokra specifikus affinitást mutató, humán mAb-
ket szekretálnak [lásd például Wood és mtsai., WO 91/00906. számú nemzetközi közzétételi irat;
Kucherlapati és mtsai., PCT/WO 91/10741. számú nemzetközi közzétételi irat; Lonberg és
mtsai., WO 92/03918. számú nemzetközi közzétételi irat; Kay és mtsai., WO 92/03917. számú
nemzetközi közzétételi irat; Lonberg, N. és mtsai., *Nature* **368**, 856-859 (1994); Green, L. L.
10 és mtsai., *Nature Genet.* **7**, 13-21 (1994); Morrison, S. L. és mtsai., *Proc. Natl. Acad. Sci.*
USA **81**, 6851-6855 (1994); Bruggeman és mtsai., *Year Immunol.* **7**, 33-40 (1993); Tuaillon
és mtsai., *PNAS* **90**, 3720-3724 (1993); Bruggeman és mtsai., *Eur. J. Immunol.* **21**, 1323-1326
(1991)].

Monoklonális ellenanyagokat elő lehet állítani rekombináns DNS-technológia területén
15 jártas szakember számára ismert, más módszerekkel is. Adott antigén-specifitással rendelkező
ellenanyag-fragmensek azonosítására és izolálására kifejlesztettek egy alternatív módszert,
melyet "kombinatorikus ellenanyag-display" módszernek neveznek, és amelyet monoklonális
ellenanyagok előállítására lehet alkalmazni [kombinatorikus ellenanyag-"display" leírása céljá-
ból lásd például: Sastry és mtsai., *PNAS* **86**, 5728 (1989); Huse és mtsai., *Science* **246**, 1275
20 (1989); és Orlandi és mtsai., *PNAS* **86**, 3833 (1989)]. Egy állatot immunizálunk a fentebb le-
írtak szerint, azután az eredményül kapott B-sejtkészlet ellenanyag-repertoárját klónozzuk.
Általánosan ismertek olyan eljárások, amelyek immunoglobulin-molekulák különféle populáci-
óinak variábilis régióit kódoló DNS-szekvenciák előállítására szolgálnak, láncindító oligomer-
keverék és PCR alkalmazásával. Például az 5'-végi vezetőszekvenciának (szignálpeptidnek)
25 és/vagy 1. vázrégió (FR1) szekvenciájának megfelelő, kevert láncindító oligonukleotidokat,
valamint konzervatív, 3'-végi konstans régióinak megfelelő, láncindító oligonukleotidokat lehet
alkalmazni számos, rágcsálóból származó, nehéz és könnyű láncban lévő, variábilis régió PCR-
amplifikálására [Larrick és mtsai., *Biotechniques* **11**, 152-156 (1991)]. Hasonló stratégiát lehet
alkalmazni humán ellenanyagokból származó, humán nehéz és könnyű láncban lévő, variábilis
30 régiók amplifikálására [Larrick és mtsai., *Methods: Companion to Methods in Enzymology* **2**,
106-110 (1991)].

A találmány egy szemléltetés célját szolgáló, előnyös megvalósítási módja szerint,
RNS-t izolálunk B-limfocitákból, például perifériás vérsejtekből, csontvelőből vagy lép-

preparátumokból standard eljárások szerint [4,683,202. számú USA-beli szabadalmi leírás; Orlandi és mtsai., PNAS 86, 3833-3837 (1989) Sastry és mtsai., PNAS 86, 5728 (1989); és Huse és mtsai., Science 246, 1275 (1989)]. Az első szál cDNS-t a nehéz lánc(ok) konstans régiójára és az egyes κ - és λ -láncokra specifikus láncindító oligonukleotidok, valamint a szignál-szekvenciára specifikus láncindító oligonukleotidok alkalmazásával szintetizáljuk. Variábilis régióra specifikus PCR láncindító oligonukleotidok alkalmazásával, mind a nehéz lánc, mind a könnyű lánc variábilis régióit amplifikáljuk, külön-külön vagy kombinációban, és megfelelő vektorokba ligáljuk további manipuláció céljára, „display”-csomagok előállítása céljából. Amplifikációs eljárásban alkalmazható láncindító oligonukleotidok lehetnek egyediek vagy degeneráltak, vagy tartalmazhatnak inozint degenerált pozíciókban. Restrikciós endonukleáz hasítóhely-szekvenciákat is beépíthetünk a láncindító oligonukleotidokba, amely lehetővé teszi az amplifikált fragmens klónozását egy vektorba, expresszió céljából előre meghatározott leolvasási fázisban.

Az immunizálásból származó ellenanyag-repertoárból klónozott V-génkönyvtárat expresszálni lehet „display”-csomag-populációval, amelyek előnyösen filamentumos fágból származnak, ellenanyag „display”-könyvtár kialakítása céljából. Ideális esetben, a „display”-csomag olyan rendszert tartalmaz, amely lehetővé tesz mintavételt nagyon nagy, variált ellenanyag „display”-könyvtárakból, gyors osztályozást az egyes affinitásra alapuló elválasztási ciklusok után, és tisztított „display”-csomagokból ellenanyag-gének könnyű izolálását. Fág-„display” könyvtárak előállítására szolgáló, kereskedelmi forgalomban lévő reagenskészleteken (például Pharmacia cégtől „Recombinant Phage Antibody System”, katalógus-szám: 27-9400-01; és a Stratagene cégtől „*SurfZAP*TM Phage Display Kit”, katalógus-szám: 240612) kívül, variált ellenanyagokat tartalmazó „display”-könyvtár előállítására alkalmazható eljárásokat és reagensket például az alábbi közleményekben találhatunk: Ladner és mtsai., 5,223,409. számú USA-beli szabadalmi leírás; Kang és mtsai., WO 92/18619. számú nemzetközi közzétételi irat; Dower és mtsai., WO 91/17271. számú nemzetközi közzétételi irat; Winter és mtsai., WO 92/20791. számú nemzetközi közzétételi irat; Markland és mtsai., WO 92/15679. számú nemzetközi közzétételi irat; Breitling és mtsai., WO 93/01288. számú nemzetközi közzétételi irat; McCafferty és mtsai., WO 92/01047. számú nemzetközi közzétételi irat; Garrard és mtsai., WO 92/09690. számú nemzetközi közzétételi irat; Ladner és mtsai., WO 90/02809. számú nemzetközi közzétételi irat; Fuchs és mtsai., Bio/Technology 9, 1370-1372 (1991); Hay és mtsai., Hum. Antibod. Hybridomas 3, 81-85 (1992); Huse és mtsai., Science 246, 1275-1281 (1989); Griffiths és mtsai., EMBO J. 12, 725-734 (1993); Hawkins és mtsai., J. Mol. Biol. 226,

889-896 (1992); Clackson és mtsai., *Nature* 352, 624-628 (1991); Gram és mtsai., *PNAS* 89, 3576-3580 (1992); Garrad és mtsai., *Bio/Technology* 9, 1373-1377 (1991); Hoogenboom és mtsai., *Nuc. Acids Res.* 19, 4133-4137 (1991); és Barbas és mtsai., *PNAS* 88, 7978-7982 (1991).

5 A találmány bizonyos előnyös megvalósítási módjai szerint, a nehéz és könnyű láncok V-régióját felépítő doméneket ugyanazon a polipeptiden lehet expresszálni, egy flexibilis linkerrel összekapcsolva, egyláncú Fv-fragmentet kialakítva, és ezt követően az scFv-gént a kívánt expressziós vektorba vagy fág-genomba lehet klónozni. McCafferty és munkatársai által általánosságban leírtak szerint [*Nature* 348, 552-554 (1990)], az ellenanyag teljes V_H - és V_L -
10 doménjeit flexibilis $(Gly_4-Ser)_3$ -linkerrel összekapcsolva lehet alkalmazni egyláncú fehérje előállítására, amely a „display”-csomagot antigén-affinitás alapján teszi elválaszthatóvá. Az izolált, antigénnel immunreaktív scFv-ellenanyagokat azután gyógyászati készítményekbe lehet formázni, az eljárásban történő alkalmazásra.

Ha egy „display”-csomag (például filamentumos fág) felszínén bemutatásra került, az
15 ellenanyag-könyvtárat az antigénnel vagy peptidfragmentjével szkrínálni lehet olyan csomagok azonosítása és izolálása céljából, amelyek az antigénre specifikus ellenanyagot expresszálnak. A kiszelektált ellenanyagot kódoló nukleinsavat ki lehet nyerni a „display”-csomagból (például a fág-genomból), és szubklónozni lehet más expressziós vektorokba, standard rekombináns DNS-technikák alkalmazásával.

20 Felszíni fehérjére nagy affinitással rendelkező, specifikus ellenanyagokat szakember által ismert eljárásokkal lehet előállítani, például olyanokkal, amelyekben könyvtárakat szkrínálnak [Ladner, R. C. és mtsai., 5,233,409. számú USA-beli szabadalmi leírás; Ladner, R. C. és mtsai., 5,403,484. számú USA-beli szabadalmi leírás]. Továbbá, az ilyen könyvtárakat alkalmazó eljárásokkal olyan kötő-determinánsokra lehet szkrínálni, amelyek ellenanyagok struktu-
25 rális determinánsait mimetizálják.

Különösen egy adott ellenanyag-molekula Fv-kötőfelszíne képes kölcsönhatásba lépni cél-ligandumával, a fehérje-fehérje kölcsönhatások elvei szerint, ezért V_H - és V_L -domének (az utóbbi lehet κ - vagy λ -típusú) szekvencia-adatai jelentik az alapját a fehérje-tervezési technikáknak, melyek szakember által ismertek. A kötő-determinánsokat tartalmazó fehérje-felszín
30 részleteihez az ellenanyag szekvencia-információból juthatunk modellezési eljárás alkalmazásával, más ellenanyagokra NMR-vizsgálatokkal vagy krisztallográfiás adatokból már meghatározott háromdimenziós struktúrák alkalmazásával [lásd például Bajorath, J. és S. Sheriff, *Proteins: Struct. Funct. and Genet.* 24, 152-157 (1996); Webster, D. M. és A. R. Ress,

“Molecular modeling of antibody-combining sites”, szerk. S. Paul, “Methods in Molecular Biol” 51. kötet, “Antibody Engineering Protocols”, Humana Press, Totowa, NJ, 17-49. old.; és Johnson, G, Wu, T. T. és E. A. Kabat, „Seqhunt: A program to screen aligned nucleotide and amino acid sequences”, „Methods in Molecular Biol.” című könyvben, 51. kötet, 1-15. old. (1995)].

Antigénkötő régióhoz juthatunk úgy is, hogy különböző típusú kombinatorikus könyvtárakat szkrínelünk egy kívánt kötési aktivitással, és azonosítjuk az aktív fehérjefajtákat, leírt eljárások alkalmazásával.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, variált peptidkönyvtárat expresszálni lehet “display”-csomagokat tartalmazó populációval, peptid “display”-könyvtár kialakítása céljából. Ideális esetben, a “display”-csomag olyan rendszert tartalmaz, amely lehetővé tesz mintavételt nagyon nagy, variált peptid “display”-könyvtárakból, gyors osztályozást az egyes affinitásra alapuló elválasztási ciklusok után, és tisztított “display”-csomagokból peptidet kódoló gének könnyű izolálását. Peptid-“display” könyvtárak lehetnek például prokarióta organizmusokban és vírusokban, amelyeket gyorsan lehet amplifikálni, viszonylag könnyű manipulálni, és amelyek lehetővé tesznek nagyszámú klón előállítását. Előnyösen alkalmazott „display”-csomagok lehetnek például vegetatív baktériumsejtek, baktériumspórák, és legelőnyösebben bakteriális vírusok (különösen DNS-vírusok). Szintén a találmány tárgyát képezi eukarióta sejtek, beleértve élesztősejtek és spóráik alkalmazása potenciális „display”-csomaggént. Fág-„display” könyvtárakat fentebb leírtunk.

Más technika lehet affinitáskromatográfia alkalmas „receptorral”, kötőágensek izolálására, azután az izolált kötőágenseket vagy ligandumokat szokásosan alkalmazott technikákkal lehet azonosítani (például tömegspektrometriával és NMR-el). A szolubilis receptor előnyösen egy jelöléshez van konjugálva (például fluorofórokhoz, kolorimetriás enzimekhez, radioaktív izotópokhoz vagy lumineszcens vegyületekhez), amelyeket detektálni lehet a ligandumkötés kimutatása céljából. Más módszer szerint, az immobilizált komponenseket szelektíven felszabadítjuk, és hagyjuk, hogy membránon keresztül diffundáljanak, hogy egy receptorral kölcsönhatásba lépjenek.

Kombinatorikus vegyület-könyvtárakat „toldalékokkal” is lehet szintetizálni, hogy a könyvtár egyes tagjainak azonosságát kódoljuk [lásd például W. C. Still és mtsai., WO 94/08051. számú nemzetközi közzétételi irat]. Ebben a módszerben általában olyan inert, de könnyen detektálható toldalékokat alkalmazunk, amelyek a szilárd hordozóhoz vagy a vegyületekhez vannak kapcsolva. Ha aktív vegyületet detektálunk, a vegyület azonosságát az egyedi

kísérő toldalék azonosításával lehet meghatározni. Ez a toldalékot alkalmazó módszer lehetővé teszi nagyméretű vegyület-könyvtárak szintézisét, amelyekben nagyon kis mennyiségben lehet vegyületeket azonosítani a könyvtárban lévő összes vegyület között.

A találmány szerinti megoldásban olyan anti-CD2- és anti-LFA-3-ellenanyag-homológokat is lehet alkalmazni, amelyek nem intakt ellenanyagok. Ilyen homológok származhatnak a fentebb leírt, bármelyik ellenanyag-homológból. Például a fentebb leírt ellenanyagokból származó, antigénkötő fragmensek, valamint teljes hosszúságú monomer, dimer vagy trimer polipeptidek maguk is alkalmazhatók. Ilyen típusú alkalmas ellenanyag-homológok (i) Fab-fragmens, amely VL-, VH-, CL- és CH1-doménekből álló monovalens fragmens; (ii) F(ab')₂-fragmens, amely két Fab-fragmenst tartalmazó bivalens fragmens, a kapocsrégiónál diszulfid-híddal összekapcsolva; (iii) Fd-fragmens, amely VH- és CH1-doménekből áll; (iv) Fv-fragmens, amely egykarú ellenanyag VL- és VH-doménjeiből áll; (v) dAb-fragmens [Ward és mtsai., *Nature* 341, 544-546 (1989)], amely VH-doménből áll; és (vi) izolált, komplementeritást meghatározó régió (CDR). Továbbá, bár az Fv-fragmens két doménjét, VL-t és VH-t két külön két kódolja, rekombinás módszerekkel össze lehet azokat kapcsolni egy szintetikus linker alkalmazásával, amely lehetővé teszi, hogy ezekből egyetlen fehérjelánc alakuljon ki, amelyben a VL- és VH-régió-párok monovalens molekulákat alakítsanak ki (egyláncú Fv-ként, azaz scFv-ként is ismert) [lásd például Bird és mtsai., *Science* 242, 423-426 (1988); és Huston és mtsai., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1988)]. Ilyen egyláncú ellenanyagokra szintén érvényes a leírásban használt, egy ellenanyag „antigénkötő fragmense” kifejezés. Ilyen ellenanyag-fragmensekhez szakember által ismert, szokásosan alkalmazott technikákkal juthatunk, és a fragmenseket ugyanúgy szkríneljük, mint az intakt ellenanyagokat. Anti-LFA-3-ból származó nehéz láncok előnyösen alkalmazhatók anti-LFA-3-ellenanyag-fragmensként.

Ellenanyag-fragmenseket előállíthatunk kémiai módszerekkel is, például egy intakt ellenanyag proteázos, például pepszines vagy papainos hasításával, és adott esetben a hasított terméket redukáló ágenssel kezeljük. Más módszer szerint, alkalmas fragmenseket úgy állíthatunk elő, hogy rövidített nehéz és/vagy könnyű láncot kódoló génekkel transzformált gazdaszöveteket alkalmazunk. Nehéz és könnyű lánc monomereket úgy állíthatunk elő, hogy intakt ellenanyagot redukáló ágenssel, például ditiotreitollal kezelünk, azután tisztítással választjuk el a láncokat. Nehéz és könnyű lánc monomereket szintén előállíthatunk olyan DNS-t tartalmazó gazdaszövet alkalmazásával, amely a kívánt nehéz láncot vagy könnyű láncot, de nem mindkettőt kódolja. Lásd például: Ward és munkatársai, *Nature* 341, 544-46 (1989); Sastry és munkatársai, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 5728-32 (1989).

Szolubilis CD2- és LFA-3-poliipeptidek

LFA-3 és CD2 kölcsönhatását modulálni képes, szolubilis LFA-3-poliipeptidek vagy szolubilis CD2-poliipeptidek alkalmazhatók a találmány szerinti eljárásokban. Szolubilis LFA-3-poliipeptideket részesítünk előnyben.

5 Szolubilis LFA-3-poliipeptidek származhatnak az LFA-3 transzmembrán formájából, különösen az extracelluláris doménből (például a 6,162,432. számú USA-beli szabadalmi leírásban közölt, 2. azonosítószámú szekvencia 1-187. aminosavai, amely szabadalmi leírást a kitanítás részének tekintünk). Ilyen poliipeptideket leírnak a 4,956,281. számú USA-beli szabadalmi leírásban és a 07/667,971. sorozatszámú USA-beli szabadalmi bejelentésben (amelyek
10 általunk benyújtott szabadalmi bejelentések), amelyeket a kitanítás részének tekintünk. Előnyös szolubilis LFA-3-poliipeptid a a 6,162,432. számú USA-beli szabadalmi leírásban (melyet a kitanítás részének tekintünk) közölt, 2. azonosítószámú szekvencia 1-92. aminosavait, a 2. azonosítószámú szekvencia 1-80. aminosavait, a 2. azonosítószámú szekvencia 50-65. aminosavai és a 2. azonosítószámú szekvencia 20-80. aminosavait tartalmazza. A 2. azonosítószámú szekvenciát kódoló DNS-szekvenciát (1. azonosítószámú szekvencia) tartalmazó vektort deponálunk az „American Type Culture Collection”-ban (Rockville, Maryland), 75107. nyilvántartási számon, ahol az 1. és 2. azonosítószámú szekvenciát a 6,162,432. számú USA-beli szabadalmi leírásban közzétették, amelyet a kitanítás részének tekintünk.

Az említett fehérjetípusok közül a legelőnyösebben alkalmazható fúziós fehérjék érett
20 LFA-3 92, amino-terminális aminosavát, humán IgG1 kapocsrégiójának 10, C-terminális aminosavát (amelyek feltételezhetően a láncok közötti diszulfid-kötésben résztvevő, két ciszteint tartalmaznak) és humán IgG₁ nehéz lánc konstans doménjéből származó CH₂- és CH₃-régiókat (például 8. azonosítószámú szekvenciát) tartalmazzák. Ezt a fúziós fehérjét a leírásban „LFA3TIP”-nek nevezzük. A példaként bemutatott LFA3TIP-et kódoló pSAB152-plazmidot
25 az „American Type Culture Collection”-ban deponáltuk (Rockville, Maryland), 68720. nyilvántartási számon. A pSAB152-inszert 7. azonosítószámú DNS-szekvenciával rendelkezik. A 7. és 8. azonosítószámú szekvenciát a 6,162,432. számú USA-beli szabadalmi leírásban közzétették, amelyet a kitanítás részének tekintünk.

Az LFA-3TIP hosszabb splicing variánsának aminosav-szekvenciája és nukleotidszekvenciája a 6,162,432. számú USA-beli szabadalmi leírás 1. ábráján látható. A hosszabb LFA-3TIP-variáns szignálpeptidje megfelel az 1. ábrán, az 1-28. aminosavaknak; az érett LFA-3-régió megfelel az 1. ábrán a 29-120. aminosavaknak; és az IgG1-régió megfelel az 1. ábrán, a 121-351. aminosavaknak. A hosszabb LFA-3TIP splicing variánsa abban különbözik a rövi-

debb variánstól, hogy hat aminosav hozzá van adva a C-terminális véghez.

LFA3TIP előállításának egyik módjának leírása megtalálható az általunk benyújtott, egyidejűleg függő 07/770,967. sorozatszámú USA-beli szabadalmi bejelentésben. Általánosan leírva, pSAB152-vel transzfectált COS7- és CHO-sejtek kondicionált tenyésztő tápközegét
5 AMICON SIY30 spirál kazetta- („cartridge”-) rendszerrel (AMICON, Danvers, Massachusetts) töményítettük, és Protein-A-Sepharose-4B-n kromatografáltuk (Sigma, St. Louis, Missouri). A kötődött fehérjéket eluáltuk, és Superose-12 (Pharmacia/LKB, Piscataway, New Jersey) alkalmazásával géliszűrtük.

A legkevésbé szennyezett [melyet SDS-PAGE-géleken és Western-blot analízissel határoztunk meg, lásd például Towbin és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 4350-54 (1979);
10 „Antibodies: A Laboratory Manual”, 474-510. old., Cold Spring Harbor Laboratory (1988)], LFA3TIP-et tartalmazó Superose-12-frakciókat egyesítettük, és YM30 Centricon (AMICON) alkalmazásával töményítettük. LFA3TIP-et Western-blotban detektáltunk nyúlból származó, anti-LFA-3 poliklonális antiszérum, azután detektálhatóan jelölt, kecskében termeltetett anti-
15 nyúl IgG alkalmazásával. A COS7- vagy CHO-sejtekből tisztított LFA3TIP két monomer LFA-3-Ig fúziós fehérje dimerje, melyet diszulfid-kötések kapcsolnak össze.

Más előnyösen alkalmazható fúziós fehérje az LFA3 első és második doménjét tartalmazza humán IgG1 kapocs-, C_H2- és C_H3-régiójához fuzionálva, melyet a leírásban LLFA3-Ig-nek nevezünk.

20 Szolubilis LFA-3-poliipeptidek származhatnak az LFA PI-kapcsolt formájából is, például olyanokból, amelyet a WO 90/02181. számú nemzetközi közzétételi iratban leírnak. PI-kapcsolt LFA-3-at kódoló DNS-szekvenciát tartalmazó vektort (azaz amely 3. azonosítószámú szekvenciát tartalmaz) deponáltunk az „American Type Culture Collection”-ban (Rockville, Maryland) 68788. nyilvántartási számon. Nyilvánvaló, hogy az LFA-3 PI-kapcsolt formája és
25 az LFA-3 transzmembrán formája azonos aminosav-szekvenciával rendelkezik az egész extracelluláris doménben. Ennek megfelelően, az előnyös, PI-kapcsolt, szolubilis LFA-3-poliipeptidek ugyanazok, mint LFA-3 transzmembrán formája.

Szolubilis CD2-poliipeptidek származhatnak teljes hosszúságú CD2-ből, különösen az extracelluláris doménből (például a 6. azonosítószámú szekvencia 1-185. aminosavai). Ilyen
30 poliipeptidek tartalmazhatják a CD2 extracelluláris doménjének egészét vagy részletét. Szolubilis CD2-poliipeptideket leírnak például a PCT WO 90/08187. számú nemzetközi közzétételi iratban, melyet a kitanítás részének tekintünk.

A találmány szerinti megoldásban alkalmazható, szolubilis polipeptideket szakember által ismert, különféle eljárásokkal állíthatjuk elő. Például, a polipeptideket intakt transzmembrán LFA-3- vagy CD2-molekulákból vagy intakt PI-kapcsolt LFA-3-molekulából származtathatjuk proteolízissel vagy specifikus endopeptidázok alkalmazásával, exopeptidázokkal, 5 Edman-lebontással vagy mindkettővel kombinációban. Az intakt LFA-3-molekula vagy az intakt CD2-molekula viszont természetes forrásaikból tisztítható, hagyományos módszerek alkalmazásával. Más módszer szerint, az intakt LFA-3-at vagy CD2-t előállíthatjuk ismert rekombináns DNS-technikákkal, cDNS-el alkalmazásával [lásd például Wallner és mtsai., 4.956,281. számú USA-beli szabadalmi leírás; Aruffo és Seed, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 10 2941-45 (1987); Sayre és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 2941-45 (1987)].

A találmány szerint alkalmazható, szolubilis polipeptideket közvetlenül állítjuk elő, így nem szükséges a teljes LFA-3-molekulát vagy a teljes CD2-molekulát kiindulási anyagként alkalmazni. Ezt szokásos kémiai szintézisteknikák vagy jól ismert rekombináns DNS-technikák alkalmazásával érhetjük el, amelyben csak olyan DNS-szekvenciákat expresszálunk transzformált gazdaszervezetekben, amelyek a kívánt peptideket kódolják. Például, a kívánt szolubilis 15 LFA-3-polipeptidet vagy szolubilis CD2-polipeptidet kódoló gént kémiai eszközökkel szintetizálhatjuk, oligonukleotid szintetizátor alkalmazásával. Ilyen oligonukleotidokat a kívánt szolubilis LFA-3-polipeptid vagy szolubilis CD2-polipeptid aminosav-szekvenciájára alapozva tervezünk. A kívánt peptidet kódoló, konkrét DNS-szekvenciákat a teljes hosszúságú DNS-szekvenciából is származtathatjuk, specifikus restrikciós endonukleázos hasítással kialakuló 20 fragmensek izolálásával vagy a konkrét régió PCR-szintézisével.

Standard módszereket lehet alkalmazni a találmány szerint megoldásban alkalmazható szolubilis LFA-3-polipeptidet vagy szolubilis CD2-polipeptidet kódoló gén szintetizálására. Például a teljes aminosav-szekvenciát lehet alkalmazni „vissza-transzlált” gén előállítására. A 25 találmány szerint megoldásban alkalmazható szolubilis LFA-3-polipeptidet vagy szolubilis CD2-polipeptidet kódoló nukleotidszekvenciát tartalmazó DNS-oligomert megszintetizálhatjuk egyetlen lépésben. Más módszerben, a kívánt polipeptid részeit kódoló, néhány kisebb oligonukleotidot szintetizálhatunk, és azután ligálhatjuk azokat. A szolubilis LFA-3-polipeptidet vagy szolubilis CD2-polipeptidet előnyösen néhány különálló oligonukleotidként szintetizáljuk, 30 amelyeket azután egymáshoz kapcsolunk. Az egyedi oligonukleotidok tipikusan 5'- vagy 3'-végi túlnyúló szakaszokat tartalmaznak komplementer összeállítás céljából.

Ha az összeállítás megtörtént, az előnyös géneket restrikciós endonukleázok által felismerhető szekvenciák jellemzik (beleértve egyedi restrikciós helyeket, amelyek klónozó vagy

expressziós vektorban való közvetlen beépítésre szolgálnak), előnyösen olyan kódonokat veszünk figyelembe, amelyeket a gazdaszervezet használ, és a szekvenciából, ha átíródott, stabil, hatékonyan transzlálódó mRNS jön létre. A konstrukció helyességét nukleotid-szekvenálással, restrikciós térképezéssel és biológiailag aktív polipeptid alkalmas gazdaszervezetben való expresszáásával igazoljuk.

Szakember számára nyilvánvaló, hogy a genetikai kód degeneráltsága következtében, DNS-molekulák tartalmaznak sok más nukleotidszekvenciát, amelyek szintén képesek olyan szolubilis LFA-3-polipeptidet és CD2-polipeptidet kódolni, melyeket a fentebb említett, specifikus DNS-szekvenciák kódolnak. Ezek a degenerált szekvenciák kódolhatnak a találmány szerinti megoldásban szintén alkalmazható polipeptideket.

A DNS-szekvenciákat expresszálnak egysejtű gazdaszervezetben. Szakember számára jól ismert, hogy a transzfektált gén gazdaszervezetben való nagymértékű expressziója céljából a gént a kiválasztott gazdaszervezetben funkcionális transzkripció és transláció expressziós szabályzó szekvenciákkal kell működőképesen kapcsolni. Az expressziós szabályzó szekvenciákat és a kérdéses gént előnyösen expressziós vektor tartalmazza, amely továbbá bakteriális szelektálható markert és replikációs origót tartalmaz. Ha az expressziós gazdaszervezet eukarióta sejt, az expressziós vektornak még további expressziós markert kell tartalmaznia, amely az expressziós gazdaszervezetben alkalmazható.

A kívánt szolubilis polipeptideket kódoló DNS-szekvenciák kódolhatnak vagy nem kódolhatnak szignálszekvenciát. Ha az expressziós gazdaszervezet prokarióta, akkor általában előnyös, ha a DNS-szekvencia nem kódol szignálszekvenciát. Ha az expressziós gazdaszervezet eukarióta, általában előnyös, ha szignálszekvenciát kódol.

Amino-terminális metionin jelen lehet vagy nem lehet jelen az expresszált terméken. Ha a terminális metionint nem hasítja le az expressziós gazdaszervezet, akkor kívánt esetben kémiailag lehet eltávolítani standard technikák alkalmazásával.

Sokféle expressziós gazdaszervezet/vektor-kombinációt alkalmazhatunk. Eukarióta gazdaszervezetekben alkalmazható expressziós vektorok lehetnek például olyanok, amelyek SV40-ből, marhában előforduló papilloma-vírusból, adenovírusból vagy citomegalovírusból származó expressziós szabályzó szekvenciákat tartalmaznak. Bakteriális gazdaszervezetekben alkalmazható expressziós vektorok lehetnek ismert bakteriális plazmidok, például *E. coli*-ből származó plazmidok, például col-E1, pCRI, pBR322, pMB9 és származékaik, különféle gazdaszervezetben alkalmazható plazmidok, például RP4, fág-DNS-ek, például számos lambda-fág-származék, például NM989, és más DNS-fágok, például M13 és filamentumos egyszálú

DNS-fágok. Élesztősejtekben alkalmazható expressziós vektor lehet a 2 μ -plazmid és származékai. Rovarsejtekben alkalmazható expressziós vektor lehet például pVL941.

Továbbá, az igen sokféle expressziós szabályzó szekvenciák közül bármelyiket lehet alkalmazni ezekben a vektorokban. Ilyen alkalmas expressziós szabályzó szekvenciák lehetnek például a fentebb említett expressziós vektorok strukturális génjeivel asszociált, expressziós szabályzó szekvenciák. Alkalmas expressziós szabályzó szekvenciák lehetnek például SV40 vagy adenovírus korai és késői promóterei, a lac-rendszer, a trp-rendszer, a TAC- vagy TRC-rendszer, a lambda-fág fő operátor- és promóterrégiói, fd-burokfehérje szabályzó régiói, 3-foszfoglicerát kináz vagy más glikolitikus enzim promótere, savas foszfataz promóterei, például Pho5, élesztőből származó „a-mating” rendszer, és más szekvenciák, amelyekről ismeretes, hogy prokarióta vagy eukarióta sejtekben vagy vírusaikban lévő gének expresszióját képes szabályozni, valamint ezek különböző kombinációi.

Sokféle egysejtes gazdaszervezet alkalmazható. Ilyen gazdaszervezetek lehetnek jól ismert eukarióta és prokarióta gazdaszervezetek, például *E. coli*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces* törzsek, gomba-, élesztő- és rovarsejtek, például *Spodoptera frugiperda* (SF9), állat-sejtek, például CHO és egérsejtek, afrikai zöldmajomból származó sejtek, például COS1, COS7, BSC1, BSC40 és BMT10 sejtek, és humán sejtek, valamint növényi sejtek szövettenyészetben. Állat-sejt expressziója céljából CHO-sejteket és COS7-sejteket részesítünk előnyben.

Természetesen nyilvánvaló, hogy nem minden vektor és expressziós szabályzó szekvencia működik egyformán jól a leírás szerinti DNS-szekvenciák expresszálására. Az összes gazdaszervezet sem működik egyformán jól ugyanazzal az expressziós rendszerrel. Azonban szakember képes választani az említett vektorok, expressziós szabályzó szekvenciák és gazdaszervezetek közül, felesleges kísérletezés nélkül. Például vektor kiválasztása esetén a gazdaszervezetet kell figyelembe venni, mivel a vektornak abban kell replikálnia. Figyelembe kell venni a vektor kópiaszámát, a kópiaszám szabályozhatóságát, és a vektor által kódolt bármilyen más fehérje, például antibiotikum-marker expresszióját.

Expressziós szabályzó szekvenciák kiválasztásában szintén sokféle faktort figyelembe kell venni. Ilyen lehet például a szekvencia viszonylagos erőssége, kontrollálhatósága, kompatibilitása a tárgyalt DNS-szekvenciákkal, különösen potenciális szekunder struktúrák vonatkozásában. Egysejtű gazdaszervezeteket úgy kell kiválasztani, hogy figyelembe kell venni kompatibilitásukat a választott vektorral, a DNS-szekvenciák által kódolt termék toxicitását, szekréciós tulajdonságaikat, képesek-e kialakítani a szolubilis polipeptidek megfelelő konformáció-

ját, fermentációs vagy tenyésztési követelményeiket, és mennyire könnyű a DNS-szekvenciák által kódolt terméket tisztítani.

Az említett paraméterek alapján szakember képes kiválasztani különféle vektor/expressziós szabályzó szekvencia/gazdaszervezet kombinációkat, amely képes expresszálni a kívánt DNS-szekvenciát fermentációban vagy nagy mennyiségben végzett, állat- sejtenyészetben, például CHO-sejtekkel vagy COS7-sejtekkel.

Szolubilis LFA-3-polipeptideket vagy szolubilis CD2-polipeptideket fermentációs tenyészetből vagy sejtenyészetből lehet izolálni, szokásos módszerek bármelyikével. Szakember kiválaszthat megfelelő izolálási és tisztítási technikákat.

Míg 20 aminosavnál hosszabb, szolubilis LFA-3-polipeptid vagy szolubilis CD2-polipeptid előállítására rekombináns DNS-technikák előnyösek, rövidebb CD2- vagy LFA-3-polipeptid, amelyek körülbelül 20 aminosavnál kevesebbet tartalmaznak, előnyösen hagyományos kémiai szintézistechnikákkal állíthatók elő. A találmány szerinti megoldásban alkalmazható, szintetikus előállított polipeptid előnyösen extrém magas kitermeléssel állíthatók elő, és könnyen tisztíthatók.

Ilyen szolubilis LFA-3-polipeptideket vagy szolubilis CD2-polipeptideket folyadék-fázisú vagy szilárd fázisú peptidszintézissel lehet szintetizálni, és adott esetben, karboxipeptidázal lehet emésztetni (C-terminális aminosavak eltávolítása céljából) vagy manuálisan, Edman-lebontással lehet lebontani (N-terminális aminosavak eltávolítása céljából). A polipeptid megfelelő konformációjukat oxidatív körülmények között veszik fel („folding”), amely diszulfid-kötések kialakulásának kedvez, Kent által leírtak szerint [Ann. Rev. Biochem. 57, 95789 (1988)]. Az így előállított polipeptideket azután tisztítani lehet, általánosan ismert elválasztási technikákkal, előnyösen fordított fázisú HPLC alkalmazásával. Folyadék-fázisú szintézis alkalmazása előnyösen lehetővé tesz bizonyos aminosav-származékok, például O-szulfát-észter vagy tirozin közvetlen hozzáadását a növekvő polipeptid-lánchoz. Ez szükségtelemé tesz további származékképzési lépést, amelyben a találmány szerinti megoldásban alkalmazható polipeptid bármely csoportját módosítanánk.

LFA-3- és CD2-t mimetizáló vagy kismolekulájú ágensek

A találmány szerinti eljárásokban LFA-3-at és CD2-t mimetizáló ágensek is alkalmazhatók. Ezek az ágensek lehetnek peptid, szemipeptid vegyületek vagy nem-peptid vegyületek (például kisméretű szerves molekulák), amelyek CD2/LFA-3-kölcsönhatás inhibitorai. A legelőnyösebb CD2-t és LFA-3-at mimetizáló ágensek a CD2/LFA-3-kölcsönhatást legalább annyira gátolják, mint a 7A6-jelű, anti-LFA-3 monoklonális ellenanyag vagy a TS2/18-jelű,

anti-CD2 monoklonális ellenanyag (leírást lásd fentebb).

A találmány egy előnyös megvalósítási módjai szerint, a tesztágens kombinatorikus könyvtár, például peptid vagy szerves kombinatorikus könyvtár tagja. A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, több tesztkomponensen, például a könyvtár tagjain legalább 10,
 5 10^2 , 10^2 , 10^2 , 10^2 , 10^2 , 10^2 vagy 10^2 vegyületet értünk. A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a több tesztkomponens, például a könyvtár tagjai közös strukturális és funkcionális tulajdonságokkal rendelkeznek.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány tárgyát képezik LFA-3- és/vagy CD2-inhibitorokat tartalmazó könyvtárak. Kombinatorikus könyvtárak szintézise jól
 10 ismert, és a szakirodalomban összefoglalták [lásd például E. M. Gordon és mtsai., J. Med. Chem. 37, 1385-1401 (1994); DeWitt, S. H. és Czarnik, A., W., Acc. Chem. Res. 29, 114 (1996); Armstrong, R. W. és mtsai., Acc. Chem. Res. 29, 123 (1996); Ellman, J., Acc. Chem. Res. 29, 132 (1996); Gordon, E. M. és mtsai., Acc. Chem. Res. 29, 144 (1996); Lowe, G., Chem. Soc. Rev. 309 (1995); Blondelle és mtsai., Trends Anal. Chem. 14, 83 (1995); Chen és
 15 mtsai., J. Am. Chem. Soc. 116, 2661 (1994); 5,359,115., 5,362,899. és 5,288,514. számú USA-beli szabadalmi leírások; WO 92/10092., WO 93/09668., WO 91/07087., WO 93/20242. és WO 94/08051. számú nemzetközi közzétételi irat].

A találmány szerinti könyvtárakat sokféle módon elő lehet állítani, amelyek közül néhány szakember által ismert. Például „split-pool” stratégiát az alábbiak szerint lehet elvégezni:
 20 funkcióval ellátott polimer hordozó-gyöngyöket sok reakcióedénybe helyezünk; sokféle polimer hordozó alkalmas szilárd fázisú peptid-szintézisre, amelyek ismertek és némelyik kereskedelmi forgalomban van [lásd például M. Bodansky, “Principles of Peptide Synthesis”, 2. kiadás, Springer-Verlag, Berlin (1993)]. Az egyes gyöngy-alikvotokhoz különböző aktivált aminosav-oldatot adunk, és hagyjuk a reakciót lefolyni, amelyben sok immobilizált aminosavhoz jutunk,
 25 egy-egy fajtahoz reakcióedényenként. A származékká alakított gyöngy-alikvotokat azután mossuk, egyesítjük (“pool”-t készítünk, azaz rekombináljuk), és az egyesített gyöngyöket (“pool”-t) ismét elosztjuk, az egyes alikvotokat külön-külön reakcióedénybe helyezzük. Azután egy másik fajta, aktivált aminosavat adunk az egyes gyöngy-alikvotokhoz. A szintézis-ciklust addig ismételjük, amíg a kívánt hosszúságú peptidhez jutunk. Az egyes szintézis-ciklusokban hozzáadott aminosavat random választjuk ki; más módszerben az aminosavakat úgy
 30 választjuk ki, hogy “elfogult” könyvtárhoz jussunk, például olyan könyvtárhoz, amelyben az inhibitor bizonyos részleteit nem-random módon választjuk ki, például olyan inhibitor előállítására céljából, amely ismert strukturális hasonlóságot vagy homológiát mutat egy ismert peptid-

del, amely képes egy ellenanyaggal, például anti-idiotipikus ellenanyag antigénkötő helyével kölcsönhatásba lépni. Nyilvánvaló, hogy sokféle peptid-, peptidmimetikum- vagy nem-peptid-vegyület állítható elő könnyen ezzel a módszerrel.

5 A "split-pool" stratégia alkalmazásával olyan peptidkönyvtárhoz, például inhibitorokat tartalmazó könyvtárhoz jutunk, amelyet találmány szerinti tesztvegyületeket tartalmazó könyvtár előállítására lehet alkalmazni. Egy másik, szemléletes szintézisben "változatos könyvtárat" állíthatunk elő Hobbs DeWitt és munkatársai által [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 6909 (1993)] leírtak szerint. Más szintézismódszert, például "tea-filtertasak" technikát Houghten és munkatársai [lásd például Houghten és mtsai., Nature 354, 84-86 (1991)] által leírtak szerint
10 lehet alkalmazni találmány szerinti vegyületkönyvtárak szintetizálására.

Vegyületkönyvtárakat annak meghatározása céljából lehet szkrínelni, hogy a könyvtár valamelyik tagja rendelkezik-e a kívánt aktivitással, és ha igen, az aktív vegyületfajta azonosítása céljából. Kombinatorikus könyvtárak szkrínelését leírták [lásd például Gordon és mtsai., J. Med. Chem., mint fent]. Szolubilis vegyületkönyvtárakat affinitáskromatográfiával lehet
15 szkrínelni, alkalmas receptorral, a receptorhoz ligandumok izolálása céljából, azután az izolált ligandumokat szokásosan alkalmazott technikákkal lehet azonosítani (például tömegspektrometriával, NMR-el és hasonlóval). Az immobilizált vegyületeket úgy lehet szkrínelni, hogy a vegyületet érintkeztetjük egy szolubilis receptorral; a szolubilis receptor előnyösen egy jelöléshez van konjugálva (például fluorofórokhoz, kolorimetriás enzimekhez, radioaktív izotópokhoz
20 vagy lumineszcens vegyületekhez és hasonlókhöz), amelyeket detektálni lehet a ligandumkötés kimutatásához. Más módszer szerint, az immobilizált komponenseket szelektíven felszabadítjuk, és hagyjuk, hogy membránon keresztül diffundáljanak, hogy egy receptorral kölcsönhatásba lépjenek. A találmány szerinti könyvtárak szkrínelésére alkalmas vizsgálati eljárásokat például lentebb ismertetünk.

25 A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány szerinti vegyületeket arra lehet szkrínelni, hogy képesek-e kölcsönhatásba lépni CD2- vagy LFA-3-poliipeptiddel, amelyben vizsgáljuk az egyes vegyületek aktivitását, hogy képesek-e közvetlenül a polipeptidhez kötődni vagy gátolni CD2/LFA-3-kölcsönhatást, például úgy, hogy a tesztvegyületet inkubáljuk CD2- vagy LFA-3-poliipeptiddel és egy lizátummal, például T-sejt vagy
30 APC-sejt lizátumával, például több mérőhelyet tartalmazó tálcában, például standard 96 mérőhelyet tartalmazó tálcában. A találmány említett előnyös megvalósítási módja szerint, meg lehet határozni az egyes egyedi vegyületek aktivitását. Kontrollként olyan mérőhelyet vagy mérőhelyeket alkalmazunk, amely(ek) nem tartalmaznak tesztvegyületet. Inkubálás után meghatároz-

zuk az egyes tesztvegyületek aktivitását a mérőhelyek vizsgálatával. Így tehát több tesztvegyület aktivitását lehet meghatározni párhuzamosan.

A találmány még egy előnyös megvalósítási módja szerint, nagyszámú tesztvegyületet szimultán lehet tesztelni kötési aktivitásra. Például a tesztvegyületeket szilárd gyantán (gyöngyökön) lehet szintetizálni, „egy gyöngy – egy vegyület” szintézisben; a vegyületeket immobilizálni lehet a gyanta-hordozóra fotolabilis linkerrel keresztül. Azután több (akár 100.000 vagy több) gyöngyöt kombinálni lehet élesztősejtekkel, és szét lehet porlasztani sok „nano-cseppre”, amelyben egy-egy csepp egyetlen gyöngyöt tartalmaz (és ennél fogva egyetlen tesztvegyületet). A nano-cseppeket UV-fény hatásának tesszük ki, ami a vegyületek lehasadását eredményezi a gyöngyökről. Nyilvánvaló, hogy ez a vizsgálati eljárásforma lehetővé teszi sok tesztvegyületből álló könyvtárak szkrínelését gyors formában.

Kombinatorikus vegyület-könyvtárakat „toldalékokkal” is lehet szintetizálni, hogy a könyvtár egyes tagjainak azonosságát kódoljuk [lásd például W. C. Still és mtsai., 5,565,324. számú USA-beli szabadalmi leírás, és WO 94/08051. és WO 95/28640. számú nemzetközi közzétételi iratok]. Ebben a módszerben általában olyan inert, de könnyen detektálható toldalékokat alkalmazunk, amelyek a szilárd hordozóhoz vagy a vegyületekhez vannak kapcsolva. Ha aktív vegyületet detektálunk, a vegyület azonosságát az egyedi kísérő toldalék azonosításával lehet meghatározni. Ez a toldalékot alkalmazó módszer lehetővé teszi nagyméretű vegyület-könyvtárak szintézisét, amelyekben nagyon kis mennyiségben lehet vegyületeket azonosítani a könyvtárban lévő összes vegyület között.

A találmány előnyös megvalósítási módjai szerint, a találmány szerinti vegyület-könyvtárak legalább 30 vegyületet, előnyösebben legalább 100 vegyületet, és még előnyösebben legalább 500 vegyületet tartalmaznak. A találmány előnyös megvalósítási módjai szerint, a találmány szerinti vegyület-könyvtárak kevesebb, mint 10^9 vegyületet, előnyösebben kevesebb, mint 10^8 vegyületet, és még előnyösebben kevesebb, mint 10^7 vegyületet tartalmaznak.

Származtatott inhibitorok

A találmány szerinti eljárásokban leszármaztatott inhibitorok is alkalmazhatók CD2/LFA-3-kölcsönhatás inhibitoraiként, amelyben például a leírásban ismertetett, bármilyen ellenanyag-homológot, szolubilis CD2- és LFA-3-poliipeptidet, vagy CD2- és LFA-3-mimetizáló ágenszt funkcionálisan kapcsolunk (kémiai kötéssel, genetikai fúzióval vagy másképpen) egy vagy több, egymástól függetlenül kiválasztott molekulához az alábbiak közül: anti-LFA-3-ellenanyag-homológok, anti-CD2-ellenanyag-homológok, szolubilis LFA-3-poliipeptidek, szo-

lubilis CD2-poliptidek, CD2-t mimetizáló ágensek és LFA-3-at mimetizáló ágensek, citotoxikus ágensek és gyógyászati ágensek.

Az egyik típusú, ilyen leszármaztatott inhibitor két vagy több inhibitor (ugyanolyan típusú vagy különböző típusú) keresztkötésével állítjuk elő. Szolubilis keresztkötők lehetnek heterobifunkciós ágensek, amelyek két megkülönböztethető reaktív csoportot tartalmaznak megfelelő távtartóval elválasztva (például m-maleimidobenzoil-N-hidroxi-szukcinimid-észter) vagy homobifunkciós ágensek (diszukcinimidil-szuberát). Ilyen linkerek rendelkezésre állnak a Pierce Chemical Company cégnél (Rockford, Illinois).

A keresztkötés másik lehetősége előnyösen PI-kapcsolt szignálszekvencia PI-kapcsolt LFA-3-ban vagy fragmenseiben. Konkrétan, PI-kapcsolt szignálszekvenciát (például a 4. azonosítószámú szekvencia 162-212. aminosavai) kódoló DNS-t ligálunk a kívánt polipeptidet, előnyösen szolubilis LFA-3-poliipeptidet kódoló DNS-től szintézisirányban. Ha ezt a konstrukciót megfelelő eukarióta sejtben expresszáljuk, a sejt felismeri a PI-kapcsolt szignálszekvenciát, és kovalensen PI-t kapcsol a polipeptidhez. A PI hidrofób tulajdonságát azután úgy lehet kihasználni, hogy a polipeptidekből micelláris aggregátumok képződnek.

Olyan inhibitorok is hasznosak, amelyek egy vagy több, citotoxikus vagy gyógyászati ágenshez vannak kapcsolva. A találmány szerinti megoldásban alkalmazható gyógyászati ágensek lehetnek biológiailag aktív peptidek, polipeptidek és fehérjék, például CD2-től vagy LFA-3-tól különböző, humán polipeptidre specifikus ellenanyag-homológok, vagy ezek részletei. Alkalmas gyógyászati ágens és citotoxikus ágens lehet például ciklosporin-A, prednizolon, FK506, metotrexát, szteroidok, retinoidok, interferon vagy nitrogén-mustár.

Előnyösen alkalmazható inhibitorok gyógyászati ágenssel képzett származékai lehetnek például rekombinánsan termeltetett polipeptidek, amelyekben szolubilis LFA-3-poliipeptid, szolubilis CD2-poliipeptid, vagy peptidil-CD2-t vagy peptidil-LFA-3-at mimetizáló ágens van fuzionálva immunoglobulin nehéz lánc kapocsrégiójának egészéhez vagy részéhez, és nehéz lánc konstans régiójának egészéhez vagy részéhez. Ilyen fúziós fehérjék előállítására előnyös polipeptidek lehetnek szolubilis LFA-3-poliipeptidek. A legelőnyösebben olyan fúziós fehérjéket alkalmazunk, amelyekben az LFA-3 1-92. aminosavai (például a 2. azonosítószámú szekvenciából) vannak fuzionálva humán IgG1 kapocsrégiójának egy részletéhez (beleértve a kapocsrégió 10, C-terminális aminosavát, amely feltételezhetően két, láncok közötti diszulfidkötésben résztvevő ciszteint tartalmaz), és az IgG1 nehéz lánc konstans doménjének CH2- és CH3-régióihoz. Azt várjuk, hogy az ilyen fúziós fehérjék meghosszabbodott fél-életidővel rendelkeznek szérumban, és lehetővé váljon az inhibitor dimerizációja.

Kombinációs terápia

A kötőágenseket, például CD2- vagy LFA-3-kötőágenseket kombinációban lehet alkalmazni más terápiákkal, például fényterápiával (például UVA, UVB vagy PUVA); kemoterápiával (például metotrexát; retinoid; ciklosporin; etretinát); vagy topikális terápiákkal (például szteroid, vitamin, például D-vitamin, kátrány, antralin, makrolid, például makrolaktám, például tacrolimus vagy pimecrolimus). Ilyen kombinációs terápiákban a terápiás vagy profilaktikus ágensekből alacsonyabb dózisokat lehet alkalmazni.

A leírás használt, „kombinációban” történő beadás azt jelenti, hogy két (vagy több) különböző kezelést adunk az alanynak a rendellenességgel sújtott alany kezelése alatt, például két vagy több kezelést végzünk, miután az alanyban diagnosztizáltuk a rendellenességet, és mielőtt a betegséget meggyógyítottuk vagy elimináltuk. A találmány néhány előnyös megvalósítási módja szerint, az első kezelés még tart, amikor elkezdjük a másodikat, így a kettő átfedésben van. Ezt a leírásban néha „szimultán” vagy „egyidejű beadásnak” nevezzük. A találmány más előnyös megvalósítási módjai szerint, az első kezelés befejeződik, mielőtt a másik kezelés elkezdődik. A találmány néhány előnyös megvalósítási módja szerint, a kezelés hatékonyabb a kombinált beadás miatt. Például a második kezelés hatékonyabb, például ekvivalens hatás látható kisebb mennyiségben adott második kezelésre, vagy a második kezelés nagyobb mértékben csökkenti a tüneteket, mint ami akkor lenne látható, ha a második kezelést az első kezelés nélkül alkalmaznánk, vagy az első kezeléssel analóg szituáció lenne látható. A találmány néhány előnyös megvalósítási módja szerint, az ilyen típusú beadási módszerben egy tünet csökkenése, vagy a rendellenességgel kapcsolatos más paraméter, például IFN γ mennyiségének vagy termelésének csökkenése, T-sejtek apoptózisának indukálódása, vagy CD40L-expresszió mértékének csökkenése nagyobb mértékű, mint amit akkor figyelnénk meg, ha csak az egyik kezelést végeznénk a másik nélkül. A két kezelés hatása lehet részlegesen additív, teljesen additív, vagy nagyobb mértékű, mint additív. A beadás rendje lehet olyan, hogy az első kezelés hatása még detektálható, amikor a másodikat végezzük, például ha UVB-t alkalmazunk először, IFN γ mennyiségének csökkenése még detektálható, ha elkezdjük adagolni az LFA-3/Ig-fúziót.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, az első kezelés és a második kezelés 1, 2, 5, 10, 15 vagy 30 napon belül történik egymáshoz képest.

A leírásban ismertetett kötőágenseket bőr-rendellenességek, például pszoriázis esetén szokásos kezelésekkel együtt lehet alkalmazni. A kötőágenseket például beadhatjuk pszoriázis-terápiával egyidejű az megelőző vagy azt követő (szekvenciális) terápiában [összefoglaló iro-

dalmát lásd Koo, J., J. Am. Acad. Dermatol. 41, S25-8 (1999)]. A “szekvenciális terápia” olyan kezelési stratégiát jelent, amelyben konkrét terápiás ágenseket megfontolt sorrendben alkalmazunk a terápiás kimenetel optimalizálása céljából. A stratégia értelme pszoriázis esetén az, hogy egy krónikus betegség kezelése hosszú, fenntartott terápiát igényel, valamint a szimptómák gyors megszüntetését, és az, hogy pszoriázis kezelésre rendelkezésre álló, néhány 5 terápia alkalmasabb gyors gyógyításra, míg a többi alkalmasabb hosszú fenntartásra. Az egymást követő (szekvenciális) terápia 3 fő lépésből áll: (1) enyhítési vagy „quick-fix” fázis; (2) az átmeneti fázis; és (3) a fenntartási fázis.

Egymást követő (szekvenciális) szisztémás terápiában például gyorsan ható kiegészítő 10 ágenszt, például ciklosporint maximális dermatológiai dózisban (5 mg/kg naponta) vagy metotrexátot alkalmazunk. Körülbelül 1 hónappal később, az átmeneti fázisban fokozatosan CD2-kötőágenszt kezdünk adagolni és/vagy más kiegészítő ágenszt, például acitretint, fenntartó ágensként. Ha elértük a maximálisan tolerálható dózist CD2-kötőágensből és/vagy más kiegészítő ágensből, például acitretinből, a gyorsan ható kiegészítő ágenszt, például ciklosporint fokozatosan csökkentjük, és a CD2-kötőágenszt és/vagy másik kiegészítő ágenszt, például acitre- 15 cin adagolását folytatjuk hosszú távú fenntartásra. Ezt szükséges esetben fototerápiával (UVB vagy PUVA) kombinálhatjuk a betegség hatékonyabb leküzdése céljából.

A találmány más, szemléltetés célját szolgáló, előnyös megvalósítási módja szerint, a CD2-kötőágenszt hosszabb ideig lehet adni (például tizenkét hetes terápiás kezelési időtartam 20 alatt). A betegség átmeneti mérséklődése alatt vagy kevésbé aktív betegség esetén a CD2-kötőágenszt be lehet adni egyedül, vagy topikális ágenssel [amelyben például szteroidot, vitamint (például D-vitamint), kátrányt, antralint, makrolidot vagy makrolaktámot, például tacrolimust (FK506) vagy pimecrolimus-t) adunk be] és/vagy fototerápiával (például UVA, UVB vagy PUVA, de előnyösen UVB) kombinálva. Az aktív betegség ideje alatt gyorsan ható, 25 de toxikus kiegészítő ágenszt, például metotrexátot és/vagy ciklosporint lehet beadni rövid ideig.

Ascomicin-makrolaktám származékai, például pimecrolimus (1%-os ASM 981 krém) szelektív inhibitora gyulladást okozó citokineknek, és amelyet jelenleg gyulladásos bőrbetegségek, például atópiás dermatitisz, allergiás kontakt dermatitisz, irritáló kontakt dermatitisz és pszoriázis kezelésére alkalmaznak [Stuetz, A. és mtsai., Semin. Cutan. Med. Surg. 20, 233-241 30 (2001); Bornhovd, E. és mtsai., J. Am. Dermatol. 45, 736-743 (2001)].

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a CD2-kötőágenszt (például LFA-3/Ig-fúziót) vagy ilyen tartalmazó gyógyászati készítményt be lehet adni szisztémásan (például

intravénásan, intramuszkulárisan, szubkután, intraartikulárisan, intratekálisan, periosteálisan, intratumorálisan, a kóros elváltozásba, elváltozás körül infúzióval, például infúziós berendezés alkalmazásával, orálisan, topikálisan vagy inhalálással). A CD2-kötőágenst előnyösen intramuszkulárisan vagy intravénásan adjuk be. A találmány más előnyös megvalósítási módja szerint, a CD2-kötőágenst lokálisan (például topikálisan) adjuk be az érintett területre, például a pszoriázisos területre.

Fényterápia

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a leírás szerinti kötőágenst, például a leírás szerinti CD2-kötőágenst fototerápiával (melyet a leírásban „fényterápiának” is nevezünk) kombinációban adjuk be. A fényterápiában ultraibolya (UV) sugárzás bőr általi optikai abszorpciója gyorsan elpusztít sejteket és megállítja a proliferációt. Jelenleg UVA- és UVB-terápiát egyaránt hatékonyan és elterjedten alkalmaznak bőr-rendellenességek kezelésére, amelyben a bőrt 320-400 nm-es (UVA-sugárzás) vagy 290-320 nm-es (UVB-sugárzás) UV-sugárzás hatásának teszik ki. A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, az UVB-sugárzás tartománya 290-320 nm, és előnyösebben közeli hullámhossz-tartományba eső, 311 nm-es UVB-t alkalmaznak. A találmány más előnyös megvalósítási módja szerint PUVA-terápiát is lehet alkalmazni, amely egy fotokemoterápia-forma, amelyben pszoralént vagy pszoralén-alapú vegyületet többször alkalmaznak topikálisan a bőr érintett régióján, amelyet azután UVA-sugárzás hatásának tesznek ki. A találmány más előnyös megvalósítási módjai szerint, proliferatív bőrbetegségek, különösen pszoriázis és mycosis fungoides kezelésére fotodinamikus terápiát (PDT) lehet alkalmazni. Ebben az eljárásban fotoszenzibilizáló ágenst adnak be egy alanynak, amely egy olyan drog, melyet karcinóma-sejtek szelektíven visszatartanak. Fény (tipikusan 320 nm és 700 nm közötti, a drogtól függően) abszorpciója után a fotoszenzibilizáló ágens fotokémiai reakcióba megy, amelynek eredményeként citotoxikus atomos oxigén termelődik, amely végül a tumor érhálózata károsítja a bőrben [Anderson és mtsai., Arch. Dermatol. 128, 1631-1636 (1992)].

Sok esetben megismételjük a kezelést az egyikkel, vagy mindkettővel, a CD2-kötőágenssel, például LFA-3/IgG-fúzióval és fényterápiával, például UVB-vel. A CD2-kötőágenst be lehet adni egyenletes időközönként vagy egyenlőtlen időközönként. A CD2-kötőágenst be lehet adni 3-12-naponta, például hetente egyszer. A beadást meg lehet ismételni 3, 6, 12, 15, 24 vagy több alkalommal. A második kezelésből egy vagy több kúrát lehet végezni, például a fényterápia, például UVB-kezelés megelőzheti, követheti, vagy egyidejűleg végezhető a fúziós fehérjét alkalmazó kúrával.

Gyógyászati készítmények

5 A találmány tárgyát képezi eljárás a fentebb leírt bőr-rendellenességek prevenciójára vagy kezelésére, amelyben emlősszervezetnek beadunk egy vagy több CD2-kötőágenst, például a CD2/LFA-3-kölcsönhatás inhibitorait, vagy származtatott formáját (formáit), segédanyaggal kombinációban.

Előnyösen, a CD2-kötőágens vagy származtatott formájának hatásos mennyiségét adjuk be. A „hatásos mennyiség” kifejezésen akkora mennyiséget értünk, amely képes a leírás szerinti bőr-rendellenességek terjedésének vagy súlyosságának mértékét csökkenteni.

10 Szakember számára nyilvánvaló, hogy a CD2-kötőágens hatásos mennyisége függ, többek között a beadási rendtől, a beadott dózisegységtől, attól, hogy kombinációban adjuk-e be más terápiás ágenssel, a páciens immunológiai és egészségi állapotától, a beadott, konkrét CD2-kötőágens terápiás vagy profilaktikus aktivitásától és a szérumban töltött fél-életidejétől.

15 A CD2-kötőágenseket előnyösen körülbelül 0,001 és körülbelül 50 mg közötti mennyiségben adjuk be testtömeg-kg-ként, előnyösebben körülbelül 0,01 és körülbelül 10 mg közötti mennyiségben adjuk be testtömeg-kg-ként, legelőnyösebben körülbelül 0,1 és körülbelül 4 mg közötti mennyiségben adjuk be testtömeg-kg-ként.

20 A dózisegységeket addig kell adni, amíg hatás megfigyelhető. A hatást sokféle módszerrel lehet mérni, például *in vitro* T-sejt-aktivitási vizsgálati eljárásokkal és az érintett bőrfelület gyógyulásával. A dózisegységet előnyösen hetente körülbelül egy-három alkalommal, vagy naponta körülbelül egy-három alkalommal adjuk be. Előnyösebben naponta körülbelül egy-három alkalommal adjuk be, körülbelül 3-7 napig, vagy naponta körülbelül egy-három alkalommal adjuk be, körülbelül 3-7 napig havonta. Azonban nyilvánvaló, hogy alacsonyabb vagy magasabb dózisok és más beadási rend is alkalmazható.

25 A CD2-kötőágens(ek)e)t vagy származtatott formáját (formáit) előnyösen gyógyászati-lag elfogadható hordozót tartalmazó készítményben adjuk be. A „gyógyászati-lag elfogadható hordozó” kifejezésen a leírásban olyan hordozót értünk, amely nem okoz allergiás reakciót vagy más, kedvezőtlen hatásokat a páciensekben, akiknek azt beadjuk.

30 Alkalmas gyógyászati-lag elfogadható hordozó lehet például az alábbiak közül egy vagy több: víz, sóoldat, foszfát-pufferolt sóoldat, dextróz, glicerin, etanol és hasonló, valamint ezek kombinációi. Gyógyászati-lag elfogadható hordozók tartalmazhatnak továbbá kisebb mennyiségben segédanyagokat, például nedvesítő vagy emulgeáló ágenseket, tartósítószereket vagy puffereket, amely javítja a CD2-kötőágens életidejét vagy hatékonyságát.

A fentebb leírt gyógyászati készítményt vagy CD2-kötőágenst beadhatjuk más terápiás vagy profilaktikus ágenssel együtt. Ilyenek lehetnek például ciklosporin-A, szteroidok, retinoidok, nitrogén-mustár, interferon, metotrexát, antibiotikumok vagy antihisztaminok.

Ezeket az ágenseket be lehet adni egyetlen dózis formájában az inhibitorral (azaz ugyanabban gyógyászati készítményben, annak részeként), több dózis formájában elkülönítve az inhibítortól, de egyidejűleg, vagy több dózis formájában, ahol a két komponens külön-külön adjuk be, de egymás után. Más módszerben, a CD2-kötőágens és más hatóanyag lehet egyetlen konjugált molekula formájában. A két komponens konjugálását szakember által jól ismert, standard keresztkötési technikák alkalmazásával hajtjuk végre. Egyetlen molekula lehet rekombináns fúziós fehérje formájában. Továbbá, a találmány szerinti megoldásban hasznosan alkalmazható inhibitorokat, vagy gyógyászati készítményeket alkalmazhatjuk más terápiákkal, például PUVA-val, kemoterápiával és UV-fénnyel kombinációban. Ilyen kombinációs terápiákban előnyösen alacsonyabb dózisú terápiás vagy profilaktikus ágenseket lehet alkalmazni.

A CD2-kötőágens, vagy gyógyászati készítmény sokféle formában lehet. Ilyenek például szilárd, fél-szilárd és folyékony dózisformák, például tabletták, pirulák, porok, folyékony oldatok, diszperziók vagy szuszpenziók, liposzómák, kúpok, injektálható, infúzióban beadható és topikális preparátumok. Az előnyös forma a tervezett beadási módtól és terápiás alkalmazástól függ. Az előnyös formák injektálható vagy infúzióban beadható oldatok.

A találmány tárgyát képezik olyan formák, amelyeket topikálisan alkalmazható fényvédő krémek vagy UV-védő anyagok. A találmány előnyös megvalósítási módja szerint, a formák LFA3TIP-preparátumokat tartalmaznak. A hatóanyagot liposzómába lehet formázni. A terméket az UV-hatás előtt, alatt vagy után lehet felvinni, vagy a pír kialakulása előtt, alatt vagy után.

Reagenskészletek

A találmány tárgyát képezik egy másik vonatkozásában reagenskészletek, amelyek leírás szerinti CD-kötőágenst tartalmaznak kiegészítő ágenssel, például a leírásban ismertetett ágenssel kombinációban, és utasításokat arra vonatkozóan, hogyan alkalmazzunk ilyen ágenst.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a CD2/LFA-3-kölcsönhatás inhibitora LFA-3/Ig fúziós polipeptid. Az LFA-3/Ig fúziós polipeptid előnyösen liofilizálva van.

A találmány szerinti megoldást a továbbiakban az alábbi példákkal szemléltetjük, amelyekkel nem kívánjuk korlátozni a találmány által igényelt oltalmi kört. A bejelentésben idézett minden közleményt, függő szabadalmi bejelentést és közölt szabadalmi leírást kifejezetten a kitanítás részének tekintünk.

1. példa

IFN γ *in vitro* gátlása és CD25-mennyiségek csökkenése LFA3TIP együtt-tenyésztést követően

LFA3TIP-et *in vitro* vizsgálva, nem-pszoriázisos és pszoriázisos önkéntesektől vett, 5 perifériás vérből származó mononukleáris sejtek (PBMC) alkalmazásával kimutattuk IFN γ *in vitro* gátlását valamint CD25-mennyiségek csökkenését LFA3TIP-al való együtt-tenyésztést követően. IFN γ -mennyiségek csökkenésére utalt LFA3TIP-el kezelt páciensekből származó T-sejtek *in vivo* vizsgálata is. Abból kiindulva, hogy LFA3TIP szignifikáns hatással volt PMBC-kre *in vitro*, meghatároztuk, hogy LFA3TIP *in vivo* beadása hatással van-e a kezelt önkéntesekből származó PMBC-kre. Ebből a célból beépítettünk perifériás vérvételi lépést az eljárásba egyidejűleg az egyes keratóma-minták vételével, amely lehetővé tette IFN γ és CD25-mennyiségeinek vizsgálatát az LFA3TIP-el kezelt populációból származó PBMC-kben. PBMC-ket Ficoll alkalmazásával preparáltunk, és szakember által ismert PBMC-eljárás szerint stimuláltunk. Az *in vivo* LFA3TIP-el kezelt páciensekből kinyert PBMC-ken áramlási 10 citometriás kísérleteket végeztünk. A perifériás vérrel végzett kísérletek további 15 kísérleti pontot adtak a projekthez az egyes páciensek esetén. Ezek: festés CD3-ra, CD69-re, CD25-re, CD2-re, IFN-gammára, CD40L-re és Apo2.7-re. Továbbá vizsgáltuk a CD40L-expressziót is az *in vitro* kezelt páciensekből származó PBMC-ken.

2. példa

Humán LFA-3/IgG1 fúziós fehérje gátolja normál és pszoriázisos perifériás vérből származó T-sejtek IFN γ -termelését, és javítja UVB hatását

A pszoriázist részben aktivált T-sejtek által termelt gamma-interferon (IFN γ) mediálja. Alefacept (humán LFA-3/IgG1 fúziós fehérje, LFA3TIP, jelenleg fejlesztik a Biogen, Inc. cégnél, kereskedelmi név: AmeviveTM) inhibitor-hatásokat mutat T-sejteken *in vitro* és *in vivo*. 25 Alefacept-el végzett, 3. fázisban lévő klinikai kísérletek folynak pszoriázisos esetekben. UVB-
besugárzás maradt az egyik leghatékonyabb kezelés pszoriázisra, és korábban leírtuk, hogy egyetlen *in vivo* UVB-
besugárzás szelektíven képes T-sejtek IFN γ -termelését csökkenteni.

Alefacept T-sejtek IFN γ -termelésére kifejtett hatásainak vizsgálata céljából, normál egyénekből (n=7) vagy pszoriázisos páciensekből (n=7) származó PBMC-t aktiváltunk, és 30 IFN γ -termelést áramlási citometriával mértük. 8 μ g/ml alefacept-kezelt, nem-pszoriázisos PBMC-ben az IFN γ ⁺ T-sejtek száma 7-ből 5 esetben csökkent (20-90%-os csökkenés), 7-ből 1 esetben növekedett vagy 7-ből 1 esetben változatlan maradt. Pszoriázisos PBMC-ben 8 μ g/ml

alefacept-kezelés IFN γ -termelést csökkentett 7 tesztelt páciensből 6-ban, átlagosan $56 \pm 0,12\%$ -os csökkenéssel ($p < 0,005$). PBMC-populációt két részre lehetett osztani IFN γ -termelés alapján, IFN $\gamma^{+CD3^{+}}$ -at jól termelők ($>10\%$) és rosszul termelők ($<10\%$). Ha külön-külön vizsgáltuk, nem-pszoriázisos és pszoriázisos jól termelők egyaránt hatékonyan gátolhatók voltak 8 $\mu\text{g/ml}$ alefacept-el, 56% illetve 65% átlagos csökkenéssel, sorrendben. Ezzel ellentétben, a rosszul termelőket alig lehetett gátolni. Anti-Fc γ RI és RIII mAb-vel végzett előkezelés megszüntette az alefacept IFN γ -csökkentő hatását. Ha PBMC-populációkat előkezeltünk UVB-besugárzással ($0-20 \text{ ml/cm}^2$), az alefacept fokozta az UVB-indukált apoptózist, és tovább csökkentette az IFN γ mennyiségét 32,2%-al ($p=0,009$, $n=3$).

Ezek az eredmények azt mutatják, hogy alefacept gátolja T-sejtek IFN γ -termelését, Fc γ R-et hordozó sejtekkel való kölcsönhatás szükséges, és kombinálása UVB-vel hatékonyan bizonyulhat Th1-típusú sejtek számának és aktivitásának csökkentésében, pszoriázisos kóros elváltozásokban.

3. példa

Human LFA-3/IgG1 fúziós fehérjével végzett kezelés pszoriázis esetén csökkenti az infiltráló, IFN γ^{+} -termelő T-sejtek számát kórosan elváltozott bőrben

A pszoriázis krónikus, gyulladásos bőrbetegség, amelyet részben a kórosan elváltozott bőrben lévő T-sejtek (Th $_1$ irányba eltolt) által termelt IFN γ mediál. Alefacept (humán LFA-3/IgG1 fúziós fehérje, LFA3TIP, jelenleg fejlesztik a Biogen, Inc. cégnél, kereskedelmi név: AMEVIVETM) egy új rekombináns fehérje, amely CD3 $^{+}$ CD45RO $^{+}$ vérben lévő T-sejtek reverzibilis csökkentéséhez vezet.

Bőrben lévő T-sejtek hatásainak vizsgálata céljából, nyílt, III. fázisban lévő vizsgálatot végeztünk alefacept-el 6 páciensen, akiknek hetente egyszer IV beadunk 7,5 mg alefacept-et, 12 egymás követő héten. A CD3 $^{+}$ T-sejteket és IFN γ -termelő CD3 $^{+}$ populációt minden epidermális és dermális sejtben analizáltunk áramlási citometriával, és CD3 $^{+}$ vagy IFN γ CD3 $^{+}$ sejtsűrűségeket sejtszám/ mm^2 -ként számítottuk.

A 6 páciens közül 5-ben klinikai javulást tapasztaltunk a 13. héten, IFN γ -t termelő epidermális T-sejtek (IFN γ^{+} CD3 $^{+}$) sűrűsége a kiindulási helyzet ("alapvonal") $0,26 \pm 0,3 \%$ -ára csökkent. Az IFN γ^{+} CD3 $^{+}$ sejtek átlagos sűrűsége mind a 6 páciensben a kiindulási helyzetben $182 \pm 91/\text{mm}^2$, viszont ezzel szemben, hogy 12 hetes alefacept-kezelés után $77 \pm 45/\text{mm}^2$ ($p=0,05$) volt. Mind a 6 páciens esetén a PASI javulása összhangban volt az IFN γ^{+} CD3 $^{+}$ epidermális sejtek számában végbement változással (%), ahol $r=0,80$, $p=0,06$. Érdekes, hogy a

kezelés kezdeti fázisában néhány páciensben, a kóros elváltozásban a $\text{IFN}\gamma^+\text{CD3}^+$ T-sejtek száma átmenetileg megnövekedett a 3. héten, ami összhangban volt az epidermisz vastagságának növekedésével; mind az $\text{IFN}\gamma^+\text{CD3}^+$ T-sejtek, mind az epidermisz vastagsága csökkent a következő hetekben.

- 5 Eredményeink alapján feltételezzük, hogy az alefacept szignifikánsan csökkenti a beszűrődő Th1-típusú $\text{IFN}\gamma^+\text{CD3}^+$ T-sejtek számát, klinikai javulással társulva. Mivel feltételezzük, hogy $\text{IFN}\gamma$ egy kulcsfontosságú faktor pszoriázis patogenezisében, Th1-sejtek számának csökkentése döntő lépést jelenthet pszoriázis klinikai javulásában.

Deponálások

- 10 A találmány szerinti megoldáshoz példaként bemutatott, rágcsálóból származó hibridóma-sejteket és anti-LFA-3-ellenanyagokat a Budapesti Szerződés szerint az „American Type Culture Collection”-ban (Rockville, Maryland, USA) 1991. március 5-én deponáltuk, és az alábbiak szerint azonosítjuk:

	Jelölés	ATCC nyilvántartási szám
15	1E6	HB 10693
	HC-1B11	HB 10694
	7A6	HB 10695
	8B8	HB 10696

- 20 A transzmembrán LFA-3-at kódoló plazmidot tartalmazó bakteriofágot a Budapesti Szerződés szerint deponáltuk az „*In Vitro* International, Inc.”-nál (Linthicum, Maryland, USA), 1987. május 28-án, IVI-10133. nyilvántartási szám. Ezt a deponálást 1991. június 20-án átvittük az „American Type Culture Collection”-ba, és az alábbiak szerint azonosítjuk:

	Jelölés	ATCC nyilvántartási szám
25	$\lambda\text{HT16}[\lambda\text{gt10/LFA-3}]$	75107

- 25 PI-kapcsolt LFA-3-at kódoló plazmiddal transzformált *E. coli*t deponáltunk az „*In Vitro* International, Inc.”-nál (Linthicum, Maryland, USA), 1988. július 22-én, IVI-10180. nyilvántartási szám. Ezt a deponálást 1991. június 20-án átvittük az „American Type Culture Collection”-ba, és az alábbiak szerint azonosítjuk:

	Jelölés	ATCC nyilvántartási szám
30	p24	68788

Szekvenciák:

Az alábbiakban összefoglaljuk a 6,162,432. számú USA-beli szabadalmi leírásban bemutatott szekvenciákat:

1. azonosítószámú szekvencia: Transzmembrán LFA-3 DNS-szekvenciája
- 5 2. azonosítószámú szekvencia: Transzmembrán LFA-3 aminosav-szekvenciája
3. azonosítószámú szekvencia: PI-kapcsolt LFA-3 DNS-szekvenciája
4. azonosítószámú szekvencia: PI-kapcsolt LFA-3 aminosav-szekvenciája
5. azonosítószámú szekvencia: CD2 DNS-szekvenciája
6. azonosítószámú szekvencia: CD2 aminosav-szekvenciája
- 10 7. azonosítószámú szekvencia: LFA3TIP DNS-szekvenciája
8. azonosítószámú szekvencia: LFA3TIP aminosav-szekvenciája

Ekvivalensek:

15 Szakember képes felismerni, vagy rutin kísérleteknél nem bonyolultabb módszerekkel szakember képes kidolgozni a találmány leírásban ismertett, előnyös megvalósítási módjainak sok ekvivalensét. Ilyen ekvivalenseket lentebb, a szabadalmi igénypontokban ismertett, igényelt oltalmi körbe tartozónak tekintünk.

A találmány más előnyös megvalósítási módjait az alábbi, szabadalmi igénypontokban ismertetjük.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. CD2/LFA3-kölcsönhatás inhibitorának alkalmazása abnormális T-sejt-aktivitással vagy proliferációval jellemzett, epidermális vagy dermális rendellenesség kezelésére alkalmas gyógyszer előállítására, amelyben a gyógyszer közeli hullámhossz-tartományba eső UVB-besugárzással kombinációban adandó be.
2. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás, amely szerint az epidermális vagy dermális rendellenességet fokozott T-sejtes IFN- γ -termelés jellemzi.
3. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás, amely szerint az epidermális vagy dermális rendellenesség krónikus gyulladásos rendellenesség.
4. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás, amely szerint az epidermális vagy dermális rendellenesség autoimmun rendellenesség.
5. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás, amely szerint az epidermális vagy dermális rendellenesség pszoriázis.
6. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás, amely szerint a CD2/LFA-3-kölcsönhatás inhibitora CD2-kötőagens.
7. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás, amely szerint CD2/LFA-3-kölcsönhatás inhibitora LFA-3 CD2-kötő fragmense immunoglobulinhoz vagy fragmenséhez fuzionálva.
8. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás, amely szerint a CD2/LFA-3-kölcsönhatás inhibitora LFA-3/IgG fúziós polipeptid.
9. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás, amely szerint a gyógyszer emberben való alkalmazásra szolgál.
10. LFA-3 CD2-kötő fragmenséből és IgG konstans régiójából álló, fúziós polipeptid alkalmazása pszoriázis kezelésére alkalmas gyógyszer előállítására, amelyben a gyógyszer akkora mennyiségű, közeli hullámhossz-tartományba eső UVB-besugárzással kombinációban adandó be, amely elegendő interferon- γ mennyiségeinek csökkentésére egy alany epidermiszében.
11. CD2/LFA-3-kölcsönhatás inhibitorának alkalmazása gyulladásos rendellenesség elleni gyógyszer előállítására, amelyben a gyógyszer közeli hullámhossz-tartományba eső UVB-besugárzással kombinációban adandó be.
12. CD2/LFA-3-kölcsönhatás inhibitorának alkalmazása autoimmun rendellenesség elleni gyógyszer előállítására, amelyben a gyógyszer közeli hullámhossz-tartományba eső UVB-besugárzással kombinációban adandó be.

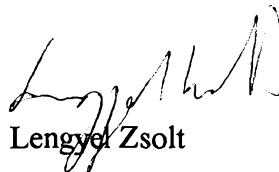
13. A 12. igénypont szerinti alkalmazás, amely szerint az autoimmun rendellenesség pszoriázis, cukorbetegség, artrítisz, reumatoid artrítisz, fiatalkori reumatoid artrítisz, oszteoartrítisz, pszoriázisos artrítisz, szklerózis multiplex, encefalomyelitisz, miaszténia gravisz, szisztémás lupusz eritematózus, autoimmun pajzsmirigy-gyulladás, dermatitisz, atópiás dermatitisz vagy ekcémás dermatitisz.

14. LFA-3 CD2-kötő fragmenséből és IgG konstans régiójából álló, fúziós polipeptid alkalmazása atópiás dermatitisz kezelésére alkalmas gyógyszer előállítására, amelyben a gyógyszer akkora mennyiségű, közeli hullámhossz-tartományba eső UVB-besugárzással kombinációban adandó be, amely elegendő interferon- γ mennyiségeinek csökkentésére egy alany epidermiszében.

A meghatalmazott:

DANUBIA

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.


Lengyel Zsolt

szabadalmi ügyvivőjelölt

51 oldal leírás
1 oldal ábra
12 oldal utóirat

69 oldal
Zsolt Lengyel

PCT/US02/02314

1/1

LFA-3 szignálszekvencia

1 ATG GTT GCT GGG AGC GAC GCG GGG CGG GCC CTG GGG GTC CTC AGC GTG GTC TGC
 1Met Val Ala Gly Ser Asp Ala Gly Arg Ala Leu Gly Val Leu Ser Val Val Cys
 55 CTG CTG CAC TGC TTT GGT TTC ATC AGC TGT
 19Leu Leu His Cys Phe Gly Phe Ile Ser Cys

LFA-3

85 TTT TCC CAA CAA ATA TAT GGT GTT GTG TAT GGG AAT GTA ACT TTC CAT GTA CCA
 29Phe Ser Gln Gln Ile Tyr Gly Val Val Tyr Gly Asn Val Thr Phe His Val Pro
 139 AGC AAT GTG CCT TTA AAA GAG GTC CTA TGG AAA AAA CAA AAG GAT AAA GTT GCA
 47Ser Asn Val Pro Leu Lys Glu Val Leu Trp Lys Lys Gln Lys Asp Lys Val Ala
 193 GAA CTG GAA AAT TCT GAA TTC AGA GCT TTC TCA TCT TTT AAA AAT AGG GTT TAT
 65Glu Leu Glu Asn Ser Glu Phe Arg Ala Phe Ser Ser Phe Lys Asn Arg Val Tyr
 247 TTA GAC ACT GTG TCA GGT AGC CTC ACT ATC TAC AAC TTA ACA TCA TCA GAT GAA
 83Leu Asp Thr Val Ser Gly Ser Leu Thr Ile Tyr Asn Leu Thr Ser Ser Asp Glu
 301 GAT GAG TAT GAA ATG GAA TCG CCA AAT ATT ACT GAT ACC ATG AAG TTC TTT CTT
 101Asp Glu Tyr Glu Met Glu Ser Pro Asn Ile Thr Asp Thr Met Lys Phe Phe Leu
 355 TAT GTC
 119Tyr Val

IgG1 (csukló, CH2, CH3)

361 GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCG
 121Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 415 TCA GTC TTC CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACC CTC ATG ATC TCC CCG ACC
 139Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 469 CCT GAG GTC ACA TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAC GAA GAC CCT GAG GTC AAG
 157Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 523 TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CCG
 175Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 577 GAG GAG CAG TAC AAC AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC
 193Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 631 CAG GAC TGG CTG AAT GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GGC CTC
 211Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 685 CCA GCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAA CCA
 229Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 739 CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CCG GAT GAG CTG ACC AAG AAC CAG GTC AGC
 247Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 793 CTG ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG
 265Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 847 AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG TTG GAC TCC
 283Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 901 GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC AGC AAG CTC ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG
 301Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 955 CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC
 319Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr

1009 ACG CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CCG GAT TCC AAC CTA TGG AAC TGA
 337Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Ser Asn Leu Trp Asn ...