

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3765959号
(P3765959)

(45) 発行日 平成18年4月12日(2006.4.12)

(24) 登録日 平成18年2月3日(2006.2.3)

(51) Int. Cl.		F I	
CO7K	14/61	(2006.01)	CO7K 14/61
A61P	3/10	(2006.01)	A61P 3/10
A61P	5/00	(2006.01)	A61P 5/00
A61P	5/06	(2006.01)	A61P 5/06
C12N	1/21	(2006.01)	C12N 1/21

請求項の数 3 (全 82 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2000-34866 (P2000-34866)	(73) 特許権者	596168317
(22) 出願日	平成12年2月14日 (2000.2.14)		ジェネンテック・インコーポレーテッド
(62) 分割の表示	特願平2-500631の分割		GENENTECH, INC.
原出願日	平成1年10月30日 (1989.10.30)		アメリカ合衆国カリフォルニア・9408
(65) 公開番号	特開2000-184896 (P2000-184896A)		0-4990・サウス・サン・フランシス
(43) 公開日	平成12年7月4日 (2000.7.4)		コ・ディーエヌエー・ウェイ・1
審査請求日	平成12年2月14日 (2000.2.14)	(74) 代理人	100059959
(31) 優先権主張番号	428,066		弁理士 中村 稔
(32) 優先日	平成1年10月26日 (1989.10.26)	(74) 代理人	100067013
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 大塚 文昭
前置審査		(74) 代理人	100065189
			弁理士 穴戸 嘉一
		(74) 代理人	100084009
			弁理士 小川 信夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ホルモン変異体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

天然には存在しないアミノ酸配列を有し、かつヒト成長ホルモンの少なくとも1つのアミノ酸残基の異なるアミノ酸による置換によって誘導されるヒト成長ホルモン変異体であって、該アミノ酸置換が H18A、R64K、E65A、L73A、E174A、N、Q、S 又は G、T175S、E186A、S188A および F191A からなる群から選ばれ、該変異体は HGH-V でなく、該変異体が、ヒト成長ホルモンのソマトジェニックレセプターに対する親和性とは異なる親和性でソマトジェニックレセプターへ結合する、ヒト成長ホルモン変異体。

【請求項2】

該アミノ酸置換が H18A、R64K、E65A、L73A、E174A、N、Q、S 又は G、E186A、S188A および F191A からなる群から選ばれる請求項1記載の成長ホルモン変異体。

【請求項3】

該アミノ酸置換が E174A および T175S からなる群から選ばれる請求項1記載の成長ホルモン変異体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本出願は1988年10月28日の米国特許出願番号第07/264,611号の継続出願

10

20

である。

本発明はポリペプチド中の活性ドメインおよびアミノ酸残基の同定法に関する。また本発明はホルモン変異体に関する。

【0002】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】

ポリペプチドすなわちペプチドおよびたん白質には各々特異的アミノ酸配列、構造および機能を有する広範囲の生物学的分子が含まれる。ほとんどのポリペプチドは特異的基質と相互作用しそのポリペプチドの機能を遂行する。したがってズブチリシン、アミラーゼ、組織プラスミノゲン活性化因子との酵素は特異的基質と相互作用を起こし、その特定の切断部位で加水分解を起こす一方、ヒト成長ホルモン、インシュリンなどのたん白質性ホルモンは特異的レセプターと相互作用を起こし成長や代謝を調節する。別にポリペプチドと免疫原性レセプターなど該ポリペプチドの主要標的ではない物質との相互作用もある。多くのポリペプチドは別個の生物学的効果を産む別々のリガンドまたはレセプターと相互作用する別個の領域を含む点で多機能的である。たとえばヒト成長ホルモン(hGH)は成人において糖代謝および脂質代謝に関係し、子供においては長骨の成長を誘導する。

10

【0003】

アミノ酸配列を修正による天然のポリペプチドの機能の改善について努力がはらわれてきている。1つの方法はポリペプチドのアミノ酸配列中の1つ以上のアミノ酸を別のアミノ酸に置換することである。インビトロ突然変異誘発やクローン化遺伝子の発現によるたん白質工学が種々のたん白質の熱的または酸化的安定性の改善に応用された例が報告されている。ビラフランカ(Villafranca), J. E. 等、(1983) *Science* 222、782 - 788; ペリー(Perry), L. J. 等(1984) *Science* 226、555 - 557; エステル(Estell), D. A. 等(1985) *J. Biol. Chem.* 260、6518 - 6521; ロゼンバーグ(Rosenberg), S. 等(1985) *Nature* (ロンドン) 312、77 - 80; コートニー(Courtney), M. 等(1985) *Nature* (ロンドン)、313、149 - 157。さらにこのような方法を応用して基質特異性を变化させた酵素を生成させたことも報告されている。エステル(Estell), D. A. 等(1986) *Science* 223、655 - 663; クレイク(Craik), C. S. 等(1985年) *Science*, 228、291 - 297; ファースト(Farsht), A. R. 等(1985) *Nature* (ロンドン) 314、235 - 238; ウィンサー(Winther), J. R. (1985) *Carlsberg Res. Commun.* 50、273 - 284; ウェルス(Wells), J. A. 等(1987) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84、1219 - 1223。修正すべきアミノ酸の決定は主にポリペプチドの結晶構造、ポリペプチドの機能に関する化学的修正の効果および、またはポリペプチドの作用モードを確認するための種々の基質とポリペプチドとの相互作用に基づいて行なわれる。ある場合には、たとえば異なる基質特異性を有するズブチリシン類の基質結合領域におけるアミノ酸配列の差異など関連ポリペプチドの特異的アミノ酸残基に基づいてアミノ酸置換を誘導する場合もある。ウェルス(Wells), J. A. 等(1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 84、5767。別の場合、分子の既知活性領域のアミノ酸配列を第2の分子の既知活性領域のアミノ酸配列となるよう修正することも報告されている。ワートン(Wharton) R. P. 等(1985) *Nature* 316、601 - 605、およびワートン(Wharton) R. P. 等(1984) *Cell* 38、361 - 369 (ファージレセプターの認識ヘリックスの別のレセプター認識ヘリックスによる置換); ジョーンズ(Jones), P. T. 等(1986) *Nature* 321、522 - 525 (ヒトミエローマたん白質の可変領域のマウス抗体の相当領域による置換)。この方法は置換により変化する性質に関しいくらかの予想を提供し得るが特定の性質を決定する全ての領域および残基の評価を保証する方法ではない。せいぜい置換残基の分子接触力に関するエネルギーの実験的見積りが行なわれるぐらいである。特異的な修正残基に対する水素結合(ファースト(Farsht), A. R. 等(1985) *Nature* 314、235; ブランアン(Bryan), P. 等(1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 83、3743; ウェルス(Wells), J. A. 等(1986) *Philos. Trans. R. Soc. London A* 317、415)、静電相互作用(ウェルス(Wells), J. A. 等(1987) *Proc. Na*

20

30

40

50

tl. Acad. Sci. U S A 84、1219 ; クロニン (Cronin), C. N., 等 (1987) J. Am. Chem. Soc. 109、2222) および疎水のおよび立体的効果 (エステル (Este II), D. A. 等 (1986) Science 233、659 ; チェン (Chen), J. T. 等 (1987) Biochemistry 26、4093) の強さが見積られた。これらの報告および別の報告 (ラスコウスキー (Laskowski), M. 等 (1987) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 52、545 ; ウェルス (Wells), J. A. 等 (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 84、5167 ; ジーンズ (Jones), P. T. 等 (1986) Nature 321、522 ; ワートン (Wharton) R. P. 等 (1985) Nature 316、601) は既知の接触残基の突然変異誘発は結合に大きな効果を引き起こすが一方非接触残基の突然変異誘発は比較的小さい効果しかないと結論づけた。

10

【0004】

アミノ酸配列と機能との関係を理解するための第2の方法には、関連遺伝子間のインビボ相対的組換えを利用したハイブリッドポリペプチドをコードするハイブリッドDNA配列の生成によるものである。このようなハイブリッドポリペプチドは大腸菌およびサルモネラ・ティフィムリウム (*Salmonella typhimurium*) 由来の *trpB* および *trpA* (シュナイダー (Schneider), W. P. 等 (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 78、2169-2173) ; アルファ1およびアルファ2白血球インターフェロン (ウェバー (Weber), H. およびワンズマン (Weissmann), C. (1983) Nuc. Acids Res. 11、5661) ; 大腸菌 K-12 の外膜ポアたん白質 *ompC* および *phoE* (トマセン (thomassen), J. 等 (1985) EMBO 4、1583-1587) ; およびパチルスステアロサーモフィラス (*Bacillus stearothermophilus*) およびパチルスリテニホルミス (*Bacillus lichiniiformis*) 由来の好熱性アルファアミラーゼ (グレー (Gray), G. L. 等 (1986) J. Bacteriol. 166、635-643) の相対的組換えにより得られると報告されている。このような方法はハイブリッドアルファアミラーゼについて報告されているようにアミノ酸配列や機能の他に有用なハイブリッドポリペプチドに関する有用な情報を提供し得るが所定のポリペプチドを系統的に研究し標的物質の1つに活性を示すポリペプチド中の詳細な領域やアミノ酸残基を測定するのにこれらの方法を利用するのは難しい。このことはそのハイブリッドのDNAおよびアミノ酸配列を規定する交叉組換えの部位が基本的に目的遺伝子のDNA配列および宿主細胞の組換えメカニズムに依存することからくる。これらの方法は遺伝子の5 または3 末端付近で交叉が起こる偶然的環境以外1つ

20

30

【0005】

たん白質性ホルモンとそれらのレセプターとの相互作用をいくつかの方法で研究した報告がなされている。1つの方法ではホルモンペプチドフラグメントを用いホルモン上のレセプター結合部位の位置を決定した。別の方法では中和モノクローナル抗体とペプチドフラグメント間の競争を利用しエピトープマッピングによりレセプター結合部位の位置を決定した。これらの方法の例にはヒト成長ホルモン (hGH) について報告された研究がある。

ヒト成長ホルモン (hGH) は正常なヒトの成長および発達における多くの調節に関与している。この22000ダルトンの脳下垂体ホルモンは線型成長 (体発達)、泌乳、マクロファージの活性化、他のインシュリン様および糖尿病誘発効果を含む多くの生物学的効果を示す。チョウラ (Chawla), R. K. (1983) Ann. Rev. Med. 34、519 ; エドワーズ (Edwards), C. K. 等 (1988) Science 239、769 ; ソーナー (Thorner), M. O. 等 (1988) J. Clin. Invest. 81、745 参照。子供の成長ホルモン欠乏症は小人症を引き起こすがこれは十年以上前からhGHの投与によりうまく治療し得るようになってきた。またhGHの遺伝的および翻訳後修正型を区別し臨床的に投与されたときのhGHに対する免疫学的応答を調べたり、またこのホルモンの循環レベルを定量したりするためにhGHの抗原性にも興味を持たれる (ルイス (Lewis), U. J. (1984) Ann. Rcv. Physiol. 46、33) 。

40

50

【 0 0 0 6 】

hGHは胎盤ラクトゲン、プロラクチンおよび他の成長ホルモンの遺伝子および種の変異体を含む相同的ホルモン群の一員である。ニコル(Nichol), C. S.等(1986) *Endocrine Reviews* 7、169。hGHは広い種特異性を示し、かつ単量体的に各クローン化ソマトジェニック(ラング(Leung), D. W., 等(1987) *Nature* 330、537)またはプロラクチンレセプター(ボーチン(Boutin), J. W.等(1988) *Cell* 53、69)に結合する点でこれらの群の中で異常である。hGHのクローン化遺伝子は大腸菌中分泌型として発現され(チャン(Chang, C. N.等(1987) *Gene* 55、189)、かつそのDNAおよびアミノ酸配列も報告されている(ゴードル(Goeddel)等(1979) *Nature* 281、544; グレー(Gray)等(1985) *Gene* 39、247)。hGHの三次元的構造はまた分っていない。しかし、ブタの成長ホルモンの三次元折りたたみパターンは中位の分解能と精度で報告されている(アデル-メグッド(Abdel-Meguid), S. S. 等(1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84、6434)。

hGH由来のペプチドフラグメントがhGHのレセプター接合部位の位置決定に使用された。リ(Li), C. H.(1982) *Mol. Cell. Biochem.* 46、31; ミルス(Mills), J. B., 等(1980) *Endocrinology*、107、391。他の報告ではウシ成長ホルモンのたん白質分解後、残基96~133のフラグメントが単離された。ヤマサキン(Yamasaki)等(1970) *Biochemistry* 9、1107。しかし残基1-133を含むより大きいフラグメントを組換え法で作ったときは検出可能な結合活性は観測されなかった。クリビ(Krivi), G. G. 等 *International Symposium on Growth Hormone: Basic and Clinical Aspects*、アブストラクトI-18、最終プログラム、セロノシンポジア(Serono Symposia)提供、USA、1987年6月14-18日。明らかにこれらの結果は矛盾しており、かつ、たん白質性ホルモン、特にその結合部位が2つ以上の不連続なエピトープおよび、または構造依存エピトープからなるものに関するレセプター結合部位の位置決めはペプチドフラグメントを使用するのは信頼性に欠けることを示している。

エピトープマッピングによるレセプター結合部位の位置決定に中和モノクローナル抗体を使用することは同様の制限がある。たとえばモノクローナル抗体をレセプター結合検定中hGHの残基98-128からなるペプチドに対しhGHレセプターと競合するのに使用した報告がある。たとえばhGHホルモンのペプチド98-128のみが中和モノクローナル抗体と結合しても、この領域がこれらの競争実験に基づくレセプター結合部位を含むことが提唱された。レテジン(Retegin), L. A., 等(1982) *Endocrinology* 111、668。

【 0 0 0 7 】

hGHホルモンの抗原部位を同定する試みに同様な方法が使用されてきた。報告による競合結合によるhGHに対する異なる24個のモノクローナル抗体のエピトープマッピングでは該ホルモン上の抗原部位はわずか4種に分類された。スロウィー(Surowy), T. K.等(1984) *Mol. Immunol.* 21、345; アストン(Aston), R.等(1985) *Pharmac. Ther.* 27、403。しかしこの戦術は該ホルモンのアミノ酸配列上のエピトープの位置は決められなかった。

抗体部位を限定する別の方法には目的たん白質上の短い線状ペプチドに対する抗体の結合テストがある。ゲイセン(Geyson), H. M.等(1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81、3998; ゲイセン(Geyson), H. M.(1985) *Immunol. Today* 6、364。しかしこの方法はレセプター結合部位の位置を決めるには線状ペプチドフラグメントを用いるのと同じ制限を受ける。有用となるためにはこの線状配列はそれを認識するのにこの抗体の抗原中にみられる構造が保持されていなければならない。さらにX線結晶学から明らかになった抗体エピトープの部位に基づき(シェリフ(Scheriff), S. 等(1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84、8075; アミット(Amit), A. G., 等(1986) *Science* 233、747)事実上全ての抗体結合部位は部分的に不連続であり(バーロー(Barlow), D. J.等(1986) *Nature* 322、747)かつ結果として線状フラグメントはこれらの構造をうまく真似ることができないことが推定されてきた。ま

10

20

30

40

50

た hGH のペプチドフラグメントはこれらのフラグメントの非共有結合的結合により研究されてきた。数人の研究者はヒト成長ホルモンの天然のアミノ酸配列または化学修飾ペプチドを含む比較的長いフラグメントを結合させた分析を報告している。バースタイン (Burstein), S. 等 (1979) *J. of Endo. Met.* 48, 964 (アミノ末端フラグメント hGH - 1 - 134) とカルボキシル末端フラグメント hGH - (141 - 191) の組合せ); リ (Li), C. H. 等 (1982) *Mol. Cell. Biochem.* 46, 31, ミリス (Mills), J. B., 等 (1980) *Endocrinology* 107, 391 (hGH のズブチリシン切断二本鎖型)。同様に、化学修飾フラグメント hGH - (1 - 134) およびヒト絨毛性ソマトマトロピン (胎盤ラクトゲンとも呼ばれる) 由来の化学修飾カルボキシル末端フラグメント (hCS - (141 - 191)) も化学修飾フラグメント hCS - (1 - 133) および hGH - (141 - 191) 同様非共有的に結合させた。米国特許第 4,189,426。これらの研究者は肝臓成長ホルモンレセプターへの結合決定基が成長ホルモンの最初の 134 個のアミノ末端残基であると誤って報告した (バースタイン (Burstein), 等 (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 5391 - 5394)。明らかにこれらの方法は間違った結果を導く。さらに 2 個の大きいフラグメントを使用することによりこの方法では潜在的に特定の相互作用に実際に関与する特異的残基または領域を同定することなしにこれらの組合せで使用される 2 個のフラグメントのどちらかにその機能を割振ることが可能である。hGH に関する上述の方法および実験のレビューが報告されている。ニコル (Nichol), C. S. 等 (1986) *Endocrine Rev.* 7, 169 - 203。

【0008】

hGH の“欠失ペプチド” (hGH - 32 - 46) 由来の 7 残基ペプチドフラグメントを他の哺乳類の成長ホルモンの類似セグメント由来のアミノ酸残基を含むよう修正した別の方法が報告されている。しかしそのような置換の効果はあったとしても報告されてはいない。米国特許第 4,699,897 参考。それにもかかわらず短かいペプチドフラグメントを使用する短所は、それらのフラグメントの線型配列が本来の成長ホルモンにみられる構造をインビトロでもインビボでも認識されるよう取り込めなければならないことから明白である。

多くの天然の hGH 変異体が同定されている。この中には、hGH - V (シーバーク (Seberg), P. H. (1982) *DNA* 1, 239; 米国特許第 4,446,235 号、4,670,393 号および 4,665,180 号) および hGH の残基 32 - 46 の欠失を含む 20K hGH (コスチオ (Kostyo), J. L. 等 (1987) *Biochemica et Biophysica Acta* 925, 314; ルイス (Lewis), U. J., 等 (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 2679) が含まれる。

ある研究者は、hGH 中部位 165 のシステインをアラニンに置換した通常 Cys - 53 と Cys - 165 の間で生成するジスルフィド結合の破壊を報告した。トクナガ (Tokunaga), T., 等 (1985) *Eur. J. Biochem.* 153, 445。この単一置換は明らかに hGH の三次構造を維持し、かつ hGH のレセプターにより認識される変異体を生じた。

他の研究者は固体樹脂サポート上での hGH のインビトロ合成を報告した。この研究者の第 1 の報告は hGH の正しくない 188 個のアミノ酸配列を公表した。リ (Li), C. H. 等 (1966) *J. Am. Chem. Soc.* 88, 2050; および米国特許第 3,853,832 号。第 2 の報告は 190 個のアミノ酸配列を公表した。米国特許第 3,853,833 号、この後者の配列も正しくないものである。特に hGH の配列は部位 68 の後にグルタミンが入っており、部位 73 はグルタミンではなくグルタミン酸、部位 106 はアスパラギンではなくアスパラギン酸、部位 108 はアスパラギン酸ではなくアスパラギンである。

【0009】

先に示したものに加え特定のモノクローナル抗体への結合が変化したハイブリッドインターフェロンも報告されている。キャンブル (Camble), R. 等、“ペプチド; 構造と機能” 合成遺伝子から生成したインターフェロン - 2 類似物の性質、*Proceedings of the Ninth American Peptide Symposium*, (1985) デバー (Deber) 等編、ピアスケミカル社、シカゴ、Ill., 375 - 384。該文献に公表されているように - 1 インターフェロ

10

20

30

40

50

ンのアミノ酸残基 101 - 114 または - インターフェロンの残基 98 - 114 が - 2 インターフェロンへと置換されている。 - 2 インターフェロンは NK - 2 モノクローナル抗体を結合するが - 1 インターフェロンは結合しない。 - 2 インターフェロン中のこの特定の領域は - 1 および - 2 インターフェロン間の 27 個のアミノ酸の相異中の 7 個がこの領域中に存在することから選択された。報告されているようにこのようにして得たハイブリッドは NK - 2 モノクローナル抗体との活性が実質的に減少している。抗ウイルス活性をテストしてみるとこれらのハイブリッドは野生型の - 2 インターフェロンの活性と同程度の抗ウイルス活性を示した。この領域内のより小さいセクションの置換も報告された。また 3 ~ 7 個のアラニン残基クラスターの連続的置換も報告された。しかし、唯一つの類似体 [Ala - 30、32、33] IFN - 2 が公表されている。

10

ニワトリ卵白リゾチームの小ペプチドフラグメント内のアラニン置換および 2A11 または 3A9 細胞の刺激に関するこれらの置換の効果も報告されている。アレン (Allen), P. M. 等 (1987) Nature 327、713 - 715。

抗原結合ループを含む二次構造ユニットの全ユニット (ジョーンズ (Jones), P. T. 等 (1986) Nature 321、522 - 525) または DNA 認識ヘリックス (ワートン (Wharton), R. P. 等 (1985) Nature 316、601 - 605) の置換による結合性の操作に関する別の報告もある。

上述の文献は単に本出願の登録期日前の公表のため提供したものであり先の発明または以前に登録された出願に基づく優先権によりこれらの公開期日が早いことから本発明の権利を失うという告白として解釈されるものはなにもない。

20

【0010】

上述の参考文献により示される状況があるならば構造と機能との関係を明らかにするためポリペプチドの有効な系統的分析法が必要なことは明白である。したがってここでの目的はポリペプチドの機能活性に寄与するポリペプチド内の活性ドメインの同定法を提供することである。

さらに本目的は機能活性を決定する活性アミノ酸の測定法を提供することである。

さらに本発明の目的はポリペプチド内の生物学的活性ドメインを系統的に同定する方法を提供することである。

さらに本目的は本来のホルモンとは異なる望ましい生物学的、生化学的および免疫原的性質を有するホルモン変異体を提供することである。

30

さらに本目的は 1 つの生物学的機能については減少した活性を有しかつ第 2 の標的物質については実質的または増加した活性を有するホルモン変異体を提供することである。

さらに本目的は hGH に対するソマトジェニクレセプターに関する変化した結合活性および、または生物学的活性を有し、かつ有効性を増した hGH 変異体を提供することである。

さらに本目的は 1 つ以上の望ましい生物学的性質は保持しているが糖尿病誘発活性は減少している hGH 変異体を提供することである。

さらに本目的は hGH のソマトジェニクレセプターに関する結合活性を増加した hPRL および hPL を提供することである。

さらに本目的は hGH 変異体を含むポリペプチド変異体のクローニングおよび発現に使用する DNA 配列、ベクターおよび該ベクターを含む発現宿主を提供することである。

40

【0011】

【課題を解決するための手段】

1 つの特徴として本発明は第 1 の標的物質に関するポリペプチドの活性に影響する未知の活性ドメインを同定することによるポリペプチドの構造と機能の系統的分析法を提供する。これらの未知活性ドメインは該ポリペプチドの一次アミノ酸配列中に少なくとも 2 個の不連続アミノ酸セグメントを含む。活性ドメインは該ポリペプチド (親ポリペプチドと呼ぶ) の選択されたアミノ酸セグメントを該ポリペプチドの類似体に由来する類似アミノ酸セグメントと置換することにより決定される。この類似体は標的物質に関し親ペプチドと異なる活性を有している。このようにして生成した各セグメント置換ポリペプチドの標的

50

物質に関する活性を検定する。これらの活性を親ポリペプチドの活性と比較する。この構造的に類似するアミノ酸セグメントは標的物質に関し異なる相互作用を起こす類似体由来することからこのような活性の比較は親ポリペプチド中の活性ドメインの位置の指標を提供する。

さらに本方法は親ポリペプチドの活性ドメイン中の活性アミノ酸の同定も含んでいる。本方法は親ポリペプチドの活性ドメイン内のアミノ酸残基 1 個の各アミノ酸への置換、および該残基置換ポリペプチドの標的物質に関する検定を含んでいる。各残基置換ポリペプチドの活性を親ポリペプチドの活性と比較する。活性アミノ酸残基が同定されるまで活性ドメイン中の種々のアミノ酸についてこれらのステップを繰り返す。

本発明の別の特徴として、種々の標的物質に関し種々の活性ドメインおよび活性アミノ酸残基を同定する方法が提供される。これらの方法には第 2 の標的に関し上述の方法の反復が含まれる。

10

【0012】

上述の方法に従がい 1 つ以上の標的物質に関し親ポリペプチドと比較して異なる活性を有するポリペプチド変異体を同定する。これらの変異体は標的物質に関し親ポリペプチドの活性を決定する活性ドメインまたは活性ドメイン中の活性アミノ酸残基の同定に基づき作られる。

さらに本発明は少なくとも 3 つの部分からなる成長ホルモン、プロラクチンおよび胎盤ラクトゲン変異体を含む。第 1 部分は親ホルモンのアミノ酸の少なくとも 1 部に対応し、第 3 部分は同親ホルモンの少なくとも 1 部に対応し、かつ第 2 部分は親ホルモンの類似体のアミノ酸配列に対応する。第 2 部分はポリペプチド変異体の第 1 および第 3 部分の間には含まれない親ホルモンのアミノ酸残基の類似体である。

20

また本発明には hGH のセグメント置換および残基置換変異体を含む特定のヒト成長ホルモン、ヒトプロラクチンおよびヒト胎盤ラクトゲン変異体を含む。

【0013】

【発明の実施の形態】

1 つの態様において本発明の方法は親ポリペプチドと標的物質との相互作用に関するポリペプチド中の 1 つ以上の活性ドメインを決定するための、ヒト成長ホルモンまたはヒトプロラクチンなどの親ポリペプチドの系統的分析を提供する。本発明の方法を採用するにあたり目的とする標的物質に異なる活性を示す該ポリペプチドに対する 1 つ以上の類似体が必要ではない。

30

したがって本明細書で用いられているように“親ポリペプチド：とは親ポリペプチドとは異なる標的物質への活性を示す“類似体”が存在するポリペプチドを意味する。このようなポリペプチド、類似体および標的物質の例を第 1 表に示す。

【表 1】

第 1 表

親ポリペプチド	類似体	標的または標的を含むアッセイ
ヒト成長ホルモン	ヒト胎盤ラクトジェン、ヒトプロラクチンおよびブタ成長ホルモン	ソマトジェニック、ラクトジェニック、ジアベタジェニック、脂質分解、窒素遅延、マクロファージ活性化およびhGHのインシュリン様効果に対するレセプター；ラット体重法；ラット体重増アッセイ、OB/OB マウス又はイヌにおけるインシュリン耐性アッセイ、ヒト肝臓、アジポーズ、リンパ球、胸腺細胞および卵巣組織上のレセプター
hPRL	pGH	ヒトプロラクチンレセプターに対する結合
ウサギGHレセプター	ヒトGHレセプター	ウサギGHへの結合
α -インターフェロン	関連ヒトインターフェロンおよび動物インターフェロン	α 1インターフェロンレセプターへの結合
ヒト組織成長因子 (TGF- β_1)	ヒトTGF- β_2 またはインヒビン	ヒト造血細胞増殖調節
表皮増殖因子 (EGF)	TGF- α	カロチノサイト増殖
マウス組織壊死因子 (nTNF)	(hTNF) ヒト組織壊死因子	マウスTNFレセプター活性
ヒト顆粒球マクロファージコロニー刺激因子	マウス顆粒球マクロファージコロニー刺激因子	ヒト骨髄幹細胞の増殖および分化
ヒトCD-4レセプター	マウスCD-4レセプター	HIVウイルスのgp-120
ズブチリシン (バチルスアミリルクイフェイシヤンス)	ズブチリシン (バチルスリチェニルホルミス)	サクシニル-ala-ala-pro-glu-P-ニトロアニリド
ヒト γ -インターフェロン	関連ヒトインターフェロンおよび動物インターフェロン (例えばマウス由来)	ヒトインターフェロンレセプターの活性化
インシュリン成長因子 (IGF-1)	インシュリン	IGF-1レセプター成長調節レセプター
組織プラスミノゲン活性化因子 (tPA)	トリプシンウロキナーゼ	プラスミノゲン (切断) フィブリン (結合)

10

20

30

【0014】

もちろん第1表の親ポリペプチド、類似体および標的物質は単に例である。また親ポリペプチドにはたとえばスクシニルコエンザイムAシンターゼ、ミトコンドリアATPase、アミノアシルtRNAシンターゼ、グルタミンシンターゼ、グリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼおよびアスパラテートトランスカルバモラーゼなどの1つ以上のサブユニットを含むたん白質性物質が含まれる(ハング(Huang)等(1982)Ann. Rcv. Biochem. 5 1、935-971参照)。このような多重サブユニット親ポリペプチドの場合、活性ドメインは親ポリペプチドの2つ以上のサブユニットにまがっている。したがって後により詳細に述べる方法は特定のポリペプチドの各サブユニットを探り、部分的には1つのサブユニット上に含まれかつ部分的には1つ以上の他のサブユニット上に含まれる特定の標的物質に対する活性ドメインおよび活性アミノ酸を確定するのに

40

50

用い得る。

一般的に親ポリペプチドおよび類似体は機能に関する1つのポリペプチド群に属する。さらに通常このような親ポリペプチドおよび類似体はあるアミノ酸配列、すなわち保存残基を持つ。これらの配列ホモロジーは90%以上のこともあるが約15%~20%と低いこともある。

一次配列ホモロジーに加え、親ポリペプチドの類似体はポリペプチドおよびその類似体の三次元的枠組みでも限定される。したがって類似体はアミノ酸配列において親ポリペプチドからの多様性を示す場合もその分子の三次構造の全て、または一部の比較に基づき親ポリペプチドと構造的にホモロジーをもつこともある。チョシア(Chothia), C.等(1986) *Embo. J.* 5, 823。

【0015】

一般に三次構造類似体は、その類似体の三次元構造が親ポリペプチドの構造と一緒であることが知られている場合同一と見なし得る。 - 炭素軸の二乗平均分析(RMS)を行うことにより(たとえばサクリフ(Sutcliffe), M. J. 等(1987) *Protein Engineering* 1, 377-384)、もしあるとすれば三次元類似性をもつ領域の重なりが同定される。テスト類似体配列の好ましくは60%以上に関し、もし - 炭素軸が親ポリペプチドの - 炭素軸と重っているかまたは約2 ~ 約3.5 RMSの内にある場合、そのテスト類似体は親ポリペプチドと三次元的に類似している。もちろんこのことは2つの配列の間に存在する挿入または欠失を除外する。

上述の親ポリペプチドおよび類似体は天然の分子の公開であるにもかかわらず、親ポリペプチドおよび類似体にはインビトロ組換え法で導入される配列中に天然の変異を含む変異体が含まれると理解すべきである。このように親ポリペプチドまたは類似体として用いる変異体はその親ポリペプチドまたは類似体において1つ以上のアミノ酸残基の置換、挿入および、または欠失を含む変異体を含む。このような変異体は本発明の方法を実行し活性ドメインおよび、または活性アミノ酸の同定または本発明のポリペプチド変異体の調製に使用し得る。したがってhGHの天然の変異体またはCYS-165のAla置換を含む組換え変異体はそれらが標的に対して活性をもつ限り親ポリペプチドまたは類似体として使用し得る。このような天然および組換え変異体には他の親ポリペプチド中の特異的残基と等価の異なるアミノ酸残基が含まれ得る。これらの異なるアミノ酸はそれらの残基が一次配列または三次構造により構造的に類似している、またはそれらが機能的に等価であるならば等価であると云える。

さらに、多くの親ポリペプチドおよび類似体はその役割を交換し得ることは明白である。したがって非ヒト成長ホルモンおよびそれらの関連類似体群はそれぞれ親ポリペプチドとして使用できかつ同等にその活性ドメインを探ることができる。さらに、HIVウイルスに対するCD-4レセプターなどの標的物質もCD-4レセプター類似体に関する親ポリペプチドとしてHIV結合に寄与する活性ドメインおよび活性アミノ酸の同定やCD-4変異体の調製に使用される。

【0016】

本明細書で使用しているように、“標的”とは親ポリペプチドと相互作用する物質である。標的物質にはたん白質性ホルモン、酵素基質、たん白質性レセプターに対するホルモン、たん白質性結合たん白質に対する一般的リガンドおよびポリペプチドに接触し得る免疫系などが含まれる。ホルモンレセプターの例にはhGHに対するソマトジェニックおよびラクトジェニックレセプターおよびhPRLに対するレセプターが含まれる。他の標的物質には抗体、プロテアーゼのインヒビター、たん白質性レセプターに結合するホルモンおよび組織プラスミノゲン活性化因子(t-PA)に結合するフィブリンが含まれる。一般に標的物質は親ポリペプチド上の“活性ドメイン”と接触することにより親ポリペプチドと相互作用を起こす。一般にこのような活性ドメインは該ポリペプチドの表面上に存在するか、もしくは三次元構造の変化によりそのポリペプチドの表面に導き出される。ポリペプチドの表面とは、生理的条件下、すなわちインビボまたはインビトロで発現した時と同様の条件下に存在する本来の構造について規定される。そのアミノ酸セグメントおよ

10

20

30

40

50

びアミノ酸残基はいくつかの方法で確認される。もしその三次元結晶構造が十分な分解能で分っているなら、そのポリペプチドの表面にあるアミノ酸残基は“表面接近可能”なアミノ酸残基である。これら表面接近可能残基にはその三次元構造の表面上に“転がる”理論上の水分子と接触する残基である。

ポリペプチドの表面上の活性ドメインはそのポリペプチドの一次アミノ酸配列の単一のセグメントに含まれる。しかしながら多くの場合天然型のポリペプチドの活性ドメインは親ポリペプチドの一次アミノ酸配列中の2つ以上のアミノ酸セグメントから構成される。たとえばヒト成長ホルモンのソマトジェニックレセプターへの活性ドメインを図5に示す。示されているように活性ドメインのドメインA, CおよびFは各々hGH分子の不連続なアミノ酸セグメント上に存在する。これらのアミノ酸セグメントは図4中A, C, Fという文字で示されている。活性ドメインを構成する不連続なアミノ酸セグメントは活性ドメインおよび標的物質の間の相互作用に有意に関係しない多くのアミノ酸残基により分離されている。一般に不連続アミノ酸セグメント間の間隔は少なくともアミノ酸5残基分である。

10

【0017】

本発明の方法は親ポリペプチドのアミノ酸配列中の未知活性ドメインの検出を目的としている。標的物質に関するポリペプチドの三次元結晶構造が入手できる場合、たとえばインヒビターまたは転移状態類似体に関する酵素の結晶構造が入手できる場合は除いて多くのポリペプチドのほとんどの活性ドメインは未知のままである。

本明細書で使用している“類似ポリペプチドセグメント”または“類似セグメント”とは親ポリペプチド中の対応する配列と置換して“セグメント置換ポリペプチド”とするアミノ酸配列を意味する。一般的に類似セグメントは親ポリペプチドにおいて1つ以上の異なるアミノ酸残基の置換、挿入または欠失を起こすが親ポリペプチド中で置換する選択されたセグメント中の他の残基の相対的アミノ酸配列は維持される配列を有している。一般に類似セグメントは親ポリペプチドと類似体の全アミノ酸配列を両配列間の配列同一性が最大となるよう整列させることにより同定される。この配列整列に基づく類似セグメントは親ポリペプチドの対応する配列への置換用に選択される。同様に三次構造ホモロジーを示す類似体由来の類似セグメントは構造ホモロジーを示すこれらの領域から誘導し得る。このような類似セグメントは親ポリペプチド中の対応する配列と置換される。さらにたとえば構造低類似領域の隣接領域などの三次構造相同体の他の領域も類似セグメントとして用

20

30

いられる。もし可能ならば類似セグメントを選択してセグメント置換ポリペプチド中への不安定化アミノ酸残基の導入は避けるべきである。このような置換にはかさ高側鎖や疎水コア領域中へ親水性側鎖を導入するものが含まれる。

【0018】

一般的に親ポリペプチドおよび類似体のアミノ酸配列は知られており、またある場合にはその3次元結晶構造も入手可能である。1つ以上の類似体と親ポリペプチドのアミノ酸配列の整列化により少なくとも予備分析で変化を受けていない配列中の保存されているアミノ酸残基を容易に見つけることができる。また配列整列化は1つ以上のアミノ酸残基の置換、挿入または欠失を含む配列変化領域も明らかにする。このような変化を含む領域により親ポリペプチド中のどのセグメントが類似セグメントと置換したかが決定される。それゆえ類似体の類似セグメントの置換はアミノ酸残基の置換だけでなく、アミノ酸残基の挿入および、または欠失も起こし得る。

40

もし3次元構造の情報が入手可能な場合は類似セグメントと置換すべきではない親ポリペプチド中の領域を同定することが可能となる。たとえば親ポリペプチド中の両親媒性ヘリックスの疎水性表面において過密領域が同定された場合は類似セグメントと置換すべきではない。そのように同定された残基はポリペプチド変異体中に保持されるべきでかつ表面残基のみが類似残基と置換されるべきである。

一般に類似セグメントは長さがアミノ酸3~30残基、好ましくは約3~15残基、もっとも好ましく約10~15残基である。ある場合、類似セグメントの好ましい長さは相同

50

または親ポリペプチドと比べて類似セグメントの1つ以上のアミノ酸残基の挿入および、または欠失のため変化もある。もし親ポリペプチドの3次元構造が入手できないときは一般に全部ではないにしろ親ポリペプチドのほとんどをカバーする類似セグメントに関するセグメント置換ポリペプチドを作る必要がある。しかし全アミノ酸配列のセグメント置換は必ずしも必要ではない。たとえば全アミノ酸配列の1部のみをカバーする偶然セグメント置換は特定標的物質に対する活性ドメインを同定するのに十分な情報を提供する。しかしほとんどの場合アミノ酸配列の約15%以上が活性ドメイン同定のためセグメント置換を受けることが必要である。一般に約50%、好ましくは約60%、より好ましくは約75%、もっとも好ましくは100%のアミノ酸配列が構造情報が無い場合にセグメント置換される。

10

【0019】

ここで使用している“類似性アミノ酸残基”または“類似残基”とは親ポリペプチドの対応セグメント中の対応アミノ酸残基とは異なる類似セグメント中のアミノ酸残基を意味する。したがってもし類似セグメントの置換が1つのアミノ酸置換を起こすならそのアミノ酸残基は類似残基である。1度親ポリペプチドおよび1つ以上の類似体が同定されたならば1つ以上の類似体由来の類似セグメントを親ポリペプチド中の選択されたセグメントと置換し多くのセグメント置換ポリペプチドを作る。このような置換は組換えDNA技術を用い簡単に行なわれる。一般に親ポリペプチドをコードするDNA配列は簡便な宿主で発現されるようにクローン化およびその他の処理が行なわれる。親ポリペプチドコードDNAは親ポリペプチドを発現する細胞のmRNAから誘導されるか、または化学合成的にDNA配列を構築することによるゲノムライブラリーから入手し得る(マニアチス(Meniatis), T. 等(1982) *Molecular Cloning*、コールドスプリングハーバーラボラトリー N. Y.)。

20

それからこの親DNAを適当なプラスミドまたはベクターに挿入し宿主細胞のトランスホームに使用される。DNA配列のクローニングおよび発現により親ポリペプチド、セグメント置換ポリペプチド、残基置換ポリペプチドおよびポリペプチド変異体を作るのには原核生物が好ましい。たとえば、大腸菌k12294株(ATCC No. 31446)、大腸菌B株、大腸菌X1776株(ATCC No. 31537)および大腸菌c600株およびc600hf1株、大腸菌W3110(F⁻, λ , 独立栄養型、ATCC No. 27325)、枯草菌などのバチルス類およびサルモネラティムリウム(*Salmonella typhimurium*)またはセラチアマルセサンス(*Serratia marcescens*)などその他の腸内細菌および種々のシュドモナス種が用いられる。好ましい原核生物は大腸菌W3110(ATCC 27325)である。原核生物中で発現したとき一般にポリペプチドはN-末端メチオニンまたはホルミルメチオニンを含みかつグリコシル化されていない。もちろんこれらの例は制限することなく説明を意図したものである。

30

【0020】

原核生物に加え、イースト培養物や多細胞生物由来の細胞などの真核生物も使用される。原則としてこのような細胞の培養物も使用可能である。しかし脊椎細胞が最も興味深く、培養中(組織培養)の脊椎細胞の増殖は、反復が可能である(“組織培養”アカデミックプレス版、クルーズ(Kruse)およびパターソン(Patterson)編(1973))。これらの有用な宿主細胞系列の例にはVEROおよびHeLa細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞系列、W138、BHK、COS-7およびMDCK細胞系列がある。一般に宿主細胞に適合する種由来の複製およびコントロール配列を含むプラスミドベクターがこれらの宿主と合せて使用される通常このベクターは複製部位およびトランスフォーム細胞に発現型選択を提供し得るたん白質をコードする配列を有している。たとえば大腸菌は大腸菌由来のプラスミドであるpBR322でトランスフォームする(マンデル(Mandel), M. 等(1970) *J. Mol. Biol.* 53, 154)。プラスミドpBR322はアンピシリンおよびテトラチクリン耐性遺伝子を含んでおり、そのため容易な選択手段を提供している。好ましいベクターはpBO475である実施例1参照。このベクターは宿主間での移動を可能にし、それにより突然変異誘発および発現を容易にするファージおよび

40

50

大腸菌の複製オリジンを含んでいる。

“発現ベクター”とは適当な宿主中のDNAの発現を可能にする適当なコントロール配列に機能的に結合する該DNA配列を含むDNA構築物を意味する。これらのコントロール配列には転写を可能にするプロモーター、そのような転写をコントロールするオペレーター配列、適当なmRNAリボゾーム結合部位をコードする配列および転写および翻訳の停止をコントロールする配列が含まれる。ベクターはプラスミドでもファージ粒子でも、または単に潜在的ゲノム挿入物でもよい。1度適当な宿主にトランスホームすればそのベクターは宿主ゲノムとは独立に複製しかつ機能するかまたはある場合にはゲノムそれ自身の中に組込まれる。本明細書において“プラスミド”および“ベクター”はプラスミドが現在もっとも一般的に用いられているベクターであることからしばしば同義語的に使用される。しかし、本発明は同様に機能しかつ本分野でよく知られている他の形の発現ベクターも包含する。

10

【0021】

2つのDNAまたはポリペプチドの関係を述べるときの“機能的に結合した”という言葉はそれらが互いに機能的に関係することを意味する。たとえばおそらくシグナル配列の切断によりたん白質成熟型を分泌するプロセスにおいてシグナル配列として機能するなら該前配列はペプチドと機能的に結合している。プロモーターはコード配列の転写をコントロールするならその配列と機能的に結合している。リボゾーム結合部位は翻訳を可能とする位置にあるならそれはコード配列と機能的に結合している。

1度本ポリペプチドがクローン化されればそのクローン化親DNAについて部位特異的突然変異誘発(カーター(Carter), P.等(1986) Nucl. Acids Res. 13, 4331; ゾラー(Zoller), M. J.等(1982) Nucl. Acids Res. 10, 6487)、カセット突然変異誘発(ウェルス(Wells), J. A.等(1985) Gene 34, 315)、制限選択突然変異誘発(ウェルス(Wells), J. A.等(1986) Philos, Trans. R. Soc. London Ser A, 317, 415)または他の技術をほどこし置換した類似セグメントにより規定されるアミノ酸配列の変化をコードする“セグメント置換DNA配列”が作られる。適当な発現ベクターに機能的に結合しているとき、セグメント置換ポリペプチドが得られる。ある場合、親ポリペプチドまたはセグメント修正ポリペプチドの回収は親ポリペプチドまたはセグメント修正ポリペプチドをコードするDNA配列に機能的に結合する適当なシグナル配列を用いることにより発現宿主からそれらの分子を発現かつ分泌させることで可能となる。これらの技術は当分野でよく知られている。もちろん望ましいポリペプチドのインビトロ化学合成などそれらのポリペプチドおよびセグメント置換ポリペプチドの生成に別の方法も使用し得る(バラニー(Barany), G.等(1979) “ペプチド”(E. グロス(Gross) および J. メイエンホーファー(Meienhofer) 編) アカデミックプレス版、N. Y. 2巻、3~254頁)。

20

30

【0022】

1度種々のセグメント置換ポリペプチドが生成されればそれらを標的物質に接触させ、もし、標的物質と各セグメント置換ポリペプチドとの相互作用があればそれを測定する。同じ標的物質に関するこれらの活性を親ポリペプチドの活性と比較する。もしその類似体が親ポリペプチドと比べその標的物質に関し異なる活性を有しているなら、それらのセグメント置換ポリペプチドは親ポリペプチド中の活性ドメインを規定する類似セグメントを含んでいると推定される。

40

もし1つの類似体が親ポリペプチドより大きい活性を有しているなら、複数のセグメント置換ポリペプチドがその標的物質に関し活性の増加を示す可能性がある。このような場合、類似体の活性ドメインおよびその標的物質に関する活性を増加するように修正し得る親ポリペプチドの適当な領域を効果的に同定できる。その標的との相互作用にかかわる類似体の領域が主に1つの連続するアミノ酸セグメント内に存在するとき、このような事象が起こりやすい。もし類似体の“活性ドメイン”が類似体アミノ酸配列の不連続領域に含まれるなら、活性の増加はセグメント置換ポリペプチドへ、類似体からの全ての活性ドメインを同時に導入しなければならぬからそのセグメント置換ポリペプチドの活性の増加は

50

起こりそうもない。

したがって、類似体は標的物質に対し親ポリペプチドよりも小さい活性をもつことが好ましい。このような場合、セグメント置換ポリペプチドには活性のロスがみられる。しかし、1度親ポリペプチド中の活性ドメインが決定されたら、このポリペプチドは連続的にまたは同時にそのような活性ドメインを置換して標的物質に関して第1親ポリペプチドの活性を欠いた第2親ポリペプチドとする類似体として使用できる。

【0023】

ポリペプチド中の活性ドメインは標的物質に関するセグメント置換ポリペプチドの活性を親ポリペプチドのそれと比較することにより同定される。多くの分析測定が可能であるが標的物質の非触媒的結合についてはセグメント置換ポリペプチドと標的物質間に形成される複合体の解離定数 K_d を親ポリペプチドに関する K_d と比べる方法が簡便なもの1つである。セグメント置換により類似置換残基あたり、約1.5、好ましくは約2.0の K_d 値の増減は、置換セグメントがその標的物質と親ポリペプチドの相互作用の活性ドメインであることを示している。標的物質との触媒的相互作用の場合親酵素に対する活性を測定する適当なパラメーターは K_{cat} / K_m 比を比較することである。親酵素に対し置換類似残基当たり約1.5、好ましくは2.0の K_{cat} / K_m 値の増減は活性ドメインの置換を示す。本明細書で使用している“スキャンニングアミノ酸”とは親ポリペプチド内の活性アミノ酸を同定するのに用いられるアミノ酸のことである。“残基置換ポリペプチド”はスキャンニングアミノ酸に関する親ポリペプチド中のアミノ酸の少なくとも単一置換を含むポリペプチド変異体である。“残基置換DNA配列”は残基置換ポリペプチドをコードする。このようなDNAおよびポリペプチドはセグメント置換DNAおよびポリペプチドの調製で述べた方法で調製される。

アミノ酸スキャンで同定した“活性アミノ酸残基”は一般的に標的物質と直接接触するものである。しかし、活性アミノ酸は他の残基または H_2O のような小分子または Na^+ , Ca^{+2} , Mg^{+2} または Zn^{+2} などのイオン種で形成される塩橋を介して間接的に標的物質に接触することもある。

ある場合には、スキャンニングアミノ酸は親ポリペプチドの活性ドメイン中に同定されるアミノ酸と置換される。一般的に多くの残基置換ポリペプチドが調製され、その各々は活性ドメイン内の種々のアミノ酸残基の位置でスキャンニングアミノ酸の単一置換を含んでいる。特定の標的物質に関するそのような残基置換ポリペプチドの活性を親ポリペプチドの活性と比較し、標的物質との相互作用に関係する活性ドメイン中のアミノ酸残基を決定する。このような分析に用いられるスキャンニングアミノ酸は置換したものと異なるアミノ酸、すなわちその他の19種の天然のアミノ酸である。

【0024】

【表2】

10

20

30

第 II 表

<u>ポリペプチドアミノ酸</u>	<u>アイソステリックな スキャンニングアミノ酸</u>	
Ala	Ser , Gly	
Glu	Gln , Asp	
Gln	Asn , Glu	
Asp	Asn , Glu	10
Asn	Aln , Asp	
Leu	Met , Ile	
Gly	Pro , Ala	
Lys	Met , Arg	
Ser	Thr , Ala	
Val	Ile , Thr	
Arg	Lys , Met , Asn	20
Thr	Ser , Val	
Pro	Gly	
Ile	Met , Leu , Val	
Met	Ile , Leu	
Phe	Tyr	
Tyr	Phe	
Cys	Ser , Ala	30
Trp	Phe	
His	Asn , Gln	

【 0 0 2 5 】

この表は各アミノ酸について以下の記号を使用している。

<u>アミノ酸又はその残基</u>	<u>三文字記号</u>	<u>一文字記号</u>	
アラニン	Ala	A	
グルタミン酸	Glu	E	
グルタミン	Gln	Q	
アスパラギン酸	Asp	D	
アスパラギン	Asn	N	
ロイシン	Leu	L	10
グリシン	Gly	G	
リジン	Lys	K	
セリン	Ser	S	
バリン	Val	V	
アルギニン	Arg	R	
スレオニン	Thr	T	
プロリン	Pro	P	20
イソロイシン	Ilu	I	
メチオニン	Met	M	
フェニルアラニン	Phe	F	
チロシン	Tyr	Y	
システイン	Cys	C	
トリプトファン	Trp	W	
ヒスチジン	His	H	30

【 0 0 2 6 】

残基置換ポリペプチドの活性の効果がある場合、それを一様のスキランニングアミノ酸残基への天然のアミノ酸残基の変化に系統的に帰着させることができるのでスキランニングアミノ酸は各残基置換ポリペプチドと同じであることが最も望ましい。

ある場合、1つ以上の残基におけるスキランニングアミノ酸置換は標的物質に関する活性の分析を行うのに十分な量の単離を可能にするレベルで発現しない残基置換ポリペプチドを生ずる。このような場合種々のアミノ酸、好ましくはアイソステリックなアミノ酸が用いられる。

最も好ましいスキランニングアミノ酸は比較的小さい中性のアミノ酸である。このようなアミノ酸残基にはアラニン、グリシン、セリンおよびシステインが含まれる。アラニンはベータ炭素からとび出た側鎖をもたず、かつ残基置換ポリペプチド主鎖構造が変化しにくいことからこのグループの中でも好ましいスキランニングアミノ酸である。またアラニンはもっとも一般的なアミノ酸であることから好ましい。さらにそれは、埋った形でも露出した形でも存在する(クレイトン(Creighton), T. E., "たん白質"(W. H. フリーマン社版, N. Y.); チオシア(Chothia), C. (1976) J. Mol. Biol. 150, 1)。もしアラニン置換が適当な量の残基置換ポリペプチドを生じない場合、アイソステリックアミノ酸が使用される。別に優先性が減る順番に以下のアミノ酸が使用される: Ser, AsnおよびLeu。

スキランニングアミノ酸の使用はセグメント置換ポリペプチドの分析により確認される活 50

性ドメイン中の活性アミノ酸の同定に限定されるわけではない。たとえば親ポリペプチド中の1つ以上のアミノ酸が分っている場合か、または標的物質との相互作用に関して考えると考えられる場合、その残基およびその周りのアミノ酸残基を探るのにスキャンニングアミノ酸を使用することができる。さらにもし親ポリペプチドが小さいペプチド、すなわち約3~50アミノ酸残基であるなら、全分子にわたってスキャンニングアミノ酸分析を行ないうる。

【0027】

1度活性アミノ酸残基が同定されたならアイソステリックアミノ酸に置換される。このアイソステリック置換は全ての場合に行う必要はないしまた活性アミノ酸が同定される前にも行なわれる。このアイソステリックアミノ酸残基はいくつかの置換が起こし得る構造への潜在的破壊効果が最小となるように行なわれる。アイソステリックアミノ酸を第II表に示す。

活性アミノ酸残基は標的物質に関する残基置換ポリペプチドの活性を親ポリペプチドと比較することにより同定し得る。一般に、 K_d 値の2倍の増減は置換残基が標的物質との相互作用に活性があることを示している。同様に標的物質との触媒的相互作用の場合、親酵素に対して K_{cat}/K_m 値の2倍の増減は活性残基の置換を示している。

推定上の、または既知の活性アミノ酸残基をスキャンニングアミノ酸分析にかけるとき、その残基に隣接するアミノ酸残基をスキャンするべきである。その結果3残基置換ポリペプチドができる。1つは推定上または既知活性アミノ酸である部位Nにスキャンニングアミノ酸、好ましくはアラニンを含んでいる。他の2つは部位N+1およびN-1にスキャンニングアミノ酸を含んでいる。各置換ポリペプチドが標的物質に対し K_d または K_{cat}/K_m 値に約2倍以上の効果を起こすならばそのスキャンニングアミノ酸は部位N+2およびN-2で置換されている。このことを K_d または K_{cat}/K_m 値への効果が2倍以下となる少なくとも1個、好ましくは4個の残基が両方向について同定されるまでか、または親ポリペプチドの末端に到達するまでくり返す。このようにして、特定の標的物質との相互作用に関係する連続するアミノ酸配列に沿って1つ以上のアミノ酸が同定され得る。

【0028】

本発明の方法は特定の親ポリペプチドの1つ以上の標的物質に関する活性ドメインの検出に使用される。さらに種々の活性ドメイン内の活性アミノ酸もこの方法により同定される。1度2つ以上の活性ドメインおよび活性アミノ酸残基が特定のポリペプチドの種々の標的物質に関して同定されたならその親ポリペプチドに対して種々の修正を行って該ポリペプチドと1つ以上の標的物質間の相互作用を修正できる。たとえばhGH表面上の2つの活性ドメインはソマトジェニックレセプターおよびプロラクチンレセプターについても同定された。たの特殊な場合の活性ドメインは重複している。したがってソマトジェニックおよびプロラクチンレセプターと相互作用する多くの共通する活性アミノ酸残基が存在する。hGHに対する種々の修正は以後より詳しく説明する情報に基づいて行なわれる。ある場合に種々の標的物質に関する活性ドメインは重複していない。このような状況で1つのレセプターに関する親ポリペプチド中の活性アミノ酸の修正は種々のアミノ酸による置換で行なわれ、その結果その標的物質との活性ドメインの相互作用は減少または増加し、それらの変異体の生理作用が変化することになる。

本明細書で使用している“相互作用変化”とは1つ以上の活性ドメインが修正され標的物質とその変異体との相互作用が親ポリペプチドと比べて変化しているポリペプチド変異体について用いられる。相互作用変化とは親ポリペプチドと特定の標的物質との相互作用に比べポリペプチド変異体の相互作用が少なくとも2倍増減することで定義される。

【0029】

標的物質と親ポリペプチド、ポリペプチド変異体、セグメント置換ポリペプチドおよび、または残基置換ポリペプチドとの相互作用はインビトロまたはインビボの簡便なアッセイで測定し得る。インビトロアッセイは標的物質とポリペプチド、たとえば酵素と基質、ホルモンとホルモンレセプター、抗体と抗原などの検出可能な相互作用を測定するのに用いられる。このような検出には色変化、放射性変化、溶解度変化、ゲル電気泳動法および

10

20

30

40

50

、またはゲル排除法による分子量変化の測定などが含まれる。インビボアッセイには生理作用、たとえば体重変化、電解質バランスの変化、凝血時間の変化、血餅分解の変化および抗原応答の誘導などを検出するアッセイが含まれるが、以上に示したものに限定されるわけではない。一般に標的物質と目的ポリペプチド間の相互作用変化を測定する可変パラメーターが存在するかぎにインビトロアッセイが使用される。

本発明の例としてはヒト成長ホルモンのソマトジェニックレセプターに関する該ホルモンの活性を決定する該ホルモンの活性ドメインおよび活性アミノ酸を同定する態様がある。本発明のこの態様を実施する場合、セグメント置換および残基置換 hGH 変異体を含むヒト成長ホルモン変異体で成長ホルモンのソマトジェニックレセプターとの結合相互作用が天然のヒト成長ホルモンとは異なるものが調製または同定される。これらのヒト成長ホルモン変異体の少なくとも1つはソマトジェニックレセプターに関しより高いアフィニティを有し、かつラットのソマトジェネシスに対しより高い能力を有している。他のものはソマトジェニックレセプターについて低い活性を有している。このような hGH 変異体は hGH アゴニストまたはアンタゴニストとして有用であり、かつそれらの変異体はソマトジェニックレセプターとの実質的相互作用がないことからヒト成長ホルモンの他のレセプターを刺激するより高い能力を有している。さらにこれらの変異体は hGH 標準またはトレーサーとして hGH のイムノアッセイにおいても有用である。たとえば抗 hGH ポリクローナル抗体を含むヒトおよびマウス血清との反応性が有意に低い変異体が同定されている別のものには hGH と同じソマトジェニックレセプターに対する結合アフィニティを有するが成長を刺激する能力がより高いものがある。

【0030】

肝臓由来のソマトジェニックレセプターと相互作用するヒト成長ホルモンの活性ドメインを測定する方法を図1に示した。この方法では、hGHのセグメントを、クローン化 hGH 肝臓レセプターおよび hGH に対するモノクローナル抗体に対して非常にアフィニティの小さいことが知られている hGH 類似体由来の類似配列と系統的に置換した。このような hGH 類似体にはヒト胎盤ラクトゲン (pPL)、ブタ成長ホルモン (pGH) およびヒトプロラクチン (hPRL) がある。これらの類似体はソマトジェニック hGH レセプター (hGHR) と比べクローン化 hGH レセプターに対しては約 100 ~ 10000 倍も小さい結合アフィニティを有する (ハリントン (Harrington), A. C. 等 (1986) J. Clin. Invest. 77, 1817; バウマン (Baumann), G., 等 (1986) J. Clin. Endocrinol. Metab. 62, 137)。

相同たん白質はそれらが大きな配列多様性を有するときでさえ同様な三次元構造を有することが知られていることからこれらの類似体を使用される (チョシア (Chothia), C. 等 (1986) F M B O J. 5, 823)。そのように行くと、類似配列置換をその分子の本来の構造を大きく破壊することなしに容易に適用できるという見込みが増す。ヒト成長ホルモンおよびその類似体 hPL、pGH および hPRL のアミノ酸配列を図2に示す。これらのうち最後の3個の類似体は各々 85%、68% および 23% のレベルで hGH との配列同一性を共有する。

図1を参照すると、ヒトの成長ホルモンに対するソマトジェニックレセプター (hGH に対する“標準物質”) と相互作用するヒト成長ホルモン中の1つ以上の活性ドメインを同定する全戦術が示されている。示されているように、hGH は標的レセプター、この場合のソマトジェニックレセプターに対し正の結合活性を有している。しかし hPRL、hPL および pGH 類似体はマイナス記号で示されているにその標的物質に関し著しく活性が低い。文字 A から F で示されている6個のセグメント置換成長ホルモンは hGH の選択されたアミノ酸セグメントを hPRL 類似体の類似アミノ酸セグメントによる置換で生成する。これらの選択されたセグメント各々は互いに異なり、これらを選択して hGH の全アミノ酸配列または活性ドメインを含むことが期待される領域を探る。セグメント置換ヒト成長ホルモンの調製後各 hGH ソマトジェニックレセプターに関する検定を行ないその活性を測定する。hGH と比較したこれらの結果は図1のセグメント修正ヒト成長ホルモンの下の + または - の記号で示した。図1から分るように、この図中のセグメント置換ヒト

成長ホルモンCおよびFはソマトジェニックレセプターと結合しない。これらの結果に基づき、成長ホルモン変異体CおよびF中の類似体由来の類似セグメントに対応する成長ホルモン中の領域はhGHのソマトジェニックレセプター結合に関する活性ドメインであると同定される。

【0031】

示されているように、もし構造の情報または他のデータがある場合は必ずしもヒト成長ホルモンの全アミノ酸配列または他の親ポリペプチドを試験する必要はない。したがって結晶学からの低分解能または高分解能情報は類似物から選択されるアミノ酸セグメントの不安定化置換を避けるための重要な情報を提供し得る。たとえばヒト成長ホルモンのX線座標は得られていないがpGHの低分解能X線結晶構造に基づくpGH構造モデルからのヘリックス投影図は4本のヘリックスのうち3本(ヘリックス1, 3および4)は強い疎水性モーメントをもつ両親媒性であることを明らかにした。図3参照。アイゼンバーグ(Eisenberg), D.等(1984) J. Mol. Biol. 179、125。ポリペプチド中の疎水性コアは非常に密に存在するので(ポンダー(Ponder), J. W. 等(1987) J. Mol. Biol. 193、775)、それらの埋没したアミノ酸残基の変化は一般に不安定化を招く(アルバー(Alber), T.等(1987) Biol. Chem. 26、3754; レイダール-オルソン(Reidhaar - Olson), J. F. (1988) Science 241、53)。

さらにポリペプチド群たとえばヒト成長ホルモン群の中のアミノ酸が非常によく保存されている領域は少なくとも最初に調べる必要はない。これはそのような保存配列の破壊はその分子の構造を破壊すると考えられるからである。さらに他のデータは親ポリペプチドのある領域は特定の標的物質との相互作用に関係しないことを示している場合がある。たとえば突然変異誘発によるhGHのN末端13残基アミノ酸の欠失(アシュケナン(Ashkenazi), A.等(1987) Bndocrinology) 121、414)および残基32~46を欠失したhGHの中立変異体(20Kd変異体; ルイス(Lewis), U. J. 等(1980) Biochem. Biophys. Res. Commun. 92、5111)はソマトジェニックレセプターに対する結合性に大きく影響しないことが報告されている。さらに残基134と149の間の残基の一部または全てを欠失した制限たん白質分解によるhGHの2本鎖誘導体の生成もソマトジェニックレセプターに対する結合に著しい影響を示さなかった。リ(Li), C. H. (1982) Mol. Cell. Biochem. 46、31; ミルス(Mills), J. B. 等(1980) Endocrinology 107、391。

【0032】

この情報に基づき、hGHのアミノ酸配列の6個のセグメントとが多くのhGH類似体由来の対応する類似アミノ酸セグメントとの置換に選ばれた。これらの選択されたセグメントは図2のウからFに対応する。これらのセグメントをジスルフィド結合、二次構造の境界(図4参照)、成長ホルモン群中に高度に保存される配列の領域、またはそのソマトジェニックレセプターへの結合に関与しないことが以前に同定された領域によって分離した。hGHの191残基中の85残基を集合的に置換した17個のセグメント置換hGH変異体を調製した。図2のAからFに割り当てた領域および各領域内のセグメントを置換したhGH変異体を第III表にまとめた。

【0033】

【表3】

10

20

30

40

第 III 表

探索領域	セグメント置換 hGH変異体	導入された 実際の置換	突然変異 誘発法	Kd (nM)	<u>Kd(変異体)</u> Kd(野生型)	
	hGH	ナシ		0.34	1.0	
A 11-33	hPL(12-25)	N12H, F25I	r. s ^{1/}	1.4	4.1	
	pGH(11-33)	D11A, M14V, H18Q, R19H, P25A, Q29K, E33R	カセット ^{2/}	1.2	3.4	10
	hPRL(12-33)	N12R, M14V, L15V, R16L, R19Y, F25S, D26E, Q29S, E30Q, E33K	カセット	3.6	11	20
	hPRL(12-19)	N12R, M14V, L15V, R16L, R19Y	r. s.	5.8	17	30
	hPRL(22-33)	Q22N, P25S, D26E, Q29S, E30Q, E33K,	r. s.	0.29	0.85	
B 46-52	hPL(46-52)	E46H, N47D, P48S, Q49E, L52F	r. s.	2.5	7.2	40

	pGH (48-52)	P48A, T50A, S51A, L52F	r. s.	0.94	2.8	
C 54-74	hPL(56-64)	E56D, R64M,	カセット	10	30	
	pGH(57-73)	S57T, T60A, S62T, N63G, R64K, E65D, T67A, K70R, N72D, L73V	カセット	5.8	17	10
	hPRL(54-74)	F54H, S55T, F56S, 158L, P59A, S62E, N63D, R64K, E66Q, T67A, K70M, S71N, K72Q, L73K, E74D	カセット	23	69	20
D 88-104	hPRL(88-95)	E88G, Q91Y, F92H, R94T, S95E	r. s.	0.47	1.4	30
	hPRL(97-104)	F97R, A98G, M99M, S100Q, L101D, V102A, Y103P, G104E	r. s.	0.53	1.6	40
E 108-136	hPL(109-112)	N109D, V110D,	カセット	0.61	1.8	

	D112H				
	hPRL(111-129)	Y111V, L113I, K115E, D116Q, E118K, E119R, G120L, Q122E, T123G, G126L, R127I, E129S	カセット	0.52	1.5
					10
	hPRL(126-136)	R127D, L128V, E129H, D130P, G131E, S132T, P133K, R134E, T135N	カセット	0.58	1.7
					20
F 164-190	pGH(164-190)	Y164S, R167K, M170L, D171H, V173A, F176Y, I179V, V180M, Q181K, S184R, I184F, G187S, G190A	ハイブリット ^{3/}	>34	>100
					30
	pGH(167-181)	R167K, D171H, I179V, Q181K	r. s.	9.2	27

【 0 0 3 4 】

1/ 制限選択 - ウェルズ (Wells), J. A. 等 (1 9 8 6)

Philos. Trans. R. Soc. London Ser A 317, 415.

40

2/ カセット突然変異誘発 - ウェルズ (Wells), J. A. 等 (1 9 8 5)

Gene 34, 315.

3/ 組換え突然変異誘発 - グレー (Gray), G. L. 等 (1 9 8 6)

J. Bacteriol. 166, 635.

【 0 0 3 5 】

一般にセグメント置換 h G H 変異体はヒト成長ホルモン配列へ置換される類似セグメントにより決まる。しかしある場合には置換類似セグメント中の類似残基のすべてがその構築物中に維持されるわけではない。このように第 III 表の h P L (1 2 - 2 5) はヒト胎盤ラクトゲン (h P L) のアミノ酸 1 2 ~ 2 5 が親 h G H のアミノ酸残基 1 2 ~ 2 5 と置換したセグメント置換 h G H 変異体のことである。この類似セグメントを置換した効果は、

50

図2のこの領域中のhGHとhPLのアミノ酸配列を比較することにより決定することができる。hPL(12-25)変異体では4個のアミノ酸置換が生じているがなんの変化も起こらない。hPL(12-25)の場合のこれらの残基は12、16、20および25である。

hPL(12-25)変異体中の実際のアミノ酸置換および他のセグメント置換変異体を第III表に示した。各置換は数字の前後に文字を付けて表わされる。第1の文字および数字は未修正hGHの残基番号におけるアミノ酸を示している。最後の文字はその位置で置換したアミノ酸を示している。したがってN21HはhGHの12番のアスパラギンがhPL(12-25)変異体ではヒスチジンに置換していることを示している。

したがって導入された実際の置換のいくつかは図2における対応するセグメントで示される置換とは対応していない。このようにhPL(12-25)は全hPL(12-25)セグメントが置換された場合4個の置換N12H、R16Q、L20AおよびF25Iを含むことになる。しかし、実際の変異体はR16およびL20は維持しており、導入される置換は第III表に示されているように4個の置換のうちの2個、すなわちN12HおよびF25Iだけである。親hGHの1つ以上の残基を維持する他のセグメント置換変異体には領域AおよびEを含むものおよびセグメント置換変異体hPL(46-52)およびpGH(167-181)が含まれる。

【0036】

各々のセグメント置換ヒト成長ホルモン変異体をクローン化可溶性hGHレセプターの細胞外領域からの(¹²⁵I)hGHの置換を用いたインビトロシステムで検定しそのソマトジェニックレセプターに対するセグメント置換変異体の相対的アフィニティーを定量した。レング(Leung), D. W. 等(1987) Nature 330, 537。この短縮型のソマトジェニックレセプターは同膜型レセプターと比べ若干結合アフィニティーは小さいが(Kd=0.3 nM)同程度の活性を示す(スペンサー(Spencer), S. A. 等(1988) J. Biol. Chem. 263, 7862)。

実施例に詳細に述べられているように各々残基11-19, 54-74および164-191を含む選択セグメントA, CおよびFはソマトジェニックレセプターと相互作用するhGH分子の活性ドメインである。このことはこれらの領域内のhGH類似体の類似セグメントを含むほとんどのセグメント置換hGH変異体に関し10倍以上も低いKd値が観測されたことに基づく。図4参照。もちろんこのことはこれらの活性ドメイン内の各アミノ酸残基がそのソマトジェニックレセプターの結合残基であることは意味しない。むしろそれらのドメインはそのような活性残基を見出し得るアミノ酸配列を規定している。さらに活性ドメインA, CおよびFの位置が決められた。たとえば変異体hPRL(12-33)をアミノ酸およびカルボキシ末端変異体hPRL(12-19)およびhPRL(22-33)に分断した。この実験結果はhGHの活性ドメインを残基12~19にしばり込んだ。同様に領域F(pGH(167-181))のアミノ末端領域は結合アフィニティーの著しい低下を示した。最も著しい効果にはたった2個の突然変異E56DおよびR56Mが導入されたhPL(56-64)の結合よりも30倍も小さいものがあつた。領域A, CおよびFはhGHの一次配列上では非常に離れているが、そのホルモンの三次構造はそれらを非常に接近させている。図5参照。これらの活性ドメインはヘリックス1のアミノ末端(活性ドメインA), Cys-53からヘリックス2の開始までのループ(活性ドメインC)およびヘリックス4の中央領域(活性ドメインF)を含むパッチを形成している。

【0037】

さらにhGHに対する8個のMabをセグメント置換hGH変異体に対して検定しhGHのエピトープの地図を作った。さらにそのMabはhGHおよびhGH変異体を用いた競争検定に用いhGHに対するhGHレセプター結合を阻害する各Mabの能力を評価した。

これらの実験結果を合せるとhGHへの類似セグメントの置換は分子本来の構造を著しく破壊しないという証拠および観測される活性はソマトジェニックレセプターとレセプター

10

20

30

40

50

置換 hGH 変異体との相互作用に関する直接的効果によるものであるという証拠をいくつか提供している。まずセグメント置換変異体はそのソマトジェニックレセプターまたは M a b に対する結合を破壊することに関し非常に選択的である。第 2 にソマトジェニックレセプターおよび M a b は配列同様構造も認識する。該レセプターおよび少なくとも 4 個の M a b は該たん白質三次構造感受性の不連続エピトープを認識する。第 3 に精製変異体全ての円二色スペクトルは実際に野生型 hGH と同じである。第 4 に pGH (164 - 190) を除いて全ての変異体は基本的に野生型と同量発現したインビボのたん白質分解耐性が構造完全性のスクリーニングに用いられている。ヘクト (Hecht), M. H., 等 (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 81, 5685; ショートル (Shortle), D. 等 (1985) Genetics 110, 539

10

セグメント置換 hGH 変異体の結合活性変化は必ずしもそれら変異体中の置換残基が直接ソマトジェニックレセプターと接していることを示しているとは限ぎらない。破壊的突然変異は好ましい相互作用がなくなるだけでなく、不都合なものも誘導する。たとえば hPL (12 - 19) セグメント置換 hGH 変異体中の N12R 変異体は A s n 12 の水素結合するアミド基を変化させるばかりでなく、A r g 置換は正に荷電したより大きい側鎖を導入する。さらに多くの結合性接触がその類似体間に保存されるのでその結果全ての接触ではないにしろある領域をセグメント置換 hGH 変異体で探ることができる。

【0038】

図 2 の活性ドメイン A, C および F 内の特定の活性アミノ酸を同定するためこれらの活性ドメインの精密構造分析を行った。この分析ではこれら 3 個の活性ドメインの残基を順番にアラニンと置換した。63 個の単一アラニン変異体を作り、各々の可溶性 hGH レセプター (s hGH r) に対する結合定数を測定した。レング (Leung), D. W. 等 (1988) J. Biol. Chem. 263, 7862。

20

この分析に基づいて第 IV 表にリストしたアミノ酸残基はソマトジェニックレセプターとの相互作用に関して活性な hGH 分子内の残基を構成している。これは、それらの残基のアラニン置換により誘導される相対的解離定数が野生型 hGH に比べ 4 倍以上になることに基づいている。図 7 参照。

hGH 変異体を作るのに好ましいこれらの残基のアミノ酸置換を示す。

【0039】**【表 4】**

30

第 IV 表

hGH残基

好ましいアミノ酸置換

F10	GEMARQSYWLIY	
F54	GEMARQSYWLIY	
F56	GMFARQSDNKLH	
158	GEMFARQSVY	
R64	GEMFAQSH, KDN	10
Q68	GEMFARSHKDN	
D171	GEMFARQSHKN	
K172	GEMFARQSHDN	
E174	GMFARQSHDNKL	
T175	GEMFARQSVI	
F176	GEMARQSYWLIY	
R178	GEMFAQSHKDN	20
F182	GEMFARQS	
V185	GEMFARQSITLYW	

【0040】

ソマトジェニックレセプターに対しあまり活性でないその他のアミノ酸残基を第V表に示す。一般にこれらの残基はアラニンと置換したとき相対的Kd値が2倍以下の増加を示す。

【0041】

【表5】

第 V 表

	14	N12	S55	E66	Q181
P5	M14	S57	K70	R183	
L6	L15	P59	S71	G187	
S7	R16	S62	K168		
R8	R19	N63	I179		

【0042】

アラニンと置換したとき相対的にKd値が減少する(つまりソマトジェニックレセプターに対してはより大きいアフィニティーを示す)hGH中のアミノ酸残基を第VI表にリストする。

【0043】

【表6】

第 VI 表

P2	E65	S184
T3	Q69	E186
L9	L73	S188
H18	R167	F191

10

20

30

40

50

R 6 4 E 1 7 4

【 0 0 4 4 】

1 残基置換 hGH 変異体、E 1 7 4 A、は驚くべきことにソマトジェニックレセプターに対する解離定数が有意に（ほぼ 5 倍）に減少する。ソマトジェニックレセプターに対する結合アフィニティを示すことに加え、この変異体はラットの体重検定において hGH と比べソマトジェニック能の増加を示した。この置換および 1.4 倍以上のソマトジェニック結合の増加を示す他の特定の残基置換を第 VII 表に示す。

【 0 0 4 5 】

【 表 7 】

第 VII 表

10

ソマトジェニック結合の増加を示す hGH 変異体

<u>hGH 残基</u>	<u>置換アミノ酸</u>
H 1 8	A
R 6 4	K
E 6 5	A
L 7 3	A
E 1 7 4	A, N, Q, S, G
E 1 8 6	A
S 1 8 8	A
F 1 9 1	A

20

【 0 0 4 6 】

図 7 には示されていないアラニン置換を含む他の変異体を第 VIII 表にリストする。

【 0 0 4 7 】

【 表 8 】

第 VIII 表

30

<u>変異体</u>	<u>Kd (mM)</u>	<u>Kd(var) / Kd(wt)</u>
H21A	NE	—
K172A/F176A	201	543
N47A	0.84	2.3
P48A	NE	—
Q49A	0.36	1.0
T50A	0.38	1.0
S51A		
Q46A	NE	—
V173A	NE	—

40

【 0 0 4 8 】

注：NE - 振とうフラスコ中容易に単離し得るほど発現されなかったもの（すなわち、野生型発現レベルの約 5 % 以下）

50

同定後、hGH中のソマトジェニックレセプターに対する活性アミノ酸残基を予備分析で行ったスキニングアミノ酸以外の種々のアミノ酸で置換することにより分析を行う。第IX表にその残基置換変異体を示した。

【 0 0 4 9 】

【 表 9 】

変異体	第 IX 表	
	Kd (nM)	Kd(var)/Kd(wt)
R77V	0.44	1.3
L80D	0.78	2.3
F176Y	3.2	8.6
E174G	0.15	0.43
E174D	NE	—
E174H	0.43	1.2
E174K	1.14	3.1
E174L	2.36	6.4
E174N	0.26	0.7
E174Q	0.21	0.6
E174S	0.11	0.3
E174V	0.28	0.8
E174R	NE	—
E64K	0.21	0.6
E65K	NE	—
E65H	NE	—
E172R	NE	—
158L	NE	—
F25S	NE	—
D26E	NE	—
Q29S	NE	—
E30Q	NE	—
R178K	NE	—
R178T	NE	—
R178Q	NE	—
I179M	NE	—
D169N	3.6	10.5

【 0 0 5 0 】

注：NE - 振とうフラスコ中容易に単離し得るレベルまで発現しなかったもの

10

20

30

40

50

(すなわち、野生型発現レベルの約5%以下)

調製したhGH変異体に加え、第X表にはhGH中の特定のアミノ酸残基と、生物学的機能が変化した変異体を生成することが予想される置換アミノ酸を示した。

【0051】

【表10】

第 X 表

野生型hGH アミノ酸残基	置換アミノ酸	
S43	GEMFARQHDKN	10
F44	GEMARQSYWLV	
H18	GEMFARQSKDNY	
E65	GEFARQSHDNKL	
L73	GEMFARQSIYV	
E186	GMFARQSHDNKL	
S188	GEMFARQHDNKY	
F191	GEMARQSYWLV	20
F97	GEMARQSYWLV	
A98	GEMFRQSDNHK	
N99	GEMFARQSDKY	
S100	GEMFARQHDNKY	
L101	GEMFARQSIYV	
V102	GEMFARQSIITLYW	
Y103	GEMFARQSWLV	30
G104	EMFARQSP	
R19	GEMFAQSHKND	
Q22	GEMFARSEKKN	
D26	GEMFARQSHKN	
Q29	GEMFARSEKKN	
E30	GMFARQSHDNKL	40
E33	GMFARQSHDNKL	

【0052】

別の態様においてはプロラクチンレセプターに対するhGHの結合エピトープを決定した。hGHは成長ホルモンレセプターにもプロラクチン(PRL)レセプターにも結合し得る。本明細書に示されているようにこれらのレセプターはhGHへの結合に関し互いに競争し、このことはそれらの結合部位が重複していることを示している。スキニング突然変異誘発データはhPRLレセプターに対するhGHのエピトープはヘリックス1の中央部(残基Phe25およびAsp26を含む)、ループ領域(Ile58およびArg64を含む)およびヘリックス4の中央領域(残基K168, K172, E174および

F 1 7 6 を含む)にある決定基から成る。これらの残基はh G Hの構造モデル地図を作ったときのバッチを形成する。この結合バッチは本明細書で述べられ、かつB . C . カニンガム (cunningham) およびJ . A . ウェルズ (Wells) (1 9 8 9) Scince 2 4 4、 1 0 8 1 - 1 0 8 5) により公表されたh G Hレセプターについて決定されたものと重複するが同一のものではない。h G Hに関するこれらのレセプター結合部位の非重複領域に突然変異を起こすことにより、h G Hの選択性が各レセプターへの結合アフィニティーを損失することなく、h G Hレセプター側へ2 0 0 0倍以上またはP R Lレセプター側へ2 0倍以上シフトした。同様に重複領域に突然変異を起こすことにより、両レセプターに対し同時に5 0 0倍以上結合を減少させ得る。このようなh G Hのレセプター選択的変異体は、線型成長または泌乳などのh G Hの種々の生物学的活性と特異的レセプター結合現象を結びつける有用な分子プローブとなる。

10

【 0 0 5 3 】

別の態様ではヒト成長ホルモン (h G H) のレセプター結合決定基を通常非結合類似体、ヒトプロラクチン (h P R L) 中に入れた。本明細書およびカニンガム (Cunningham) , B . C . およびウェルズ (Wells) , J . A . ((1 9 8 9) Scince 2 4 4、 1 0 8 1 - 1 0 8 5) で公表されたアラニンスキャンニング突然変異誘発は、ヒト肝臓からクローン化したh G Hレセプターに対する結合を調節するh G H中の重要な残基を同定した。h P R L由来の別の突然変異がh G Hに導入され、h G Hレセプター結合部位内のh P R L置換は結合能をほとんど破壊することを明らかにした。その後h P R Lのc D N Aをクローン化し大腸菌で発現させた。それからレセプター結合に非常に重要と思われるh G Hからの置換を順次導入し突然変異を起こした。部位指定突然変異誘発を7回くり返した後、その会合定数がh G Hレセプターの1 0 0 0 0倍以上に強化された8個の突然変異を含むh P R L変異体を同定した。このh P R L変異体は野生型よりもわずかに6倍結合が弱く一方h G Hとの配列一致性はわずか2 6%であった。これらの結果はh G Hおよびh P R Lとの構造類似性を示し、h G Hレセプターエピトープの同一性を確認している。さらに一般にこれらの実験はアゴニストまたはアンタゴニストなどの新しい性質をもつハイブリッドホルモンを設計するのに有効であることが分かっている近縁かつ機能的に多様なホルモン類からレセプター結合性を容易に借し得ることを示している。

20

以下に示すものは例であって本発明の範囲を制限するものではない。

【 0 0 5 4 】

【 実施例 】

実施例 1

h G H突然変異誘発および発現ベクター

効率的な突然変異誘発を行うためh G Hコード配列を変えずに均等に分布する1 8個の単独の制限部位をもつ合成h G H遺伝子を作った。この合成h G H D N A配列を各々およそ6 0塩基対長で隣接するカセットと1 0 bp重複する7個の合成D N Aカセットをライゲーションすることにより組立てN s i IからB g l IIでしめされる4 0 5 bpのD N Aフラグメントを作った。この連続フラグメントをポリアクリルアミドゲルで精製し、これから溶出してアルカリホスファターゼプロモーターおよびS t l Iシグナル配列 (チャン (Chang) , C . N . 等 (1 9 8 7) Gene 5 5、 1 8 9)、ファージf lの複製オリジンおよび複製オリジンおよび - ラクタマーゼ遺伝子を含むbp1 2 0 5から4 3 6 1までのp B R 3 2 2の領域を含む受容ベクターp B 0 4 7 5を同様に切断したものにクローン化した。この配列はダイデオキシ分析により確認した (サンガー (Sanger) , F . 等 (1 9 7 7) Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 7 4、 5 4 6 3)。

40

図9に示したようにp B 0 4 7 5を構築した。長さ4 7 5 bpのD r a I , R s a Iフラグメント上に含まれる繊維上ファージ由来のf l由来のD N Aをp B R 3 2 2の単独のP v u II部位にクローン化しプラスミドp 6 5 2を作った。テトラサイクリン耐性遺伝子のほとんどはp 6 5 2をN h e IおよびN a r Iを制限切断し、D N Aポリメラーゼとd N T Pを用いてその粘着末端を充填し、かつ大きい方の3 8 5 0 bpのフラグメントそれ自体をライゲーションすることにより欠失させてプラスミドp 6 5 2を構築した。p 6 5

50

2をEcoRI, EcoRVで切断し、その3690bpのフラグメントをアルカリホスファターゼプロモーター、STIIシグナル配列および中立hGH遺伝子を含むpGH4R(チャン(Chang), C. N.等(1987) Gcnc. 55、189)由来の1300bpEcoRI, EcoRVフラグメントはライゲーションした。この構築物をpB0473と命名した。合成DNAを3種の様式でpB0473にクローン化した。ベクターpB0473をNsiI, GglIIで切断し、両方とも合成DNA由来の240bp NsiI、HindIIIフラグメントおよび1170bp HindII, BglIIフラグメントにライゲーションした。この構築物pB0475はhGHの中立ポリペプチドをコードするDNAを含むがhGH遺伝子の突然変異誘発やその後の操作を可能にする多くの新しい単独制限部位を有している。hGHアミノ酸配列とともにpB0475の全DNA配列を図10に示す。pB0475中のhGH配列内の単独制限部位は類似体pGH, hPLおよびhPRL由来の類似セグメントをコードするDNA配列を含む変異原カセットの挿入を可能にする(ウェルス(Wells), J. A.等(1985) Gene 34、315)。別にhGH配列を一本鎖ベクターpB0475の部位指定突然変異誘発により修正し、つづいて単独制限部位の1つについての制限選択を行った(ウェルス(Wells), J. A.等(1986) Philos. Trans. R. Soc. London Ser A 317、415)

10

【0055】

第III表にあげた17種類のセグメント置換hGH変異体を調製した。各々は野生型hGHと同様のレベルおよび後に述べるhGH-hGHハイブリッドをはるかに越えるレベルで大腸菌の細胞周辺腔に分泌された。hGHおよびhGH変異体は低いリン酸最小倍地で生育した大腸菌W3110, tonA株(ATCC27325)で発現させた(チャン(Chang), C. N.等(1987) Gene 55、189)。

20

hGHおよびhGH変異体は以下のように精製した。細胞ペレット200gに4倍容(800ml)の10mMトリス(pH8.0)を加えた。この混合物をペレットが溶解するまで室温でシェーカーにより振とうした。この混合物をホモジナイズして低温で1時間攪拌した後、7000gで15分間遠心した。その上清をデカンテーションしてから45%飽和となるように硫酸アンモニウムを加え(277g/リットル)、室温で1時間攪拌した。11000g30分間の遠心後、そのペレットを40mlの10mMトリス(pH8.0)に懸濁した。この溶液を2リットルの10mMトリス(pH8.0)に対し一晩透析し、この試料を遠心または0.45ミクロンメンブレンで濾過した。その後試料を100mlのDEAEセルロース(ファーストフロー、ファルマシア製)カラムにかけた。カラム容量の8~10倍の10mMトリス(pH8.0)中ゼロから300mM NaClの勾配を用いてカラムの溶出を行った。PAGEで同定したhGHフラクションを集めて10mMトリス-HCl(pH8.0)に対し一晩透析した。この試料をCentri-Prep10限外濾過によりおよそ1mg/mlになるまで濃縮した。

30

【0056】

実施例2

hGHおよびhGHの相同組換え体

ブタの成長ホルモンのC末端領域に結合したhGHの種々の長さのN末端領域を含むランダムハイブリッドライブラリを直列に結合した遺伝子のランダム組換え法により構築した。グレー(Gray), G. L.等(1986) J. Bacteriol. 166、635。

40

pB0475のEcoRI部位を該プラスミドのEcoRI制限処理により除去し、DNAポリメラーゼとdNTPを添加することにより粘着末端を充填した後、このプラスミドをライゲーションした。つぎにhGH遺伝子の3'末端の直前に新しいEcoRI部位を導入した。これはEcoRI部位を含むhGH-4Rの345bp BglII, EcoRVフラグメントをEcoRI-pB0475構築由来の同様の制限レクターにサブクローニングすることにより行った。それからpGH遺伝子(シーバーク(Seeburg) P. H.等(1983) DNA 2、37)をこの構築物のhGH遺伝子の3'末端直後に導入した。これは先に述べた構築物のEcoRI, EcoRV消化物の大きい方のフラグメントにpGHcDNAを含むEcoRI, HindIII(充填)フラグメントを導入することにより行った。このプラスミ

50

ド p B 0 5 0 9 は 3 末端に単独の E c o R I 部位をもつ本来の h G H 遺伝子と、それに同じ方向でつづく本来の p G H 遺伝子を含む。h G H 遺伝子と p G H 遺伝子のホモロジーのため p B 0 5 0 9 の一部は大腸菌 *rec*⁺ M M 2 9 4 (A T C C 3 1 4 4 6) にトランスホームしたときインピボ組換えを起こしハイブリッド h G H / p G H を生ずる。これらの組換え体は集めた D N A を E c o R I で制限処理し、E c o R I 部位を失うような組換えを行わなかったプラスミドを線状にすることにより濃縮した。2 回の制限選択および大腸菌 *rec*⁺ M M 2 9 4 へのトランスホメーションの後、ほとんど全てのクローンがハイブリッド h G H / p G H 組換え体となった。2 2 個のクローンの配列分析は、h G H / p G H ハイブリッドがアミノ末端 h G H 配列とそれにつづくアミノ酸残基 + 1 9 , + 2 9 , + 4 8 , + 9 4 , + 1 0 5 , + 1 2 3 および + 1 6 4 で始まる p G H 配列を含んでいることを示した。 10

【 0 0 5 7 】

h G H 遺伝子に均等に分布する交叉点を有する 7 個の h G H - p G H ハイブリッドが得られた。しかし極端なカルボキシ末端ハイブリッド (h G H (1 - 1 0 3) - p G H (1 6 4 - 1 9 1)) のみが精製および分析に十分なレベルで大腸菌から分泌された。この h G H - p G H ハイブリッドはヘリックス 4 の疎水面上に存在する 3 個の置換 (M 1 7 0 L , V 1 7 3 A および V 1 8 0 M) を導入する。したがって図 2 のヘリックス領域 A , D , E および F における配列変化のほとんどはヘリックスの疎水面上の残基の突然変異を避けるよう設計した。たとえば上述のハイブリッド h G H - p G H 変異体は、M 1 7 0 , V 1 7 3 , F 1 7 6 および V 1 8 0 を維持するよう修正した。なぜならこれらの残基はヘリックス 4 の疎水面上内に存在するからである。 20

【 0 0 5 8 】

実施例 3

可溶性ヒト成長ホルモンレセプターの大腸菌からの発現および精製

可溶性ヒト成長ホルモンレセプター s h G H r をコードするクローン化 D N A 配列 (レング (Leung) , D . W . 等 (1 9 8 7) *Nature* 3 3 0、5 3 7) を p B 0 4 7 5 にサブクローンし p J I 4 6 6 を作った (図 1 1 および図 1 2 参照) 。

ベクター p C 1 S , 2 S H C H R (レング (Leung) , D . W . 等 (1 9 8 7) *Nature* 3 3 0、5 3 7) を X b a I および K p n I で消化し、h G H の分泌シグナルおよび 2 4 6 コドンの細胞外領域をコードする 1.0 bp フラグメントを精製した (マニアチス (Maniatis) , T . 等 (1 9 8 2) *モレキュラークロニング、コールドスプリングハーバーラボライリー* , N . Y .) 。このフラグメントを同様に切断した M 1 3 m p 1 8 にライゲーションし組換え体用に一本鎖 D N A を精製した (メシング (Messing) , J . (1 9 8 3) *Methods in Enzymology* . 1 0 1 巻、2 0 頁) 。部位指定突然変異誘発 (カーター (Carter) , P . 巻 (1 9 8 6) *Nucleic Acids Res.* 1 3、4 3 3 1) を 1 8 mer . ジゴヌクレオチド 5 - A - A G T - A G T - G C A - T T T - T C T - G G - 3 により行ないコドン + 1 に N s i I を導入した。変異配列はダイデオキシ配列分析 (サンガー (Sanger) , F . 等 *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 7 4、5 4 6 3) により確認した。変異体の二本鎖 D N A を精製し N s i I および S m a I で切断した。h G H レセプターの 2 4 6 コドン細胞外領域を含む 9 0 0 bp フラグメントを単離した。p B 0 4 7 5 を N s i I および E c o R V で切断し 4.1 kb フラグメント (合成 h G H 遺伝子を欠く) を精製した。 30 40

レセプターの 9 0 0 bp フラグメントおよび 4.1 kb ベクターフラグメントをライゲーションし、その組換えクローン (p J 1 4 4 6) を制限地図により確認した。これを大腸菌 K S 3 0 3 (トランスホームし (ストラーチ (Strauch) , K . 等 (1 9 8 8) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 8 5、1 5 7 6) 、ついで、低リン酸培地 (チャン (Chang) , C . N . 等 (1 9 8 7) *Gene* 5 5、1 8 9) 中 3 0 ° C で成育した。レセプターフラグメントたん白質を h G H アフィニティークロマトグラフィーで精製した (スペンサー (Spencer) , S . A . 等 (1 9 8 8) *J. Biol. Chem.* 2 6 3、7 8 6 2 ; レング (Leung) D . W . 等 (1 9 8 7) *Nature* 3 3 0、5 3 7) 。 p J 1 4 4 6 の配列をクローン化レセプターのアミノ酸配列とともに図 1 2 に示す。

【 0 0 5 9 】

大腸菌 W 3 1 1 0 , deg P 株 (ストローチ (strauch), K. L. 等 (1 9 8 8) P N A S U S A 8 5、1 5 7 6) を p J 1 4 4 6 でトランスホームし、ファーメンター中低リン酸培地 (チャン (Chang), C. N. 等 (1 9 8 7) Gene 5 5、1 8 9) を用い 3 0 ° C で生育させた。2 4 6 アミノ酸の h G H r を用い予備データをとった。アミノ酸 1 ~ 2 3 8 番を含むわずかに短かい h G H r を本明細書の実施例 1 で用いた。このレセプターについて得られた結果は 2 4 6 アミノ酸 h G H r で得た値と区別できなかった。

カルボキシル末端異質性の問題を避けるために G l n 2 3 8 の後に停止コドンを入れたプラスミド p h G H r (1 - 2 3 8) を構築した。p h G H r (1 - 2 3 8) を含む K S 3 3 0 培養物からは結合たん白質が p h G H r (1 - 2 4 6) を含む培養物からよりもわずかに高い収率でかつより均一なものが生成した (データ示さず) 。湿重量 0.2 kg の細胞ペレットから始め 7 0 ~ 8 0 パーセントの収率で 2 0 ~ 4 0 mg の高純度結合たん白質がルーチンに単離された (2 リットルの高密度細胞培養物から) 。N 末端シーケンシングおよび質量スペクトル分析と組合せたペプチドマッピングでその生成物は残基 1 から 2 3 8 に及んでいることが確認された。

p h G H r (1 - 2 4 6) テンプレートの部位指定突然変異誘発をオリゴヌクレオチド

* * * *

5' -ATG-AGC-CAA-TTT- ACG-CGT -TAG-GAA-GAT-TTA-3'

を用いて行ない (カーター (Carter), 等 (1 9 8 6) Nucleic Acids Res. 1 3、4 4 3 1 - 4 4 4 3) p h G H r (1 - 2 4 0 , C 2 4 1 R) を作った (式中アステリスクは p h G H r (1 - 2 4 6) とのミスマッチを示し、下線は新しい単独の M l u I 部位であり、C G T - T A G は C 2 4 1 R 突然変異とそれにつづく停止コドンを示す (第 X 表 A)) 。

【 0 0 6 0 】

【表 1 1】

第 X 表

hGH結合たん白質構築物のアミノ末端およびカルボキシ末端配列

プラスミド	末端	たん白質/DNA配列/制限部位
phGhr		- 3 -2 -1 +1 +2 +3
(1-246)	アミノ	ALA- TYR-ALA-PHE-SER-GLY GCC- <u>TAT-GCA-TTT-TCT-GGA</u>

Nsil

phGhr	カルボキシル	
(1-246)		238 239 240 241 242 243 244 245 246 GLN-PHE-THR-CYS-GLU-GLU-ASP-PHE-TYR-AM CAA-TTT-ACA-TGT-GAA-GAA-GAT-TTA-TAC- <u>TAG-CGGCCGC</u>

10

20

30

40

50

NotI

phGhr
(1-240,
C241R)

カルボキシル
Gln-Phe-Thr-Arg-AM

* * * * *

CAA-TTT- ACG-CGT -TAG-GAA-GAT-TTC-TAC- TAG-CGGCCGC

10

MluI

NotI

phGhr
(1-238)

カルボキシル
Gln-AM

** * * *

CAA-TAG-ACA-CGT-TAG-GAA-GAT-TTC-TAC- TAG-CGGCCGC

20

NotI

30

* は野生型テンプレートとのミスマッチを示す。

【 0 0 6 1 】

プラスミド phGhr (1 - 2 3 8) を MluI 部位 (第 X 表 (A)) に対する制限選択 (ウェルス (Wells), 等 (1 9 8 6) Phil Trans. R. Soc. Lond. A. 3 1 7 , 4 1 5 - 4 2 3) を用いた phGhr (1 - 2 4 0 , C 2 4 1 R) テンプレートの部位指定突然変異誘発により生成した。簡単に云うとオリゴヌクレオチド

* * *

40

5' -AG-ATG-AGC-CAA-TAG-ACA-CGT -TAG-GAA- 3'

は Gln238 (C A A トリプレット) の後に翻訳停止コドン誘導しかつ MluI 制限部位 (下線) を修正した。ヘテロ二本鎖による最初のトランスフェクションから二本鎖 DNA を回収した後、再トランスホームして DNA シーケンシングの前に目的とする phGhr (1 - 2 3 8) プラスミドを増やした。

最終的に phGhr (1 - 2 3 8) 中にクローン化した hGH 結合たん白質が cDNA 変異体またはクローニングアーテファクトを生じさせる T51A 突然変異を含むことは DN

50

Aシーケンシングで確認された。それゆえA51Tリバータントは報告されている配列と同じである。(レング(Leung)等(1987)Nature(London) 330、537-543。部位51にThrまたはAlaを含むたん白質の精製および結合性は区別できない(データ示さず)。Ala51結合たん白質変異体は特性が明らかになっているのでひきつづく全ての分析用に選択された。ヒト血清から単離した天然の産物と大腸菌由来の組換えhGH結合たん白質の特異性を比較するため野生型と種々のhGH変異体のアフィニティーを測定した。

【0062】

【表12】

第 X 表 (B)

hGH結合たん白質の K_d^a (nM) \pm S. D.

hGH 変異体	ヒト血清	Kd (変異体)		Kd (変異体)	Kd (ヒト血清) ^b
		Kd(wt)	大腸菌	Kd(wt)	Kd(大腸菌)
wt	0.55 \pm 0.07	—	0.40 \pm 0.03	—	1.4
158A	21 \pm 2	38 \pm 6	14 \pm 1	36 \pm 5	1.5
R64A	12 \pm 1	22 \pm 4	11 \pm 1	28 \pm 5	1.1
E174A	0.27 \pm 0.04	0.49 \pm 0.11	0.16 \pm 0.01	0.4 \pm 0.1	1.7
F176A	71 \pm 7	130 \pm 20	48 \pm 5	120 \pm 20	1.5

a. K_d 値およびその標準偏差 (SD) は、野生型 hGH (wt) および多くの hGH 変異体を用いた競争結合分析 (図 24) により測定した。

b. 各 hGH 結合たん白質に対する hGH 変異体および野生型 hGH (wt) の解離定数の比から計算される結合アフィニティーの減少。

c. 所定の hGH 型の 2 つの hGH 結合たん白質の解離定数の比。

【0063】

両たん白質は hGH と特定の化学両論比の複合体を形成した (図 24)。これから分るように野生型 hGH およびその変異体のアフィニティーは 2 つの結合たん白質間でほぼ同じであった (上述、右側欄)。組換え hGH 結合たん白質はヒト血清由来の中立たん白質と比べ非常に高いアフィニティーを有している。このことは、その組換えたん白質の純度および均一性を反映している。hGH 結合たん白質に対する結合能を破壊する hGH の 4 つのアラニン変異体に対する結合アフィニティーの変化によって示されるように両たん白質は同じ特異性を有している (上述 K_d (変異体) / K_d (wt))。Tyr246 にまで及び結合たん白質に対する hGH のアフィニティー ($K_d = 0.36 \pm 0.08$ nM) は実質的に Gln238 の後で終わっているものと同じであり ($0.40 + 0.03$ nM)、このことは、その分子の 7 個目のシステインを含む最後の 8 残基は hGH の結合に関し重要ではないことを示している。

【0064】

実施例 4

レセプターおよびモノクローナル抗体結合検定

精製した hGH または hGH 変異体 (95% 以上の純度) について、実施例 3 の可溶性 hGH レセプターへの結合に関する検定を行った。SDS-PAGE 後のコーマージ染色ゲルのレーザーデンストメータスキャンニングにより精製ホルモンの濃度を定量した。これらの値は 280 nm の吸光度による濃度 ($_{230}^{1\%} = 0.93$) とよく一致した。解離定数 (K_d) は 25°C における可溶性 hGH レセプターに結合する [125 I] hGH の競合置換に関するスキャッチャード分析から計算した。この [125 I] hGH はスペンサー (Sp

10

20

30

40

50

encer), S. A. 等 (1 9 8 8) , J. Biochem. 2 6 3、7 8 6 2) の方法に従って調製した。

酵素結合免疫吸着検定法 (E L I S A) を用い種々のセグメント置換および残基置換 h G H 変異体に対する 8 個のモノクローナル抗体の結合を検定した。以下の M a b を使用した。

【 0 0 6 5 】

<u>M a b</u>	<u>名 称</u>	<u>起源 / 方法</u>
1	Mab A	(*)
2	33.2	ハイブリテック社
3	Cat# H-299-01	メディックスバイオテック社
4	72.3	ハイブリテック社
5	Cat# H-299-02	メディックスバイオテック社
6	Mab 653	ケミコン
7	Mab D	(*)
8	Mab B	(*)

10

20

* カーボン (Carbone), F. R. 等 (1 9 8 5) J. Immunol. 135, 2609 。

【 0 0 6 6 】

h G H に対するウサギポリクローナル抗体をアフィニティー精製し、0.005 M 炭酸ナトリウム (pH 10) 中最終 2 μg / ml の濃度、24 °C、16 ~ 20 h マイクロプレート (Nunc プレート、インターメド社、デンマーク) をコーティングした。このプレートをバッファ B 中 (50 mM トリス [pH 7.5]、0.15 M NaCl、2 mM EDTA、5 mg / ml BSA、0.05 % トウイーン 20、0.02 % アジ化ナトリウム) 0.1 μg / ml の各 h G H と 25 °C、2 時間反応させた。プレートを洗浄後バッファ B で 150 ~ 0.002 nM に段階的に希釈した指示 Mab とインキュベートした。2 時間後プレートを洗浄し、ホースラ

30

ディッシュバーオキシダーゼ結合抗マウス抗体で染色して検定した。得られた値は各 h G H 変異体への最高結合量の半値を与えるのに必要な各 Mab の濃度を表わしている。抗 h G H Mab による h G H からの h G H レセプターの競合置換は以下のように測定した。この検定は先に述べたように抗 G H ウサギポリクローナル抗体をコートしたマイクロプレートにおける野生型 h G H の固定化により行った。レセプター (10 nM で固定) および所定の抗 h G H Mab (150 ~ 0.002 nM の範囲で希釈) を h G H コートマイクロプレートに入れ 25 °C で 16 ~ 20 時間インキュベートし、その後未結合成分を洗浄した。結合レセプター量は h G H と該レセプターとの結合を阻害しないホースディッシュバーオキシダーゼに結合させた抗レセプター Mab を加えることにより定量した。標準化置換値はプレート上の h G H を飽和するのに必要な Mab 濃度の半値に対する該レセプターの 50 % を置換するのに必要な Mab 濃度の比から計算した。この値は各 Mab の該レセプター置換能の比較に用いた。

40

【 0 0 6 7 】

実施例 5

ソマトジェニックレセプター結合の活性ドメイン

実施例 3 の可溶性ソマトジェニックレセプターおよび実施例 4 で述べたモノクローナル抗体への結合に関し、実施例 1 および 2 で述べた 17 個のセグメント置換 h G H 変異体を検定した。ソマトジェニックレセプターに対する結合検定の結果を第 III 表に示す。これから分るように結合能をほとんど破壊するセグメント置換は図 4 および図 5 の領域 A、C および F 内のものである。さらにこれらの領域をさらに小さいセグメントにしばり込みソマ

50

トジェニックレセプターへの結合に関係するhGH分子の活性ドメインの位置を決定した。第III表からの最も重要な結果を図4に示す。この図は、類似体hPRL、hPLおよびbGH由来の類似配列の置換による可溶性hGHレセプターへの結合における相対的減少を示した棒グラフである。各々アミノ酸残基12-19、54-74および164-190を含む3つの活性ドメイン領域A、CおよびFが同定された。これらの領域は図5のhGH分子の3次元に示されている。

これから分るように、3つの活性ドメインA、CおよびFはhGHのアミノ酸配列中では不連続であるけれどもhGHに関するソマトジェニック結合部位を規定する分子構造においては連続領域を形成している。

【0068】

実施例6

hGHエピトープマッピング

特定のセグメント置換hGH変異体に対する8種のモノクローナル抗体の結合を第XI表に示す。

【0069】

【表13】

第 XI 表

Mab

	1	2	3	4	5	6	7	8
		Hybr	Medix	Hybr	Medix			
hGH 変異体	MCA	33.2	1	72.3	2	Chemicon	MCD	MCB
wt hGH	0.4	0.4	0.1	0.05	0.2	0.2	0.08	0.1
hPL(12-25)	0.4	0.4	>75	> 50	0.2	0.2	0.08	0.1
pGH(11-33)	0.4	>100	1.5	0.05	0.2	0.2	0.08	0.1
hPRL(12-33)	0.4	>100	>75	> 50	0.2	0.2	0.08	0.1
hPRL(12-19)	0.4	> 12	>75	> 50	0.2	0.2	0.08	0.1
hPRL(22-33)	0.4	0.4	0.1	0.05	0.2	0.2	0.08	0.1
hPL(46-52)	0.4	0.4	0.1	0.05	0.2	0.2	0.40	0.1
pGH(48-52)	0.4	0.4	0.1	0.05	0.2	0.2	0.08	0.1
hPL(56-64)	0.4	0.4	0.1	0.05	0.2	0.8	0.08	0.1
pGH(57-73)	0.4	0.4	0.1	0.05	>200	>200	0.08	0.1
hPRL(54-74)	0.4	0.4	0.1	0.05	0.2	0.6	0.08	0.1
hPRL(88-95)	>400	0.4	0.1	0.05	0.2	0.2	0.08	0.1
hPRL(97-104)	>400	> 12	0.1	0.05	0.2	0.2	0.08	0.1
hPL(109-112)	> 12	0.4	>75	15	0.2	0.2	0.08	0.1
hPRL(111-129)	> 12	0.4	>75	> 50	0.2	0.2	0.08	0.1
hPRL(126-136)	0.4	0.4	0.1	0.05	0.2	0.2	0.08	0.1
pGH(164-190)	0.4	0.4	0.5	0.03	>25	12.5	0.20	0.4
pGH(167-182)								
hGH(Δ 32-46)	0.4	0.4	0.1	0.05	0.2	0.2	>100	>100
N12A	0.4	0.4	>75	>50	0.2	0.2	0.08	0.1
C182A	0.4	0.4	0.1	0.05	2.0	0.2	0.08	0.1

10

20

30

40

【 0 0 7 0 】

pGH(167-190)変異体は除いて各モノクローナル抗体に対する結合能の破壊は著しくかつ非常に選択的である。図13~20はhGHの3次元構造内の各Mabに対するエピトープの位置を示している。図6はソマトジェニックレセプターに対する結合部位に対するエピトープを示している。

たとえばhPRL(88-95), hPRL(97-104), hPL(109-112)およびhPRL(111-129)変異体はMabIに結合しないが、それらの領域以外の他のセグメント置換hGHは野生型hGHと同様の効率で結合した。Mab 2, 3, 4,

50

5 および 6 への結合は一次配列の不連続であるが、ホルモン 3 次元構造においては近接している領域の突然変異により阻害された（図 6 および図 14 ~ 19 参照）。これと対照的に Mab 1, 7 および 8 は図 13、図 19 および図 20 に示したように連続的配列で規定される突然変異により阻害された。さらに所定のモノクローナル抗体への結合を阻害する領域を、特定のセグメント置換 hGH 領域のサブドメインへの細分化または特定の Mab にすでに結合した共通の置換を有する変異体の分析により解析した。たとえば pGH (11-33) は Mab 4 への強固な結合を維持しているが hPRL (12-33) は結合能を失っていた。したがって、hPRL (12-33) 変異体における破壊的突然変異は pGH (11-33) では変異していない残渣：N12, L15, R16、D26 および E30 に限定し得る。さらに hPRL (12-19) 変異体は結合能を失ったが hPRL (22-23) は失なわなかったことから（図 16 参照）、これは N12、L15 および R16 に限定される。N12H 突然変異が pGH (11-33) とは共通しない変異であることからこれで Mab 4 への結合の阻害を説明し得る。このことを Asn-12 のアラニン置換でテストした。N12A 残基置換 hGH 変異体への Mab 3 または Mab 4 の結合は 100 倍以上も減少したが他の Mab への結合は影響を受けなかった。

10

【0071】

このセットの hGH 変異体を用いることにより、8 個の Mab のほとんどの結合が共通セットの突然変異により阻害されたとしてもこれらの Mab 全てのエピトープを解明し得る。たとえば hPRL (12-19) は Mab 2, 3 および 4 への結合を示さないが、他の変異体はこれらの Mab が種々の構造を認識することを示した。特に Mab 2 および 3 は pGH (11-33) により阻害されるが Mab 4 は影響を受けなかった。Mab 3 および 4 の結合は hPRL (12-25) により阻害されたが Mab 2 への結合は影響を受けなかった。このように 8 個の抗体は重複するが完全に重ならないエピトープを有する。結合を乱す突然変異はヘリックスおよびループの両方に存在し、かつ常にホルモン構造において近接している。合せて考えてみると、8 個の Mab セットのエピトープはこのホルモンのほとんどをカバーする。しかしなお Mab が結合しない領域がある。たとえば 20 個の変異体のうちの 3 個はテストした Mab (hPRL (22-33)、pGH (48-52) および hPRL (126-136) のいずれに対する結合も有意に乱さなかった。

20

抗体エピトープとレセプター結合部位には有意な差がある。第 1 に阻害的突然変異により規定されるバッチはどの Mab に関してよりもレセプターに関するものの方が大きい。第 2 の差はレセプターが Mab よりもホルモンの阻害的置換に対しより耐性が強い。これはどの変異体のレセプターへの結合に関してもその最大の減少は約 70 倍であるがほとんど全ての抗体には N12A などの単一置換の結果の場合のように 1000 倍の結合の減少をひき起こす少なくとも 1 つの変異体がある。

30

【0072】

実施例 7

Mab および s hGH r の競合的結合

レセプター結合を乱す多くの変異体は 1 つ以上の Mab の結合も乱す。すれゆえ、hGH に対する hGH レセプターの結合を阻害する 8 個の Mab の各々の能力を評価した。この検定の結果を第 XII 表に示す。

40

【0073】

【表 14】

第 XII 表

Mab	hGHへの 50%結合	レセプターの 50%置換	標準化置換
			50%置換の濃度 50%結合の濃度
1	0.4	>150	>375
2	0.4	0.8	2
3	0.1	150	1500
4	0.05	150	3000
5	0.2	0.2	1
6	0.2	0.2	1
7	0.08	0.4	5
8	0.1	>150 °	> 1500

(*) Mab 8 の結合は hGH へのレセプターの結合をわずかに促進するようである。

+ hGH の各 Mab の結合に関する第 X 表からのデータ。

【 0 0 7 4 】

表から分るように Mab 5 および 6 は hGH レセプターの結合を阻害する上で最も効率がよい。このことはそれらの Mab がレセプターに対する決定基と密接に重複する残基 54 - 74 までのレーブおよびヘリックス 4 内に存在する抗原決定基を有することによる (図 5、図 6、図 17 および図 18 参照)。Mab 2 は次に競合的な抗体であり、かつレセプターと共通する阻害的突然変異を共有する (hPRL (12 - 19))。これに対し Mab 3 およ

び 4 は Mab 2 に比べおおよそ 1000 倍競争力が小さいがそれらはまたヘリックス 1 中にレセプターと重複する阻害的突然変異を共有している。図 15 および図 16 参照。Mab 3 および 4 を乱すヘリックス 1 中の突然変異が Mab 2 またはレセプターへの結合を乱す残基と異なるならこの見かけ上の差は容易に解決されよう。事実、1 つの変異体 (N12A) は Mab 2 またはそのレセプターへの結合に影響することなく Mab 3 または 4 の結合を乱す。

【 0 0 7 5 】

実施例 8

レセプター活性アミノ酸残基

実施例 5、6 および 7 における hGH の分析はレセプター結合に重要なヘリックス 1 のアミノ末端領域 (残基 11 - 19) を含んでいる。さらに残基 54 - 74 および 167 - 191 もレセプター結合に重要であることが分った。レセプター結合に活性なこれらのドメイン中のアミノ酸の同定は全部で 63 個の単一アラニン変異体を分析することにより行っ

10

20

30

40

50

た。第XIII表、第XIV表、および第XV表参照。

【 0 0 7 6 】

【 表 1 5 】

第 XIII 表

hGH中の部位2-19のアミノ酸スキャンニング

<u>変異体</u>	<u>Kd (nM)</u>	<u>Kd(variant)/ Kd(wt)</u>	
wt	0.34	1.0	
P2A	0.31	0.90	10
T3A	0.31	0.90	
I4A	0.68	2.0	
P5A	0.71	2.1	
L6A	0.95	2.8	
S7A	0.61	1.8	
R8A	0.48	1.4	
L9A	0.32	0.95	20
F10A	2.0	5.9	
D11A	NE	-	
N12A	0.40	1.2	
A13(WT)			
M14A	0.75	2.2	
L15A	0.44	1.3	
R16A	0.51	1.6	30
A17(WT)			
H18A	0.24	0.71	
R19A	0.37	1.1	

【 0 0 7 7 】

【 表 1 6 】

第 XIV 表

hGH中の部位54-74のアミノ酸スクランニング

変異体	Kd (nM)	Kd(variant)/ Kd(wt)	
wt	0.31	1.0	
F54A	1.5	4.4	
S55A	0.41	1.2	
E56A	1.4	4.1	10
S57A	0.48	1.4	
I58A	5.6	17.0	
P59A	0.65	1.9	
T60A	NE	-	
T61A	NE	-	
S62A	0.95	2.8	
N63A	1.12	3.3	20
R64A	7.11	21.0	
E65A	0.20	0.6	
E66A	0.71	2.1	
T67A	NE	-	
Q68A	1.8	5.2	
Q69A	0.31	0.9	
K70A	0.82	2.4	30
S71A	0.68	2.0	
N72A	NE	-	
L73A	0.24	0.70	
E74A	NE	-	

【 0 0 7 8 】

【 表 1 7 】

第 XIV 表

hGH中の部位167-191のアミノ酸スクランニング

変異体	Kd (nM)	Kd 変異体 / Kd WT	
WT	0.34	1	
R167A	0.26	0.75	
K168A	0.37	1.1	
D169A	NE	-	10
D169A	NE	-	
M170A	NE	-	
K171A	2.4	7.1	
K172A	4.6	14	
V173A	NE	-	
E174A	0.075	0.22	
T175A	NE	-	20
T175S	5.9	16	
T176A	5.4	16	
L177A	NE	+	
R178A	NE	-	
R178N	1.4	4.2	
I179A	0.92	2.7	
V180A	0.34	1.0	30
Q181A	0.54	1.6	
C182A	1.9	5.7	
R183A	0.71	2.1	
S184A	0.31	0.90	
V185A	1.5	4.5	
E186A	0.27	0.80	
G187A	0.61	1.8	40
S188A	0.24	0.7	
C189A	NE	-	
G190A	NE	-	
F191A	0.20	0.60	

【 0 0 7 9 】

アミノ末端残基位置の不明確さのためアラニン置換は残基 2 - 19 を含むように行った (50

アブデル - メギド (Abdel-Meguid), S. S.等 (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 84, 6434)。実際に結合のもっとも著しい減少はF10A (6倍) でつづいてヘリックス1のN末端の残基4-6のアラニン置換で起こった (図21参照)。結合に関して実質的により大きい効果 (20倍以上) は残基54~74のループおよびカルボキシ末端配列167-191内の特異的アラニン置換で起った。いくつかのアラニン変異体の結合は4.5倍に増加した。最も劇的な例は多くの破壊的アラニン突然変異の中間に位置するE174Aであった。図4、図7および図21参照。

ほとんどの破壊的アラニン置換はF10からR64およびD171からV185に広がる約25°角のバッチをホルモン上に形成する (図21参照)。さらにこれらの側鎖はその分子の同じ方向を向いているようである。たとえばヘリックス4に関する結合に最も影響する全てのアラニン変異体 (D171A, K172A, E174A, F176A, I179A, C182AおよびR183A) はこのヘリックスの3回半に限られまたそれらの側鎖はこのヘリックスの同じ面から突き出ている (図21参照)。このモデルに基づいて、T175およびR178は、図21で示されているように中央位置を占めていることから結合に関与していることが予想される。

T175A変異体は振とうフラスコ中検定するのに十分な収率で発現されないけれども、より保存的変異体 (T175S) であった。したがってT175S変異体はレセプター結合が16倍減少した。同様に、R178Aはあまり発現されないにもかかわらずR178Nは分析可能な収量で発現した。R178Nは結合アフィニティーが4倍以上減少した。

【0080】

カルボキシ末端における次に破壊的変異体はV185Aであった。V185Aはヘリックス4の外にあるけれども、このモデルによりヘリックス4内の破壊的突然変異を同じ方向を向いていることが予想される。これに対し結合バッチ外のアラニン突然変異またはその中にあり上述のものと反対を向いているアラニン突然変異 (R167A, K168A, V180A, Q181A, S184A, E186A, S188A) は一般にレセプター結合に関して影響しないか、またはほとんど影響しない。

ヘリックス1におけるアラニン変異体は並みの効果しかもたないがこれにも同様の分析を行った。このヘリックス内でもっとも結合を破壊するアラニン置換はこのヘリックスの同じ面に存在する残基6, 10および14のものであった。もっとも小さい破壊的アラニン突然変異 (L9A, N12AおよびL15A) ヘリックス1の反対の面に存在する。さらにこのことはhGHに対する結合をレセプターと競合しない抗hGH Mab3および4の両方がA_{sn}-12に結合するという事実により確認される。第XVI表参照。

【0081】

【表18】

第 XVI 表
8種の抗hGHモノクローナル抗体 (Mab) に対する
hGHおよびアラニン変異体の結合

ホルモン	M a b							
	1	2	3	4	5	6	7	8

10

20

30

40

hGH	0.4	0.4	0.1	0.05	0.2	0.2	0.08	0.1
F10A	0.4	0.4	0.1	0.05	0.2	0.2	0.08	0.1
N12A	0.4	0.4	>75	> 50	0.2	0.2	0.08	0.1
158A	0.4	0.4	0.1	0.05	0.2	0.2	0.08	0.1
R64A	0.4	0.4	0.1	0.05	0.2	0.2	0.08	0.1
Q68A	0.4	0.4	0.1	0.05	0.2	0.2	0.08	0.1
K168A	0.4	0.4	0.1	0.05	0.2	0.2	0.08	0.1
D171A	0.4	0.4	0.1	0.05	0.2	0.2	0.08	0.1
K172A	0.4	0.4	0.1	0.05	0.2	0.2	0.08	0.1
E174A	0.4	0.4	0.1	0.05	0.2	0.2	0.08	0.1
F176A	0.4	0.4	0.1	0.05	0.2	0.2	0.08	0.1
C182A	0.4	0.4	0.1	0.05	0.2	0.2	0.08	0.1
V185A	0.4	0.4	0.1	0.05	0.2	0.2	0.08	0.1

10

20

【 0 0 8 2 】

54 - 74 ループ内の側鎖の相対的位置はそれらがヘリックス1および4内の側鎖のように固定しえない。しかし偶数残基の突然変異は奇数残基に比べ結合を大きく阻害するという結合において著しい周期性がある。特にこのことはこの領域の最初の部分によくてはまり(54 - 59)かつ偶数残基はレセプターの方に突き出ておりかつ奇数残基は反対を向いているという構造を反映している。

【 0 0 8 3 】

実施例9

アラニン置換hGH変異体の構造完全性および結合エネルギー

いくつかの証拠はレセプター結合を乱すアラニン置換は分子の構造をゆがめることによりそれを起こすのではないことを示している。第1に8種のMabはhGHに関して同様レセプターへの結合の破壊を起こすほとんどすべてのアラニン変異体と反応する。先の第XII表参照。

例外は各々個hGH Mab6および5への結合を瀬洗濯的に破壊するR64AおよびC182Aである。これら2つのMabは以前にhGHへの結合に関しソマトジェニックレセプターと競合することが示された。さらにレセプター結合に影響しない2つのアラニン変異体を作った。1つは2つのMabの結合に影響し(N12A)、もう1つはMabのいずれにも影響しない(K168A)。このデータはMabもしくはレセプターへの結合が変異体構造の非常に局所的ゆらぎにより破壊されることを示している。さらに全てのhGH変異体の遠紫外円二色スペクトルは野生型hGHと実質的に同じであった。

振とうフラスコ中、アラニン変異体の約20%(D11A、T60A、P61A、T67A、N72A、E74A、D169A、M170A、V173A、T175A、L177A、K178A、C189A、G190A)は単離および分離するのに十分なレベルで分泌されなかった。このような変異体をコードする遺伝子は同じベクターで発現され、かつその発現は特定のアラニンコドンとは独立しているので定常的発現レベルの変化は、おそらく分泌レベルの差および、またはhGH変異体のたん白質分解を反映したものである。ヘリックス4における非発現性アラニン変異体のいくつかはヘリックスの疎水性側面を白

30

40

50

で示した図 2 1 に示されている疎水性面上に存在する (M 1 7 0 A , V 1 7 3 A および L 1 7 7 A)。しかしいくつかのアラニン置換がヘリックス 1 (L 6 A , L 9 A および F 1 0 A) およびヘリックス 4 (F 1 7 6 A および V 1 8 0 A) の疎水性面内で容認されていることからこのことは一般的な効果ではない。

【 0 0 8 4 】

さらに h G H 変異体の発現の減少は荷電または中性アミノ酸がアラニンと置換したときにしばしば観察される (D 1 1 A , T 6 0 A , T 6 7 A , N 7 2 A , F 7 4 A , D 1 6 9 A , T 1 7 5 A , R 1 7 8 A)。水素結合基をその部位に保存する T 1 7 5 S および R 1 7 8 N のような突然変異はたとえあったとしても野生型よりも低いレベルで発現される。非発現性の C 1 8 9 A 変異体はカルボキシ末端スルフィドを破壊し、かつその相対物 (C 1 8 2 A) も野生型よりもはるかに低いレベルで発現する。他のいくつかの非発現性アラニン変異体 (T 6 0 A , T 6 1 A および T 6 7 A) はループ構造内に存在する。したがって低レベル発現または非発現は多くの構造効果に由来するが単一構造的または単一機能的置換によって回避し得る。

結合に 1 0 倍以上の効果を示す置換 (1 5 8 A , R 6 4 A , K 1 7 2 A , T 1 7 5 S , F 1 7 6 S , F 1 7 6 A) は直接結合に関与しているようである。天然に存在する (ファーシュト (Fersht), A. R. (1 9 7 2) J. Mol. Biol. 6 4, 4 9 7 ; ブラウン (Brown), L. R. 等 (1 9 7 8) Eur. J. Biochem. 8 8, 8 7 ; マリバー (Malivov), R. 等 (1 9 7 3) J. Mol. Biol. 7 6, 1 2 3) または部位指定突然変異誘発で作りに上げられた (ファーシュト (Fersht), A. R. 等 (1 9 8 5) Nature 3 1 4, 2 2 5 ; ブライアン (Bryan), P. 等 (1 9 8 6) Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 8 3, 3 7 4 3 ; ウェルズ (Wells), J. A. 等 (1 9 8 7) Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 8 4, 1 2 1 9 ; クロニン (Cronin), O. N. 等 (1 9 8 7) J. Am. Chem. Soc. 1 0 9, 2 2 2 2 ; グラフ (Graf), L. 等 (1 9 8 8) Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 8 5, 4 9 6 1) 水素結合または塩橋の強さは微環境に依存して 1 ~ 5 Kcal/mol の範囲に広く分布している。h G H に関する結合自由エネルギーの減少は E 5 6 , Q 6 8 , D 1 7 1 , K 1 7 2 および R 6 4 の各アラニン置換に対し 0.8、1.0、1.2、1.6 および 1.8 Kcal/mol (G 結合 = + R_T ln K_d (変異体) / K_d (wt)) であった。疎水性側鎖のたん白質中への埋没のエネルギーはエダノール中への転移の自由エネルギーに対応する傾向がある (エステル (Estoll), D. A. 等 (1 9 8 6) Science 2 3 3, 6 5 9 ; キザキ (Nozaki), Y. 等 (1 9 8 0) “ 疎水性効果 ” (ウィリー版、N. Y. 4 ~ 2 1 頁))。

したがって F 1 7 5 A , F 1 0 A , P 5 4 A , 1 5 8 A および V 1 8 5 A の結合自由エネルギーの減少は各々 1.6、1.0、0.9、1.7 および 0.9 Kcal/mol であった。これらの値は Phe , Ile または Val から Ala への置換における疎水性自由エネルギーの予想値、各々 2.0、2.4 および 1.0 Kcal/mol よりもわずかに小さい。この分析により、T 1 7 5 S 変異体の効果 (G 結合 = 1.6 Kcal/mol) はガンマメチル基の損失に期待される効果 (G 疎水性 = 0.7 Kcal/mol) よりも大きい。h G H とそのソマトジェニックレセプターとの分子接触の性質を十分把握するために直接的構造の情報が必要である。しかし、これらアラニン変異体の結合エネルギーはそれらが全く別のシステムにおける接触残基について行った以前の測定の範囲内にあることを示している。事実、レセプター結合に最も破壊的である C 1 8 2 A を除いたアラニン置換変異体の結合自由エネルギーの総和は (- 13.2 Kcal/mol)、h G H とそのレセプター間の総結合自由エネルギーと一致している (- 13 Kcal/mol)。

【 0 0 8 5 】

実施例 1 0

h G H 変異体の抗 h G H ポリクローナルとの反応性

h G H 変異 h P R L (2 2 - 2 3)、E 1 7 4 A および h P R L (8 8 - 9 5) をラットの体重検定でテストした。この検定の結果を図 2 2 に示す。これから分るように h P R L (2 2 - 3 3) 以外の変異体は生育的 1 4 日後減少能を有している。成長のレベルダウンは生物学的効果を中和する種々の成長ホルモンに対する抗体の発現に寄因する。h P R L

10

20

30

40

50

(22-33) 変異体が成長しつづけたという事実はそれが野生型 hGH または使用した他の変異体と同じ免疫原性をもたないことを示している。

hGH に対する種々の hGH 変異体の反応性をポリクローナル抗体を含むヒトおよびマウスの血清と比較した結果を第 XVII 表に示す。

【0086】

【表19】

第 XVII 表
hGH 変異体への血清抗 hGH 抗体の結合
抗プロトロピン結合

	減少率の平均値±SD		変化率 (%)	
	ヒト血清 (N=22)	マウス血清 (N=6)	ヒト血清	マウス血清
hGH	0	0	100	100
pGH 11-33	86±13	65±16	100	100
hPRL 12-33	79±19	52±13	100	100
hPL 12-25	35±19	16±11	81	33
hPRL 12-19	29±20	11±12	71	33
hPRL 22-33	69±15	38±8	100	100
hPL 46-52	6±8	2±4	10	0
pGH 48-52	7±8	4±4	10	0
pGH 57-73	43±15	39±12	95	100
hPRL 54-74	14±9	8±7	24	0
D80	13±15	7±7	14	0
hPRL 88-95	14±22	4±5	19	0
hPL 109-112	10±11	9±9	24	17
hPRL 126-136	8±12	2±2	19	0
C182A	1±5	1±3	5	0

【0087】

表から分るように残基 22 ~ 33 の領域内に置換を含む変異体は野生型 hGH に対し各ヒトおよびマウス抗血清との結合活性が実質的に減少しているか、またはある場合には活性をもたない。

変異体 pGH 57-73 を除いて、他の領域の置換を含む変異体は有意な反応性の減少を示さない。残基 11 および 33 の間のセグメント置換変異体はソマトジェニックレセプターへの結合能を維持しているため、このような変異体はソマトジェネシスの推進能は維持しているが他の性質、この場合抗 hGH ポリクローナル抗体への反応性を变化させた変異体の生成を示している。

10

20

30

40

50

【 0 0 8 8 】

実施例 1 1

Kd と能力の関係

特定の hGH 変異体の Kd (変異体) / Kd (野生型) の比とラット体重検定におけるこれら変異体の能力のセミログプロットを図 23 に示す。これから分るように線型関係の存在はソマトジェニックレセプターへの結合アフィニティーの減少は能力の減少を示している。

図から分るように、hGH 変異体 E174A はソマトジェニックレセプターに関し野生型 hGH よりも高い結合アフィニティーを有している。また、この能力は野生型 hGH よりも約 12% 大きい。

さらに変異体 PRL (94-104) は基本的に野生型と同じ結合定数を有しているが能力は約 2.7 倍大きい。

【 0 0 8 9 】

実施例 1 2

プロラクチンレセプター結合に関する hGH の活性ドメイン

ヒト成長ホルモン (hGH) は模型成長、泌乳、窒素遅延、糖尿病誘発性およびインシュリン様効果およびマクロファージ活性化など多くの生理効果を示す。R. K. チョウラ (Chawla), J. S. パークス (Parks) および D. ラドマン (Rudman), *Annu. Rev. Med.* 34、519 - 547 (1983); O. G. P. イサクソン (Isaksson), 等 (1985), *Annu. Rev. Physiol.* 47、483 - 499; C. K. エドワーズ (Edwards) 等 (1988) *Science* 239、769 - 771。これらの効果は各々 hGH と特異的細胞レセプターとの相互作用で始まる。J. P. ハイス (Hughe) 等 (1985) *Annu. Rev. Physiol.* 47、469 - 482。これまでの hGH と結合する生成物を作るクローン化遺伝子の肝臓の hGH レセプター (A. W. レング (Leung), 等 (1987) *Nature* (ロンドン) 330、537 - 543) および乳線のヒトプロラクチン (hPRL) レセプター (J. M. ブーチン (Boutin) 等、(1988) *Cell* 53、69 - 77) のみであった。hPRL レセプターへの hGH のレセプター “スピルオーバー” は高レベルの hGH を生産する先端巨大症が、通常レベルの hPRL を有するにもかかわらず過プロラクチン症となる場合の臨床的徴候である (J. E. フラドキン (Fradkin) 等 (1989) *New Engl. J. Med.* 320、640 - 644)。しかし hGH と結合する他のレセプターが存在し、これらには胎盤ラクトゲン (PL) レセプター (M. フリーマーク (Freemark) 等 (1987) *Endocrinology*) 120、1865 - 1872)。これらのレセプターに関する hGH 上の結合部位が同一のものであるかどうか、またはどのレセプター (レセプター群) が薬学効果を担っているかは分っていなかった。これらの問題を解くために hGH および hPRL レセプター結合部位の位置決めがなされた。得られた結果はこれらのレセプター結合部位は重複しているが、同一のものではないことを示している。このことは hGH のレセプター特異的変異体の合理的設計を可能にする。

【 0 0 9 0 】

hGH および hPRL レセプターには 32% の配列ホモロジーをもつ細胞外ホモロジー結合ドメイン、単一のトランスメンブレンドメインおよび配列の長さも様々である細胞質内ドメインがある。hGH レセプターの細胞外結合ドメインは大腸菌中で発現され、かつ可溶性血清結合たん白質など天然に見られるものと同じ結合性を有する (S. A. スペンサー (Spencer) 等 (1988) *J. Biol. Chem.* 263、7862 - 7867)。同様に hPRL レセプターの細胞外ドメインは大腸菌内で発現されかつ精製された。hPRL レセプターフラグメントは残基 Gln1 から Thr 211 にわたり、単一のトランスメンブレンドメインの直前で終わっている。それは完全な長さのレセプターと実質的に同じ高い結合アフィニティーおよび特異性を有している。この実験で用いている hPRL レセプターをコードする遺伝子はカナダ モントリオール マクギル大学、ケリー (Kelly), P. A. 博士により提供された。この DNA 配列はヒト乳線 cDNA ライブラリーから入手し、プロラクチンレセプター群の交叉種メンバーのうち既知の保存領域をカバーするプローブで同定され

10

20

30

40

50

た。たとえばダビエス (Davies) J. A. 等 (1989) Mol. Endocrinology 3、674 - 680 ; エデリー (Edery) 等 (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 86、2112 - 2116 ; ジオリコアー (Jolicoeur) 等 (1989) Mol. Endocrinology 3、895 - 900 参照。これらの短縮型で高純度のレセプターは h G H 変異体の結合アフィニティーの迅速かつ正確な検定に非常に有用な試薬である。

【0091】

h P R L および h G H レセプター結合部位の関係

h G H および h P R L レセプターのエピトープが重複しているかどうかを測定するため我々は h P R L レセプターフラグメントが h G H 由来の h G H レセプターフラグメントと置換し得るかどうか分析した (データ示さず)、事実、h P R L レセプターフラグメントは h G H レセプター結合部位に関し見かけ上の K_d 値 1 nM で競合する。これは h G H に対する h P R L レセプターの直接的結合で測定されたアフィニティーと実質的に同じである (結果示さず)。

10

第 III 表のセグメント置換 h G H 変異体のうちの 7 つを用い h P R L レセプターに関する h G H 上のエピトープの位置を決定した。この実験には h G H 32 - 46 変異体を用いた。方法は h G H s の代わりに h P R L r をレセプターとして用いたこと以外に述べた h G H レセプターに対する h G H 上のエピトープの決定に用いた方法、すなわち h G H 変異体の結合への影響により行った。上述の 12 個のセグメント置換 h G H 変異体の結果を第 XVIII 表に示す。

【0092】

20

【表 20】

第 XVIII 表

h P R L レセプター (h P R L r) の細胞外ドメインに対するホモロゲスキャンニング突然変異誘発により調製した h G H 変異体の結合、変異体は種々の h G H 類似体 : p G H、h R L、または h R L から置換したセグメントに従って命名した。導入された突然変異の正確な記述はコンマで区切られた一連の単一変異体で与えられる。各単一変異体は野生型残基の 1 文字コードとそれにつづく成熟 h G H 中のそのコドンの位置および変異体残基で示される。h G H の変異体を先に述べた方法で生産し、精製下。h P R L r への結合は基本的に h G H r について述べた方法で測定した (スペンサー (Spencer), S. A. 等 (1988) J. Biol. Chem. 263、7862 - 7867)。もっともこの方法では h P R L r に対するアフィニティー精製ウサギポリクローナル抗体を用いキャリアたん白質としてギブコ製 B S A (粗) を使って h P R L r 複合体を沈殿させた。一般に K_D 値の標準偏差は報告されている値の 20 以下であった。h G H r に対する結合アフィニティーの相対的減少 (K_D (変異体) / K_D (h G H)) は第 III 表から得られたものである。レセプター選択性の変化は h G H r に対する結合アフィニティーを h P R L r と比較した相対的減少比で計算した。W T - 野生型。

30

レセプター選択
性の変化

変異体名	導入変異	hPRLr		hGHR	
		K _D (aM)	K _D (hGH)	K _D (hGH)	K _D (hPRLr)
MT hGH	なし	2.3	(1)	(1)	(1)
pGH					
(11-33)	D11A, M14V, H180, R19H, F25A, Q29K, E33R	852	370	3.4	110
pGH					
(48-52)	P48A, T50A, S51A, L52F	2.0	0.9	2.8	0.32
pGH					
(57-73)	S57T, T60A, S62T, N63G, R64K, E65D, T67A, K70R, N72D, L73V,	167	73	17	4, 3
pGH					
(△32-46)	残基の欠失 32~46	14	6.1	ND	
hPL					
(46-52)	Q46H, N47D, P48S, Q49E, L52F	4.4	1.9	7.2	0.26
hPL					
(56-64)	H56D, R64M,	4.1	1.8	30	0.06

10

20

30

40

hPRL							
(12-19)	N12R, M14V, L15V, R16L, R19Y	3.2	1.4	17	0.08		
hPRL							
(22-33)	Q22N, P25S, D26E, Q29S, た30Q, E33K,	168	73	0.85	85		10
hPRL							
(54-74)	F54H, S55T, A56S, 158L, P59A, S62E, N63D, R64K, E66Q, T67A, K70M, S71N, N72Q, L73K, E74D	2.5	1.1	69	0.02		20
hPRL							
(88-95)	E88G, Q91Y, F92H, R94T, S95E	2.5	1.6	1.4	1.1		30
hPRL							
(97-104)	F97R, A98G, N99M, S100Q, L101D, V102A, Y103P, G104E	12.1	5.2	1.6	3.2		
hPRL							
(111-129)	Y111Y, L113I, K115E, D116Q,	2.6	1.1	1.5	0.73		40

E118K, E119R,
G120L, Q122E,
T123G, G126L,
R127I, E129S

NT hPRL な し 7.6 3.3 >100.000

10

【 0 0 9 3 】

表から分るように pGH (1 1 - 3 3) および pGH (5 7 - 7 3) は hPRL レセプター結合アフィニティーに大きな影響を及ぼす一方 pGH (4 8 - 5 2) は影響をもたない。hGH レセプターとは異なり hPRL レセプターは hPRL および hPL とは結合するが pGH とは結合しない。予想されるように、結合競合ホルモン hPL または hPL 由来の実質的に全ての置換は結合に影響しなえった。唯一の例外は hPL レセプターへの結合アフィニティーが 7 0 倍以上減少する hPRL (2 2 - 3 3) である。このように hPRL レセプターは hGH 中ヘリックス 1 の中央領域および残基 5 7 および 7 3 の間のループ付近の突然変異に非常に敏感である。

20

またホモログスキャンデータにより hPRL および hGH レセプターエピトープはいくつかのセグメント置換変異体がレセプター結合選択性に大きな変化を与えることから同一ではないことが示された (第 XVIII 表) 。たとえば pGH (1 1 - 3 3) または hPRL (2 2 - 3 3) により引き起こされる結合への影響は hGH レセプターに対してよりも hPRL レセプターに対しての方が約 1 0 0 倍大きい。一方、hPL (5 6 - 6 4) および hPRL (5 4 - 7 4) は hPRL レセプターに関してほとんど影響しない一方それらは各々 1 7 倍および 6 9 倍 hGH レセプターへの結合が弱くなった。さらにこれらの選択的結合効果 (先に議論したモノクローナル抗体の結合とともに) はレセプター結合アフィニティーの減少は hGH の変異体における局所的であり、全体的構造変化によらないことを実証している。

30

【 0 0 9 4 】

hPRL レセプターへの結合を強く調節する hGH 中の特定の側鎖をアラニンスキャンニング突然変異誘発および相同的置換により同定した。第 XIX 表に示した hGH 変異体を調製した。hPRL 置換、F 2 5 S および D 2 6 E はヘリックス 1 における結合アフィニティーの最も大きい減少を引き起こした (各々 2 1 および 4 5 倍) 。これらの残基はヘリックス 1 の親水性面から突き出ており、かつ結合に緩やかな効果を与えるヘリックス 1 中の他の突然変異 (主に H 1 8 A および F 1 0 A) と同じ側に存在する。

hGH レセプターの結合に影響することが知られているループ領域 (5 4 ~ 6 8) 中の 4 個の残基ならびに近接しているが hGH レセプター結合に影響しないこの領域に先行する 2 つの残基 (Q 4 9 A および T 5 0 A) をテストした。最も破壊的な変異体は 1 5 8 A および R 6 4 A であり、これらは各々結合アフィニティーが 3 2 倍および 6 倍減少している。他の 4 個の突然変異の影響は無視できる。

40

ヘリックス 1 およびループ領域 (5 8 - 6 4) が hPRL レセプターに対する強力な結合決定基を含むという事実はヘリックス 4 と関係する。というのはこのヘリックスはこれら 2 つの構造の間に押し込まれているためである (図 2 5 B) 。事実、C 1 6 5 ~ V 1 8 5 に結合するジスルフィド間のヘリックス 4 領域のアラニンスキャンニングは強力な結合決定基を明らかにした (第 XIX 表) 。最も破壊的突然変異はほとんど 4 個のヘリクスターン、R 1 6 7 ~ R 1 7 8 に分布しており、かつ同じ親水性面に存在する。

50

【 0 0 9 5 】

【 表 2 1 】

第 XIX 表

h P R L または h G H レセプターフラグメント (h P R L r または h G H r) に対する h G H の単一変異体の結合。部位指定突然変異誘発で作った Q 2 2 N , F 2 5 S , D 2 6 E , Q 2 9 S および E 3 3 K 以外の h G H の変異体は先に述べたように調製及び精製した (カニングム (Cunningham), B. C. およびウェルズ (Wells), J. A. (1 9 8 9) Science 2 4 4、1 3 3 0 - 1 3 3 5 ; ゾラー (Zoller), M. J. およびスミス (Smith), M. (1 9 8 2) Nucleic Acids Res. 1 0、6 4 8 7 - 6 4 9 9)。レセプター結合アッセイおよび変異体の名称を第 XVIII に示す。h G H r に対する結合アフィニティーの減少のデータは第 III 表からとった。N D は測定しなかったことを示す。

10

変異体	hPRLr		hGHr		レセプター選択 性の変化
	K _D (nM)	K _D (mut)	K _D (mut)	hGHr	hPRLr
		K _D (hGH)	K _D (hGH)		
WT hGH	2.3	(1)	(1)	(1)	
P2A	1.3	0.6	0.9	0.7	
T3A	3.4	1.5	0.9	1.7	10
P5A	2.5	1.1	2.1	0.5	
L6A	4.0	1.8	2.8	0.6	
S7A	1.9	0.8	1.8	0.4	
F10A	8.1	3.5	5.9	0.6	
N12A	1.9	0.8	1.2	0.7	
M14A	1.3	0.6	2.2	0.3	
L15A	1.2	0.5	1.3	0.4	20
H18A	3.9	1.7	1.6	0.6	
R19A	1.4	0.6	0.7	2.4	
Q22N	2.1	0.9	ND	-	
F25S	48	21	ND	-	
D26E	10	4.5	ND	-	
Q29S	3.2	1.4	ND	-	
E33K	1.8	0.8	ND	-	30
G49A	1.5	0.7	ND	-	
T50A	1.9	0.8	ND	-	
F54A	1.8	0.8	4.4	0.2	
I58A	73	32	17	1.9	
R64A	13	5.7	21	0.3	
Q68A	3.1	1.2	5.2	0.3	40

R167A	7.4	3.2	0.75	4.3
K168A	58	25	1.1	23
D171A	3.6	1.6	7.1	0.2
K172A	143	62	14	4.4
E174A	59	26	0.22	120
F176A	129	56	16	3.5
R178N	2.4	1.0	8.5	0.1
R178K	6.7	2.9	ND	-
I179M	1.3	0.6	2.7	0.2
V185A	3.9	1.7	4.5	0.4

10

【0096】

機能地勢図はhGHおよびhPRLレセプターの位置に基づいて導びいた(図28)。hPRLレセプターに対する最高のエピトープ部分は、(図25B)。結合アフィニティーの2倍以上の減少を示す突然変異が割り振られる。この基準によりhPRLレセプターのエピトープは基本的にF10~Q29のヘリックス1の前面、F54~Q68のループおよびR167からR178のヘリックス4の親水性面に限定される。一方、hGHレセプターエピトープ(図25A)はアミノ末端領域から14~M14のヘリックスの前面、F54からS71のヘリックス1の前面およびD171からV185のヘリックス4の親水性面の残基を含む。さらに変異分析がhPRLエピトープに残存するギャップを満たすのに必要であるがこのエピトープがhGHレセプターのエピトープと重複するが同一のものではないことは明らかである。これらのデータはhGHを認識する結合決定基の全てがhGHおよびhPRLレセプターに関しその細胞外結合ドメインと32%のホモロジーを持つにもかかわらず同一のものではていことを示している。

20

30

レセプター結合アフィニティーに大きな変化を起こす残基は間接的な構造効果によってそれを行っている。しかしこれら破壊的效果のほとんどがテストした全ての単一変異体が8個のhGHモノクローナル抗体群に対し完全な結合アフィニティーを維持しており、かつしばしばレセプター選択性の変化に導くがレセプターアフィニティーに均一な影響を与えないことから局所的な効果によるものと考えられている(第XIX表および以下参照)。

【0097】

hGHのレセプター特異的変異体の設計

多くの単一hGH変異体はレセプター結合選択性に多くの変化を起こす(第XIX表)。最も顕著なのはhGHレセプターに対するアフィニティーの4倍増加を導くがhPRLレセプターの結合は20倍以上減少するE174Aである。このことはレセプター選択性の120倍の変化を示している。別の突然変異は(主にR178NおよびI179M)はhGHを選択的にhPRLレセプターに結合させる。一般的にレセプター特異性を最も変化させる変異体は2つのレセプターエピトープの非重複領域に存在する。

40

レセプター結合の自由エネルギー変化が加算的であるならわずかな突然変異をもつhGHの非常に特異的な変異体を設計することができると考えられる。事実2つの最もhGHレセプター選択的な単一変異体(K168AおよびE174A)を合せると、その二重変異体はhGHレセプターへの結合に関し2300倍の選択性を示す(第XX表)。先に指摘したようにhPL(56-64)の結合選択性はわずか20の突然変異E56DおよびR64Mを含むhPL(56-64)によりほぼ20倍増加し得る(第XIII表)。これらの

50

hGH変異体 (K168A、E174AまたはE56D、R64M) は実質的に好ましいレセプター、各々hGHまたはhPRLに対する選択性を減少していない。また同時に両レセプターの結合を減らすこともできる。

【0098】

【表22】

第 XX 表

hGHおよびhPRLレセプター (hGHrおよびhPRLr) を識別するよう設計されたhGHキ二重変異体の結合、hGH変異体の部位指定突然変異誘発により調製し、精製し、かつ第XIII表に述べた方法でhGHrまたはhPRLrへの結合を検定した。K_D測定値の標準偏差は報告されている値の±100%であった10M以上の値以外報告されている値の20%以下であった。

10

変異体	hPRLr		hGHr		レセプター選択 性的変化
	K _D (mut)		K _D (mut)		hGHr
	K _D (nM)	K _D (hGH)	K _D (nM)	K _D (hGH)	hPRLr
WT <h>hGH</h>	2.3	(1)	0.34	(1)	(1)
K168A,	1950	590	0.09	0.26	2300
E174A	3.4	1.5	3.4	0.9	1.7
R18N,					
I179M	ND	-	ND	-	-
K172A,	~40,000	~20,000	190	50	~40
F176A					

20

30

【0099】

たとえば個々にhGHおよびhPRLレセプターへの結合アフィニティーを大きく減少させるK172AおよびF176Aを合せると各々550および15000倍のアフィニティーの破壊を生む。

全ての場合において結合自由エネルギー変化 (G結合) は驚くべきほどに加算的である (第XXI表)。突然変異の加算的效果は酵素 - 基質相互作用にもみられ (P. J. カーター (Carter) 等 (1984) Cell 38、835 - 840; J.A. ウェルズ (Wells) 等、(1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84、5167 - 5171)、プロテアーゼ - プロテアーゼインヒビター相互作用 (M. ラスコウスキー (Laskowski) 等、"プロテアーゼインヒビター: 医学および生化学的特徴" (1983)、N. カツヌマ (Katunuma) 編、ジャパンサイエンスサイアティー版、東京、55 ~ 68) およびたん白質の安定性 (D. ショートル (Shortlo) 等、(1986) Protein, 1、81 - 89 (1986): M. M. メクト (Mecht)、J. M. スターテバント (Sturtevant) および R. T. ソーアー (Sawer) Protein 1、43 - 46) にもみられ、またこれらの参考文献で公表されているように変異残基が独立に機能しかつ互いに接しているときは一般に身うけられる。このことは多くのhGH変異体中で対を作っている残基は独立に機能していることを示している。このよ

40

50

うな加算性は望ましいレセプター結合アフィニティーおよび特異性をもつ h G H 変異体を作る上で非常に予想可能な状況を作り出している。

【 0 1 0 0 】

【表 2 3】

第 XXI 表

h G H または h P R L レセプター (h G H r または h P R L r) への結合に関する h G H 中の変異の加算効果。野生型 h G H に対する変異体の結合自由エネルギー変化 (G 結合) は

$$G \text{ 結合} = R T \ln [C K_D (\text{変異体}) / K_D (\text{h G H})]$$

に従い結合アフィニティーの減少から計算した。単一または多重変異ホルモンの $K_D (\text{変異体}) / K_D (\text{h G H})$ 値は第 XIII 表 - 第 XX 表から得た。 10

		結合自由エネルギー変化		
		$\Delta\Delta G_{\text{binding}}$ (Kcal/mol)		
変	異	hGH	hPRLr	
K168A		+0.04	+1.9	
E174A		-0.90	+1.9	
K168A, E174A	(expected)	-0.86	+3.8	
	(actual)	-0.80	+3.8	10
K172A		+2.5	+1.6	
F176A		+2.4	+1.6	
K172A, F176A	(expected)	+4.9	+3.2	
	(actual)	+5.7	+3.8	
Q22N		-0.06	ND	20
F25S		+1.81	ND	
D26E		+0.89	ND	
Q29S		+0.20	ND	
E30Q		ND	ND	
E33K		-0.13	ND	
hPRL 22-33	(expected)	+2.7	-	
	(actual)	+2.6	-	30
E56A		ND	+0.8	
R64M		ND	+1.8	
E56A, R64M	(expected)	-	+2.6	
hPL (56-64)	(actual)	-	+2.0	

40

【 0 1 0 1 】

hGHと同様にアドレナリンレセプター (R. J. レフコウィッツ (Lefkowitz) および M. G. キャロン (Caron) (1988) J. Biol. Chem. 263, 4993 - 4996)、ICF-1レセプター (M. A. カサイエリ (Cascieri) 等、(1989) J. Biol. Chem. 264, 2199 - 2202)、IL-2レセプター (R. J. ロブ (Robb) 等 (1984) J. Exp. Med. 160, 1126 - 1146; R. J. ロブ (Robb) 等 (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5654 - 5658) および ANPレセプター (D. ロー (Lowe) および D. ゴーデル (Goeddel)、非公開) など2つ以上のレセプターまたは

50

レセプターサブタイプが存在する多くの例がある。これらの場合、特定のレセプター機能を特定の薬学的効果と結びつけるのは難しい。しかしレセプター特異的ホルモン類似体の使用でこの仕事を非常に簡便化できる。たとえばカテコールアミン類似体は - アドレナリンレセプターサブタイプの特性を明らかにし、かつレセプター機能を生理的応答に結びつけるのに使われる (R. J. レフコウィッツ (Lefkowitz) 等、(1983) Annu. Rev. Biochem. 52、159 - 186) 同様に、hGHのレセプター特異的変異体はhGHの他のレセプターの同定やhGHの複合体薬理学におけるhGHおよびhPRLレセプターの働きを探る上での重要な道具を提供する。この研究はレセプター特異的変異体の合理的設計を可能にするホルモンにおけるレセプター結合部位を同定するための系統的方法を示している。

10

【 0102 】

実施例 13

ヒト成長ホルモンに結合するヒトプロラクチンの作製

プロラクチン (PRL) は成長ホルモン (GH)、胎盤ラクトゲン (PL) およびプロリフェリンを含む相同ホルモン群の 1 員である。ニコル (Nicoll)、C. S. 等 (1986) Endocrinol. Rev. 7、169 - 203。集合的にこのグループのホルモンは成長、分化、電解質バランスなどに関する幅広い生理効果を調節する。チョウラ (Chawla)、R. K. 等 (1983) Ann. Rev. Med. 34、519 - 547 ; イサクソン (Isaksson) O. G. P. 等 (1985) Ann. Rev. Physiol. 47、483 - 499。これらの薬理学的効果は特定の細胞レセプターへの結合で始まる。たとえばhPRLはラクトジェニックレセプターには結合するがソマトジェニックレセプターには結合せず、また泌乳に活性化するが骨成長は活性化しない。hGHはラクトジェニックレセプターおよびソマトジェニックレセプターの両方と結合し、かつ泌乳および骨成長の両方を活性化する。レセプター結合特異性の差の分子的基础はまだ理解されていない。

20

hPRLのクローニングと発現

hPRLのcDNAをgt10中のヒトの脳下垂体cDNAライブラリーから (ハイ (Huynh)、T. V. 等 (1985) “ DNAクローニング技術 - 方法 ” 1巻、D. M. グローバー (Glover) 編 (オックスフォードIRLプレス)、49 - 78) 公表されたDNA配列の5' および3' 末端に対応するオリゴヌクレオチドを用いた (コーク (cooke)、N. E. 等 (1981) J. Biol. Chem. 256、4007 - 4016) ハイブリダイゼーションにより (マニアチス (Maniatis)、T. 等編 (1982) “ モレキュラークローニング、ラボラトリーマニュアル (コールドスプリングハーバーラボラトリー、コールドスプリングハーバー、NY)) クローニングした。ほぼ全長のcDNAクローンが同定され、またコドン22から停止コドンの下流55bpまでの720bp Bst II - Hind III フラグメントをpJC118にサブクローン化した。この配列をダイデオキシ法 (サンガー (Sanger)、F. 等 (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74、5463 - 5467) により決定したところ以前に報告されていたものと全く一致した (コーク (Cook)、K. E. 等 (1981) J. Biol. Chem. 256、4007 - 4016)。

30

【 0103 】

標準法により細胞内発現ベクターpBO760 (図26) を作った (マニアチス (Maniatis)、T. 等編 (1982) モレキュラークローニングラボラトリーマニュアル (コールドスプリングハーバーラボラトリー、コールドスプリングハーバー、NY))。hPRL遺伝子の転写にpHGH207 - 1由来の大腸菌 trpプロモーターを用いた (デボア (deBoer)、H. A. 等 (1982) “ プロモーターの構造と機能 ” ロドリゲス (Rodriguez)、R. L. およびチャンベリ (Chamberlin)、M. J. 編 (プラガー版、ニューヨーク)、462 - 481)。hPRLコード配列は47bp Xba I - Bst E II 合成DNAカセットおよびhPRL cDNA由来の720bp Bst E II - Hind III フラグメントを含んでいる。合成DNAカセットは

40

5' -CT-AGA-ATT-ATG-TTA-CCA-ATT-TGT-CCA-GGT-GGT-GCA-GCA-AGG-TGT-CAA

3' -T-TAA-TAC-AAT-GGT-TAA-ACA-GGT-CCA-CCA-CGT-CGT-TCC-ACA-GTT-CAC-TG

という配列であり、開始コдонはアスタリスクで示してある。ファージ f 1 オリジン、pBR複製オリジンおよび pBR322 - ラクタマーゼ遺伝子は pBO475 に由来する (カニンガム (Cunningham), B. C.等 (1989) Science 243、1330 - 1335)。

pBO760 を含む大腸菌 (MM294) を 15 μ g/ml カルベニシリン添加 M9 ハイケース培地 100 ml を含む 0.5 L 振とうフラスコ中 37 °C で 4 時間増殖させた (初期対数期; $A_{550} = 0.1 \sim 0.3$) (ミラー (Miller), J. H. (1972) “分子遺伝学実験” (コールドスプリングハーバーラボラトリー、コールドスプリングハーバー、NY)。インドルアクリル酸を添加し (最終 50 μ g/ml) *tep* プロモーターを誘導した。細胞をさらに 6 ~ 8 h 増殖した後遠心で収穫した。細胞分画実験は hPRL はほとんど排他的に包含粒子中に存在し、SDS-PAGE で分析してみると全細胞たん白質中の 2 ~ 5 % にあたることを示した (データ示さず)。

【0104】

hPRL の精製および再生。hPRL を含む包含粒子を基本的に報告されている方法で単離した (ウインクラー (Winkler), M. E. 等 (1986) Biochemistry 25、4041 - 4045)。簡単に云うと、湿細胞ペレット 50 g を 0.25 リットルの 10 mM トリス (pH 8.0)、1 mM EDTA (TE バッファ) に懸濁し、激しい超音波処理で細胞を分解した。不溶性の物質で遠心 (10,000 \times g 15 分間) で集め 2.5 ml の TE バッファに懸濁した。このサスペンションを 50 % グリセリン 0.2 リットルのクッション上に重層し、9000 \times g 2.5 分間の遠心により hPRL 包含粒子をペレット化した。この包含粒子由来の hPRL (純度約 20 %) を 5 ml の TE バッファに懸濁した。

TE バッファ中 0.3 g の還元グルタチオン (シグマ) を含む 8 N G_n HCl 溶液 156 ml に包含粒子を溶かすことにより pPRL を再生した。室温で 30 分間緩やかに攪拌した後この混合物を 0 °C に冷やし、0.6 g の酸化グルタチオンを含む冷 TE バッファ 844 ml で希釈した。この溶液を 4 °C で一晩ゆっくりと攪拌した後、24 時間に 3 回外液を変える 4 リットルの TE バッファを用いた透析を行った。不溶性物質を遠心で除去した (10,000 \times g 20 分間)。

さらに再生し可溶化した hPRL を 45 % 飽和の (NH₄)₂SO₄ の添加および室温 2.5 時間の攪拌による沈殿化で精製した。この沈殿を遠心 (12,000 \times g 30 分間) で集め 5 ml の TE バッファに溶解した。室温 30 分後この溶液を清澄化した後 (10,000 \times g 10 分間)、ミリポアフィルターで濾過した (0.45 μ m)。この溶液を 4 °C で一晩 0.5 リットルの TE バッファに対して透析した。最後にこの hPRL (純度 85 %) を基本的に hGH の精製について述べた方法と同じ DEAE 高速マトリックスを用いた FPLC により均一となるまで (> 95 %) 精製した (カニンガム (Cunningham), B. C. 等 (1989) Science、243、1330 - 1335)。

【0105】

hGH および hPRL 変異体の突然変異誘発および結合性部位指定突然変異誘発 (ゾラー (Zoller), M. J. 等 (1982) Nucleic Acids Res., 10、6487 - 6500) は大腸菌のメチル化修復欠損株 MutL を用いて行った (クレマー (Kramer), B. 等 (1984) Cell 38、879 - 887)。変異体クローンの濃縮化は、インピボ生成ヘテロ二本鎖のトランスホメーション後に得られた最初のプラスミド DNA プールに制限精製または制限選択を応用し得るように各々単独制限部位を導入または除外する変異原オリゴヌクレオチドを設計することにより行った (ウェルス (Wells), J. A. 等 (1986) Phil. Trans. R. Soc. Lond. A 317、415 - 423)。全てのオリゴヌクレオチドはもっとも上流のミスマッチの 5 側に正確にマッチする 12 bp およびもっとも下流のミ

スマッチの3側に正確にマッチする10bpを有するよう設計する。hGHの突然変異誘発の場合、先に述べたhGH合成遺伝子は多くの制限部位を含んでおり、これをプラスミドpBO475にクローン化した。hGHの変異体は大腸菌の細胞周辺腔に分泌され(チャン(Chang), C. N. 等(1987) Gene 55、189-196)先に述べたように精製した。

各類似体のKd値は本明細書およびスペンサー(Spencer), S. A. 等(1988)、J. Biol. Chem. 263、7862-7867に述べられている精製組換えhGH結合たん白質に結合した(^{125}I)hGHの競合的置換により測定した。先に述べたhGH結合たん白質(クローン化ヒト肝臓レセプターの残基1~238を含む)をフー(Fuh)、G.等(1989)、提出)により述べられている方法により大腸菌から分泌させ精製した。置換曲線を3回作成し、またKd値の標準偏差は一般に報告値の20%以下であり、Kd値が10 μM 以上となる場合を除いて報告値の50%を越えることはなかった。

hPRLおよびhPRL変異体の濃度は吸光係数+S(0.1%、280)=0.9(ウェトローファー(Wetlaufer)、D. B. (1962) Adv. in Prot. Chem. 17、303-390)を用いたA₂₃₀で測定した。これは変異体が芳香族残基における突然変異を含む場合はそれに応じて調整した。吸光度により測定した濃度値はSDS-PAGEとhGHのコマーシブルによる染色を用いたレーザーデンシトメトリーによって測定した値と10%以内の誤差で一致していた。円二色スペクトルはアビブキャリ-60スペクトロポーリメーターを用いて測定した。

hPRL中の残基がhGHレセプターへの結合にもっとも破壊的であるかを探るため(図27)、まず多くのhPRL残基をhGH中に導入した(第XXII表)。

【0106】

【表24】

第 XXII 表
hGHに導入したhPRLおよびアラニン置換の比較

hGH変異体	Kd(nM)	$\frac{\text{Kd(mut)}}{\text{Kd(hGH)}}$
WT	0.34	(1)
158L	0.58	1.7
158A	5.6	16
R64K	0.20	0.6
R64A	7.1	21
F176Y	2.9	8.6
F176A	5.4	16
R178K	1.7	5.1
R178N	2.9	8.5

10

20

30

40

【 0 1 0 7 】

hGH中部位58、64、176および178の単一アラニン置換はレセプター結合を著しく破壊するが、これらの部位におけるhPRL残基の置換はほとんど影響しなかった。hPRL置換の最も大きい効果は部位176および178を含むヘリックス4残基中に存在した。これらのデータはhPRLのヘリックス4領域における残基がhGHレセプターへの結合の欠除を最もよく説明し得ることを示している。

組換えhPRLは天然様の構造および機能性を維持していた。まず近および遠紫外線CDスペクトル(図28)は天然のhPRLのスペクトルと同じであった(ビューリー(Bewiley)、T. A. (1979) "ホルモン研究の最近の進歩" 35巻、155~213頁、アカデミープレス、N. Y.)、遠紫外線スペクトルはhGHと同じであり、このことは208nmおよび224nmにおける平均残基だ円率の重要な差がいられているが同様の4-ヘリックス束構造の存在を示している。これらのホルモンの芳香族残基の数や微環境の差を反映する近紫外CDは著しく異なる。別の研究で組換えhPRLはhPRL ELISAにおいて十分な免疫学的交叉反応性を維持しており(データ示さず)、またラットのリンパ種Nb2細胞を繁殖させることにおいてhGHと等価であった(タナカ(Tanaka), T. 等(1980) J. Clin. Endo. Metab. 51、1058-1063)。還元すると精製hPRLはSDS-PAGEにおける移動度の著しい減少を起こし(hGHでもみられる)、このことはジスルフィド結合の形成を示している(ポリット(Poliitt), S.等(1983) J. Bacteriol. 153、27-32)。アミノ末端配列分析は細胞内発現hPRLはアミノ酸末端メチオニンを維持していることを示した。しかし、メチオニルhGHと同様このことは見かけ上その構造や機能に影響しない。

hGH結合たん白質へのhPRLの結合はhGHと比較して10⁵倍以上も減少し(第XXIII表)、これは結合アッセイの検出限界以下である。

【 0 1 0 8 】

【表25】

第 XXIII 表
hGH結合たん白質¹への結合を可能にする
hPRL中の作製残基

hPRL変異体	Kd(nM) ²	$\frac{Kd(mut)}{Kd(hGH)}$

10

20

30

40

hPRL WT	>40,000	>100,000	
A = H171DN175TY176F	4,900	14,000	
B = A + K178R	220	660	
B + hGH(184-188)	260	740	
hGH(54-74)	~25,000	~66,000	
B + hGH(54-74)	2,000	5,800	
B + H54FS56E:L58I: E62S:D63N:Q66E	36	110	10
B + H54F:S56E:L58I:	670	2,000	
C = B + E174A	68	200	
D = C + E62S:D63N:Q66E	2.1	6.2	
D + H54F	4.4	13	
D + S56E	2.5	7.4	20
D + L58I	3.6	11	
D + H59P	2.5	7.4	
D + N71S	3.6	11	
D + L179I	2.1	6.2	

【0109】

30

1. 先に述べたようにhPRL変異体を生成、精製および分析した。多くの変異体はコロンで区切られた一連の単一変異体で示される(第XXII表)。コドン番号はhGH配列に基づいている(図2)。

2. 平均標準誤差は、それが50%ほどになるKd値が1μMを越える場合を除いて報告値の20%以下であった。この誤差はKd値が10μMを越えるとさらに大きくなる。

hGH由来のヘリックス4中の3つの残基を組合せて(H171D、N175TおよびY176F)、hPRLに導入した。アラニンスキャンニング突然変異誘発およびhPRL置換(第XXII表)はこれらの残基がhGHのhGHレセプターへの結合に非常に重要であったことを示している。hPRLのこの三重変異体はhGHよりは14000倍も弱いghGH結合たん白質に検出可能な結合を起こした。さらにテトラ変異体を作るため他の重要なヘリックス4残基(K178R)を導入すると、これは野生型よりわずかに660倍低いだけのレベルの結合に強められた(第XIII表の変異体B)。hPRL変異体BへのhGH残基184~188の導入はhGH結合たん白質への結合を強化しなかった。しかしhPRL変異体Cを与えるE174Aの導入(第XXIII表)はE174AがhGHに組込まれたときと同じようにhGH結合たん白質への結合アフィニティーをさらに3.5倍増加した。

40

【0110】

ヘリックス4領域への結合力をもつことから残基54~74を含むループ領域を分析した。hPRL中のループ領域をhGH由来の配列(第XIII表のhGH(54-74))で完全に置換することはhGH結合たん白質へのかろうじて検出可能な結合を与える。この

50

変異体を変異体Bと合せたとき結合アフィニティーが実質的に増加する。しかし、この新しい変異体 (B + h G H (5 4 - 7 4)) の結合アフィニティーは変異体B単独のときよりもほとんど10倍減少する。したがって54-74ループ中のいくつかのhGH残基はヘリックス4中のhGH置換と適合しなかった。我々はhGHの54-74ループからアラニンスキャンニング突然変異誘発によりもっとも結合に影響することが示された7個の残基を選択した。hGHのR64A突然変異は結合アフィニティー420倍以上減少させるが、hGHのR64K変異体 (h P R L 置換) はhGH結合たん白質への結合がわずかに多い (第XXII表) 。それゆえhPRL中のLys64は変化しないままであった。結果としてhGHにおいてアラニンへの変化が最も破壊的であった7個の置換のうちの6個をhPRLへ組込んだ。この新しい変異体 (B + H 6 5 F : S 5 6 E : L 5 8 I : E 5 6 S : D 6 8 N : Q 6 6 E) はB + h G H (5 4 - 7 4) よりも50倍も強く結合するが野生型hGHの結合アフィニティーよりもわずかに110倍小さいだけである。しかし、これは変異体B単独よりもわずかな改善を示したのみで (6倍) 、先にhGHのループ領域において観察された強い相互作用に期待されるほどではなかった。それゆえ、ループ内の6個の突然変異をさらに分断し、H54F : S56E : L58I + 変異体Bの組合せが変異体よりも3倍も結合が弱いことが明らかになった。最後に変異体Cへの突然変異E62S : D63N : Q66Eの組込みは (変異体D) はhGHに比べ結合アフィニティーがわずかに6倍低いだけの最も高いアフィニティーをもつ類似体を生ずる。別の単一突然変異 (H 5 4 F 、 S 5 6 E 、 L 5 8 I 、 A 5 9 P 、 N 7 1 S および L 1 7 9 I) はhGH結合たん白質へのhPRL変異体Dの結合アフィニティーを高めることはなかった。変異体Dの構造は事実上CDスペクトル分析 (図28) またはELISA活性 (データ示さず) によって天然のhPRLと区別できなかった。

【 0 1 1 1 】

これらの研究は部位指定突然変異誘発実験由来の機能情報のみを用いた遠い関係の類似体の結合性を回復させ得る可能性を示した。hGHのアラニンスキャンニング突然変異誘発はhGHのレセプターへの結合を調節するのに重要な側鎖の系統的分析を提供した (図27) 。この情報はhGHレセプター結合し得ないことを説明するhPRL中の多くの残基を浮き立たせた (図29) 。しかしさらに分析することでhGH中のアラニン置換がhGH中のhPRL置換よりもより破壊的であることが示された (第XXII表) 。さらにいくつかのhPRL置換は、特にhPRL中により大きい側鎖が存在するとき結合アフィニティーに関し他のものよりかなり破壊的であった。たとえばhGH中の保存的 (しかしより大きい) F176Y置換はhGHレセプターに関する結合アフィニティーに8倍の減少を引き起こすが、一方より小さいR64K置換は結合アフィニティーのわずかな増加を示した。このようにhGH中の破壊的hPRL置換の分析は最初にhPRLへの結合アフィニティーを遂行するヘリックス4中の残基クラスターの導入を示している。このことは野生型hPRLによるhGHレセプターへの結合が観察されないことから非常に重要であり、使用した検定の範囲内の結合アフィニティーをもたらしため ($K_d = 50 \mu M$) hPRL中に同時にいくつかのhGH置換を導入することが必要である。

ヘリックス4に機能的に重要な残基を導入することによりhPRLに容易に検出可能な結合アフィニティーを導入された。しかし、54-74間のループ領域を作り出すことはより困難であることが分った。hGHの全ループをhPRLに組込むことによる結合の増加は期待されたよりも小さく、至適化されたヘリックス4変異体Bと合せたときは結合に対して破壊的であった。我々のデータはhPRLの54-74ループ構造はこのたん白質中の他の相互作用により支持されることを示している。この問題は段階的に解決された。まず、hGH中のhPRL置換を伴アラニン置換で重要であると同定されたhGH由来の6個のループ残基をhPRLに導入した。これはその状況を改善したにもかかわらずいくつかのhGH突然変異 (H 4 3 F 、 S 5 6 E および L 5 8 I にしぼった) の組合せはhPRLに対して破壊的であった。これらのデータはループ中のいくつかの残基がその構造に重要でありそのまま残した方がより安定であることを示している。

【 0 1 1 2 】

10

20

30

40

50

突然変異誘発の多くの反復サイクルがh P R Lのh G Hレセプターへの堅い結合を可能にする残基の組合せを一本化するのに必要であった。この戦術は変異効果が実際に観察されるように加算的であるという仮定に依存している。たとえばE 1 7 4 A突然変異がh P R L変異体Cまたはh G Hに加えられたとき結合を3 ~ 5倍増加した。さらに変異体Dに対するH 5 4 F、S 5 6 E、およびL 5 8 I単一変異体の破壊的效果は(4.4倍)変異体Bに付加された3つの全ての突然変異の組合せによって引き起こされる破壊とほぼ同じであった(3倍)。

変異体Dの結合アフィニティーはわずか6倍減少するだけであるにもかかわらず変異体Dに組込んでさらに結合を改善する試みを行いうるV 1 4 NおよびH 1 8 5 Vなどいくつかの他の残基がある。すなわちh G H中のアラニン置換がh G Hの結合を2 ~ 3倍の減少を起す部位がある(図29)。高分解能の構造が設計過程の助けとなるが、それは明らかに基本的なものではない。突然変異効果の累積性は天然の変化および淘汰サイクルによるたん白質進化と同じ様式で結合性を収れんさせうる。

従来のはたん白質工学実験は高分解能構造分析を用いて基質接触残基による天然の変異体酵素の基質特異性の実際の変換が可能であることを示した(ウェルズ(Wells) J. A.等(1987) Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 84, 5167 - 5171; ウィルクス(Wilks), H. M.等(1988) Science 242, 1541 - 1544)。同様に他のものは結合性は抗原結合ループ(ジョーンズ(Jones), P. T.等(1986) Nature 321, 522 - 525)またはDNAレセプターヘリックス(ワートン(Wharton), R. P.等(1985) Nature 316, 601 - 605)を含む二次構造ユニットの全ユニットの置換により産み出し得ることを示した。しかし、h P R Lにh G Hレセプター結合性を与えるにはh P R Lの構造枠組内の選択的残基置換を必要とする。さらにCDスペクトルデータはh P R L変異体Dの全構造はそれぞれがh G Hと同様の結合性は維持しているにもかかわらず、h P R Lの構造には非常によく似ているがh G Hには似ていない。

【0113】

h G Hレセプターへの結合特異性がh P R Lに組込まれ得るという事実はソマトジェニクレセプター結合に対する特性の残基の機能的な重要性を確認している。またこれらの研究はh G Hとh P R Lがわずか23%の一致しかもたないにもかかわらず両者の構造的関係に対する動かぬ証拠を提供する。これは成長ホルモン、プロラクチン、プロリフェリンまたは胎盤ラクトゲン構造を始めとするこのホルモン群内に含まれる新しいレセプター結合機能に近づく合理的な方法を提供する。このようなハイブリッドはレセプターサブタイプの薬理学的な重要性とともにレセプター結合および活性化を区別する上で有用である。これらの類似体はアゴニストまたはアンタゴニストとしてより有用な性質をもつ新しいレセプター特異的ホルモンの設計に導く。

【0114】

実施例14

ヒト胎盤ラクトゲンへのヒト成長ホルモンの結合性の付与

ヒト胎盤ラクトゲン(h P L)のh G Hレセプターに対する結合アフィニティーはh G Hに比べ30倍小さい(G.バウマン(Baumann)等(1986) J. Clin. Endocrinol. Metab. 62, 134; A. G.ヘリントン(Herington), 等(1986) J. Clin. Invest. 77, 1817)。以前の変異実験はh G Hレセプターに対するh G Hの結部位は基本的にアミノ末端(残基4 - 14)付近のいくつかのマイナーな決定基とともに2つの領域(残基54 - 74および171 - 185を含む)内に存在する。h P Lの全配列はh G Hと85%が同じである。h G H上のレセプター結合エピトープを広く構成している3つの領域内でh P Lはわずか7箇所で異なり以下の置換を含む: P 2 Q、1 4 V、N 1 2 H、R 1 6 Q、E 5 6 D、R 6 4 M、および1 1 7 9 M。(この命名法では野生型h G Hの残基を1文字コードで示し、つづいて成熟h G Hの部位番号およびh P L中の残基を示した)。これら7個の各部位においてh G Hの単一アラニン置換を作った。これらのうち、4つのアラニン置換、1 4 A、E 5 6 A、R 6 4 A、およびI 1 7 9 Aは結合アフィニティーの2倍以上の減少を引き起こすことが分った。一般にアラニン置換は結合に関しヒトプロラ

10

20

30

40

50

クチン由来の相対的置換よりも大きい効果を有している。それゆえ、hGHに導入されたhPL由来の置換のいくつかの効果を研究した。I179A置換はアフィニティーの2.7倍の減少を起こした一方、I179Mはわずか1.7倍の効果しか示さなかった。しかし、R64AおよびR64M置換は結合アフィニティーの同一およびより大きい減少(約20倍を引き起こした)。さらに、hGHの二重変異体(E56D:R64M)のアフィニティーはさらに計30倍の減少を示した(第1表)。このようにE56DおよびR64Mは基本的にhGHとhPLのレセプター結合アフィニティーの差を決定する。それゆえhPLの二重変異体D56E、M64Rは実質的にhGHレセプターへの結合アフィニティーが増加している。M179IおよびV41のような付加的修正もhPLのhGHレセプターへの結合を高める。

10

【0115】

実施例15

ヒト成長ホルモンへの結合に関する部位174でのアミノ酸置換の効果

先に示されているように、Glu174のAlaによる置換(E174A)はヒト成長ホルモンのそのレセプターへのアフィニティーを4倍以上増加させる。部位174における至適置換残基を決めるため他の12個の残基で置換したhGH変異体を作りhGH結合たん白質とのアフィニティーを測定した(第XXIV表)。荷電ではなく側鎖の大きさが結合アフィニティーを決定する主要要素である。アラニンが至適置換を起こし、Ser、Gly、Gln、Asn、Glu、His、Lys、Leu、そしてTyrの順でつづいている。

【0116】

20

【表26】

第 XXIV 表

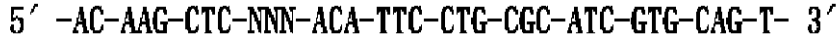
変異体	荷電	大きさ (Å ³) ^b	Kd(nM) ^c	Kd(mut)	
				Kd(野生型)	
E174G	0	0	0.15	0.43	
E174A	0	26	0.075	0.22	
E174S	0	33	0.11	0.30	
E174D	-	59	NE	-	
E174N	0	69	0.26	0.70	
E174V	0	76	0.28	0.80	
野生型	-	89	0.37	1.0	
E174Q	0	95	0.21	0.60	
E174H	0	101	0.43	1.2	
E174L	0	102	2.36	6.4	
E174K	+	105	1.14	3.1	
E174R	+	136	NE	-	
E174Y	0	137	2.9	8.6	

30

40

【0117】

a. 突然変異は p B O 4 7 5 にクローン化した部位 1 7 8 に K p n I 部位を含む h G H 遺伝子の変異体に部位指定突然変異誘発を行うことにより生成させた (カーター (Carter), P. 等 (1986) Nucleic Acids Res. 13, 4431 - 4443)。突然変異誘発に用いたオリゴヌクレオチドは、



10

で表わされる配列を有している。ここで N N N は部位 1 7 4 の新しいコドンを表わし、またアスタリスクはコドン 1 7 8 で始まる K p n I 部位を除外するミスマッチを示している。変異コドンは次に示すものである : Gln, C A C ; A s n, A A C ; S e r, A G C ; L y s, A A A ; A r g, A G G ; H i s, C A C ; G l y, G G G ; V a l, G T G ; L e u, C T G。ヘテロ日本鎖合成につづいて野生型配列のバックグランドを減少させるためお K p n I による制限処理でプラスミドプールの突然変異を濃縮した。全ての変異体配列はダイオキシ配列分析で確認した (サンガー (Sanger), F. 等 (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 74, 5463 - 5467)。

b. 側鎖バックグランド値は C. コチア (Chotia) ((1984) Annu. Rev. Biochem. 53, 537) のデータによる。

20

c. 解離定数は先に述べたような h G H 結合たん白質による (¹²⁵I) h G H の競合適置換により測定した。N F は変異ホルモンが単離および検定するには低すぎるレベルで発現することを示している。

実施例 16

第 XXV 表に示した h G H 変異体を構築した。野生型 h G H に対するこれらの相対的能力を示す。

【0118】

【表 27】

第 XXV 表

ラット体重検定における相対適能力

30

h G H 変異体

h G H 変異体	ラット体重検定における相対適能力
F97A	0.87
S100A	2.12
L101A	3.03
V102A	1.39
Y103A	1.73
T175S	1.21

40

本発明の好ましい態様を述べてきたがこれら公開した態様を種々に変化させうること、およびこのような修正は本発明の範囲内にあることは当業者にとって明白である。

【図面の簡単な説明】

【図 1】 活性ドメインの同定に使用する戦術を示している。

50

【図2】hGH、hPL、pGHおよびhPRLのアミノ酸配列中の保存性および可変性アミノ酸残基を示している。

【図3】hGHの推定される低分解能構造および各ヘリックスに対しN末端開始残基から見たラセン投影図を示している。疎水性、中性および荷電残基は各々○、およびで示されている。

【図4】可溶性hGHレセプターに対する種々のセグメント置換hGH変異体の結合に関する相対的減少を示す棒グラフである。

【図5】ソマトジェニックhGHレセプターと相互作用する活性ドメインA、CおよびFにおける類似アミノ酸を示す。

【図6】ソマトジェニックレセプターの相対的結合位置およびhGHに対する8個のモノクローナル抗体を示す。 10

【図7】種々のアラニン置換hGH変異体の可溶性hGHソマトジェニックレセプターに対する結合の相対的増減を示す棒グラフである。T175の斜線棒はアラニンではなくセリンが置換していることを示している。R178の縞棒はアラニンではなくアスパラギンが置換されていることを示している。

【図8】実施例で用いているhGH遺伝子のDNAおよびアミノ酸配列を示している。

【図9】合成hGH遺伝子を含むベクターpB0475の構築を示している。

【図10】hGHのアミノ酸配列を示すpB0475のDNA配列である。

【図11】ベクターpJ1446の構築を示している。

【図12】肝臓由来のソマトジェニックレセプターの可溶性部分のアミノ酸配列を示すpJ1446のDNA配列である。 20

【図13】8個の異なるモノクローナル抗体各々に対するhGH上のエピトープ結合部位を示している。

【図14】8個の異なるモノクローナル抗体各々に対するhGH上のエピトープ結合部位を示している。

【図15】8個の異なるモノクローナル抗体各々に対するhGH上のエピトープ結合部位を示している。

【図16】8個の異なるモノクローナル抗体各々に対するhGH上のエピトープ結合部位を示している。

【図17】8個の異なるモノクローナル抗体各々に対するhGH上のエピトープ結合部位を示している。 30

【図18】8個の異なるモノクローナル抗体各々に対するhGH上のエピトープ結合部位を示している。

【図19】8個の異なるモノクローナル抗体各々に対するhGH上のエピトープ結合部位を示している。

【図20】8個の異なるモノクローナル抗体各々に対するhGH上のエピトープ結合部位を示している。

【図21】hGH中のソマトジェニックレセプターに対する結合に関与する活性アミノ酸およびヘリックス1および4に関するラセン投影図を示している。

【図22】hGHおよびhGH変異体を50マイクログラム/kg/日で投与したラットの経時的体重増加を示している。 40

【図23】野生型hGHと比較したhGH変異体の活性に対するKd比のセミログプロットである。

【図24】ヒト血清(○)またはプラスミドp hGH r (1-238)を発現する大腸菌KS330培養物から単離したhGH結合たん白質に対する(¹²⁵I)hGHおよび未標識hGHの競合結合曲線である。棒は平均値からの標準偏差を示す。挿入図は競合結合曲線から導びいたスキャッチャードプロットを示している。ヒト血清および大腸菌由来の結合たん白質の濃度は各々0.1 nMおよび0.08 nMであった。

【図25】2.8分解能のX線構造から決定したpGHの構造に基づくhGHの構造モデルである。パネルAはhGHレセプターエピトープの機能性等高線地図を示しパネルB 50

はh P Lレセプターエピトープについて測定された同地図を示している。黒丸の大きさは各残基のアラニン置換に関する破壊効果の大きさを示している。小さな丸は2倍以上の破壊を示し、大きい丸は10倍以上の破壊を示す。h G Hレセプターエピトープにおけるは(パネルA)結合親和性が4倍以上増加させるE 1 7 4 A K位置を示している。

【図26】大腸菌におけるh P R Lの細胞内発現に使用したプラスミドp B O 7 6 0を示している。

【図27】h G H結合たん白質に対する結合に強く影響するh G H中の残基の位置を示している。結合親和性の10倍以上の減少(○)、4~10倍の減少()または4倍以上の増加()を引き起こすアラニン置換(T 1 7 5またはR 1 7 8の場合は各々セリンまたはアスパラギン)が示されている。 -ヘリックス領域のラセン投影図はそれらの両親媒性およびヘリックス4において最も重要な決定因子は親水性面(影部分)に存在するという事実を明らかにしている。

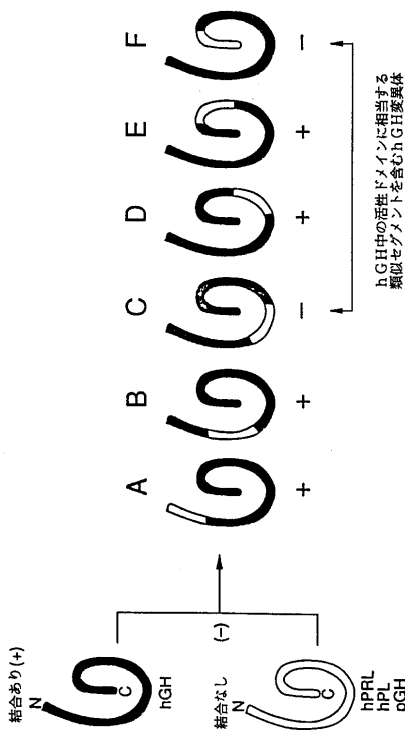
10

【図28】h G H(-)、野生型h P R L(- -)およびh P R L変異体D(- - - -)の遠紫外(パネルA)または近紫外(パネルB)における円二色スペクトルを示している。

【図29】同類およびアラニンスキャンニング突然変異誘発により限定された結合に重要な領域に関するh G Hとh P R Lの配列比較を示している。同一残基は影を付け、またその番号はh G H配列に基づいている。変異したとき結合親和性が4倍以上変化する残基には丸を付けた。残基の上のアスタリスクは変異が結合親和性を2~4倍減少させる部位を示している。

20

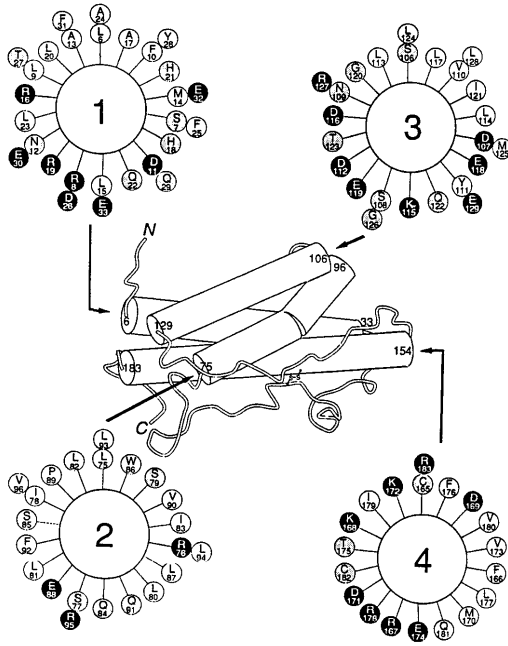
【図1】



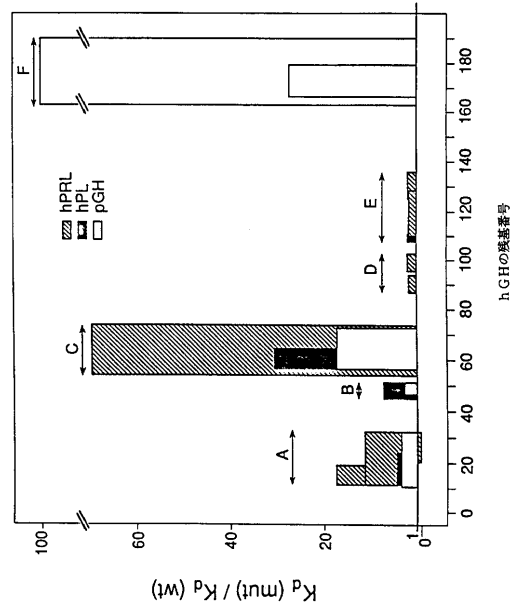
【図2】

hGH	1	10	20	30	40
hPRL	1	10	20	30	40
hPRL	1	10	20	30	40
hPRL	1	10	20	30	40
hGH	50	60	70	80	90
hPRL	50	60	70	80	90
hPRL	50	60	70	80	90
hPRL	50	60	70	80	90
hGH	100	110	120	130	140
hPRL	100	110	120	130	140
hPRL	100	110	120	130	140
hPRL	100	110	120	130	140
hGH	150	160	170	180	190
hPRL	150	160	170	180	190
hPRL	150	160	170	180	190
hPRL	150	160	170	180	190

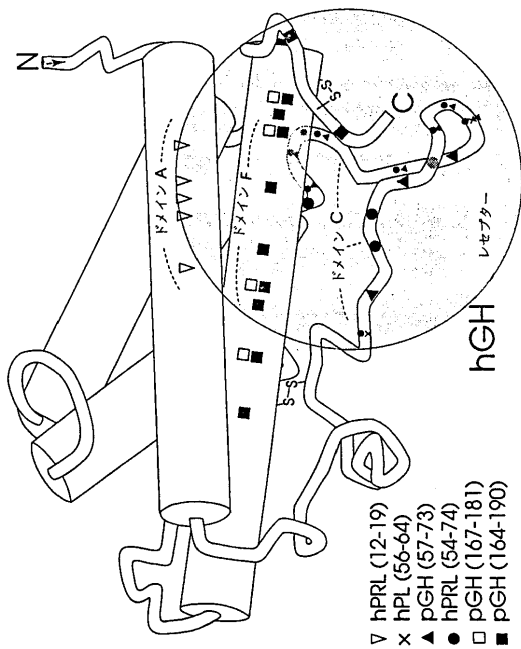
【 図 3 】



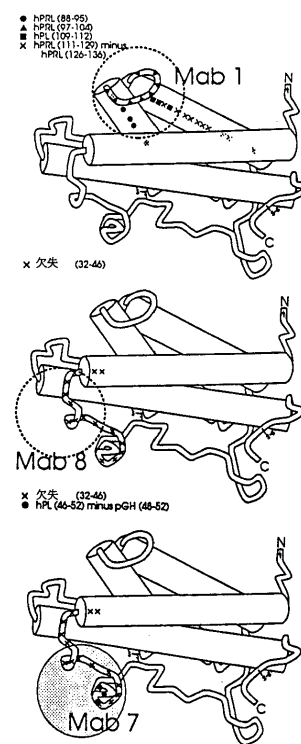
【 図 4 】



【 図 5 】



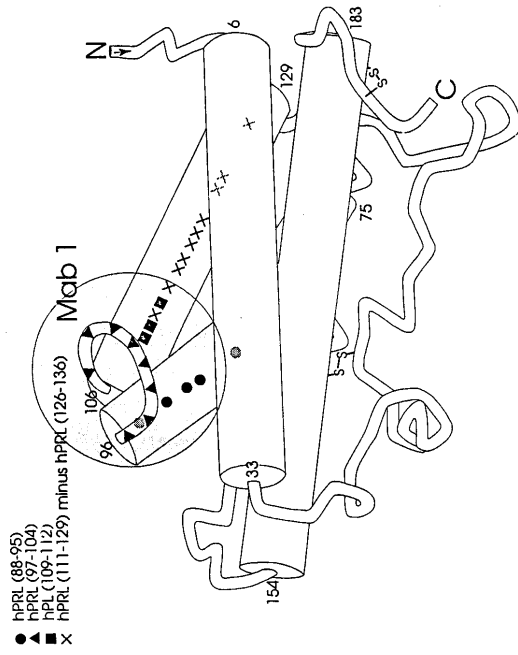
【 図 6 A 】



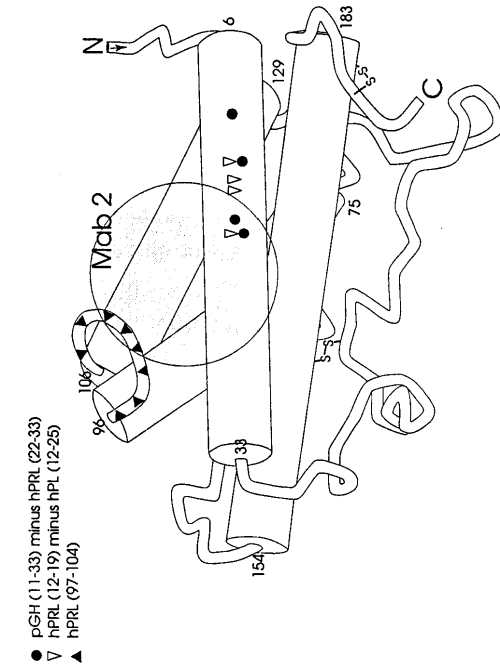
【 1 2 B 】

337 344 351 358 365 372 379 386 393 400 407 414 421 428 435 442 449 456 463 470 477 484 491 498 505 512 519 526 533 540 547 554 561 568 575 582 589 596 603 610 617 624 631 638 645 652 659 666 673 680 687 694 701 708 715 722 729 736 743 750 757 764 771 778 785 792 799 806 813 820 827 834 841 848 855 862 869 876 883 890 897 904 911 918 925 932 939 946 953 960 967 974 981 988 995 1002 1009 1016 1023 1030 1037 1044 1051 1058 1065 1072 1079 1086 1093 1100 1107 1114 1121 1128 1135 1142 1149 1156 1163 1170 1177 1184 1191 1198 1205 1212 1219 1226 1233 1240 1247 1254 1261 1268 1275 1282 1289 1296 1303 1310 1317 1324 1331 1338 1345 1352 1359 1366 1373 1380 1387 1394 1401 1408 1415 1422 1429 1436 1443 1450 1457 1464 1471 1478 1485 1492 1499 1506 1513 1520 1527 1534 1541 1548 1555 1562 1569 1576 1583 1590 1597 1604 1611 1618 1625 1632 1639 1646 1653 1660 1667 1674 1681 1688 1695 1702 1709 1716 1723 1730 1737 1744 1751 1758 1765 1772 1779 1786 1793 1800 1807 1814 1821 1828 1835 1842 1849 1856 1863 1870 1877 1884 1891 1898 1905 1912 1919 1926 1933 1940 1947 1954 1961 1968 1975 1982 1989 1996 2003 2010 2017 2024 2031 2038 2045 2052 2059 2066 2073 2080 2087 2094 2101 2108 2115 2122 2129 2136 2143 2150 2157 2164 2171 2178 2185 2192 2199 2206 2213 2220 2227 2234 2241 2248 2255 2262 2269 2276 2283 2290 2297 2304 2311 2318 2325 2332 2339 2346 2353 2360 2367 2374 2381 2388 2395 2402 2409 2416 2423 2430 2437 2444 2451 2458 2465 2472 2479 2486 2493 2500 2507 2514 2521 2528 2535 2542 2549 2556 2563 2570 2577 2584 2591 2598 2605 2612 2619 2626 2633 2640 2647 2654 2661 2668 2675 2682 2689 2696 2703 2710 2717 2724 2731 2738 2745 2752 2759 2766 2773 2780 2787 2794 2801 2808 2815 2822 2829 2836 2843 2850 2857 2864 2871 2878 2885 2892 2899 2906 2913 2920 2927 2934 2941 2948 2955 2962 2969 2976 2983 2990 2997 3004 3011 3018 3025 3032 3039 3046 3053 3060 3067 3074 3081 3088 3095 3102 3109 3116 3123 3130 3137 3144 3151 3158 3165 3172 3179 3186 3193 3200 3207 3214 3221 3228 3235 3242 3249 3256 3263 3270 3277 3284 3291 3298 3305 3312 3319 3326 3333 3340 3347 3354 3361 3368 3375 3382 3389 3396 3403 3410 3417 3424 3431 3438 3445 3452 3459 3466 3473 3480 3487 3494 3501 3508 3515 3522 3529 3536 3543 3550 3557 3564 3571 3578 3585 3592 3599 3606 3613 3620 3627 3634 3641 3648 3655 3662 3669 3676 3683 3690 3697 3704 3711 3718 3725 3732 3739 3746 3753 3760 3767 3774 3781 3788 3795 3802 3809 3816 3823 3830 3837 3844 3851 3858 3865 3872 3879 3886 3893 3900 3907 3914 3921 3928 3935 3942 3949 3956 3963 3970 3977 3984 3991 3998 4005 4012 4019 4026 4033 4040 4047 4054 4061 4068 4075 4082 4089 4096 4103 4110 4117 4124 4131 4138 4145 4152 4159 4166 4173 4180 4187 4194 4201 4208 4215 4222 4229 4236 4243 4250 4257 4264 4271 4278 4285 4292 4299 4306 4313 4320 4327 4334 4341 4348 4355 4362 4369 4376 4383 4390 4397 4404 4411 4418 4425 4432 4439 4446 4453 4460 4467 4474 4481 4488 4495 4502 4509 4516 4523 4530 4537 4544 4551 4558 4565 4572 4579 4586 4593 4600 4607 4614 4621 4628 4635 4642 4649 4656 4663 4670 4677 4684 4691 4698 4705 4712 4719 4726 4733 4740 4747 4754 4761 4768 4775 4782 4789 4796 4803 4810 4817 4824 4831 4838 4845 4852 4859 4866 4873 4880 4887 4894 4901 4908 4915 4922 4929 4936 4943 4950 4957 4964 4971 4978 4985 4992 4999 5006 5013 5020 5027 5034 5041 5048 5055 5062 5069 5076 5083 5090 5097 5104 5111 5118 5125 5132 5139 5146 5153 5160 5167 5174 5181 5188 5195 5202 5209 5216 5223 5230 5237 5244 5251 5258 5265 5272 5279 5286 5293 5300 5307 5314 5321 5328 5335 5342 5349 5356 5363 5370 5377 5384 5391 5398 5405 5412 5419 5426 5433 5440 5447 5454 5461 5468 5475 5482 5489 5496 5503 5510 5517 5524 5531 5538 5545 5552 5559 5566 5573 5580 5587 5594 5601 5608 5615 5622 5629 5636 5643 5650 5657 5664 5671 5678 5685 5692 5699 5706 5713 5720 5727 5734 5741 5748 5755 5762 5769 5776 5783 5790 5797 5804 5811 5818 5825 5832 5839 5846 5853 5860 5867 5874 5881 5888 5895 5902 5909 5916 5923 5930 5937 5944 5951 5958 5965 5972 5979 5986 5993 6000 6007 6014 6021 6028 6035 6042 6049 6056 6063 6070 6077 6084 6091 6098 6105 6112 6119 6126 6133 6140 6147 6154 6161 6168 6175 6182 6189 6196 6203 6210 6217 6224 6231 6238 6245 6252 6259 6266 6273 6280 6287 6294 6301 6308 6315 6322 6329 6336 6343 6350 6357 6364 6371 6378 6385 6392 6399 6406 6413 6420 6427 6434 6441 6448 6455 6462 6469 6476 6483 6490 6497 6504 6511 6518 6525 6532 6539 6546 6553 6560 6567 6574 6581 6588 6595 6602 6609 6616 6623 6630 6637 6644 6651 6658 6665 6672 6679 6686 6693 6700 6707 6714 6721 6728 6735 6742 6749 6756 6763 6770 6777 6784 6791 6798 6805 6812 6819 6826 6833 6840 6847 6854 6861 6868 6875 6882 6889 6896 6903 6910 6917 6924 6931 6938 6945 6952 6959 6966 6973 6980 6987 6994 7001 7008 7015 7022 7029 7036 7043 7050 7057 7064 7071 7078 7085 7092 7099 7106 7113 7120 7127 7134 7141 7148 7155 7162 7169 7176 7183 7190 7197 7204 7211 7218 7225 7232 7239 7246 7253 7260 7267 7274 7281 7288 7295 7302 7309 7316 7323 7330 7337 7344 7351 7358 7365 7372 7379 7386 7393 7400 7407 7414 7421 7428 7435 7442 7449 7456 7463 7470 7477 7484 7491 7498 7505 7512 7519 7526 7533 7540 7547 7554 7561 7568 7575 7582 7589 7596 7603 7610 7617 7624 7631 7638 7645 7652 7659 7666 7673 7680 7687 7694 7701 7708 7715 7722 7729 7736 7743 7750 7757 7764 7771 7778 7785 7792 7799 7806 7813 7820 7827 7834 7841 7848 7855 7862 7869 7876 7883 7890 7897 7904 7911 7918 7925 7932 7939 7946 7953 7960 7967 7974 7981 7988 7995 8002 8009 8016 8023 8030 8037 8044 8051 8058 8065 8072 8079 8086 8093 8100 8107 8114 8121 8128 8135 8142 8149 8156 8163 8170 8177 8184 8191 8198 8205 8212 8219 8226 8233 8240 8247 8254 8261 8268 8275 8282 8289 8296 8303 8310 8317 8324 8331 8338 8345 8352 8359 8366 8373 8380 8387 8394 8401 8408 8415 8422 8429 8436 8443 8450 8457 8464 8471 8478 8485 8492 8499 8506 8513 8520 8527 8534 8541 8548 8555 8562 8569 8576 8583 8590 8597 8604 8611 8618 8625 8632 8639 8646 8653 8660 8667 8674 8681 8688 8695 8702 8709 8716 8723 8730 8737 8744 8751 8758 8765 8772 8779 8786 8793 8800 8807 8814 8821 8828 8835 8842 8849 8856 8863 8870 8877 8884 8891 8898 8905 8912 8919 8926 8933 8940 8947 8954 8961 8968 8975 8982 8989 8996 9003 9010 9017 9024 9031 9038 9045 9052 9059 9066 9073 9080 9087 9094 9101 9108 9115 9122 9129 9136 9143 9150 9157 9164 9171 9178 9185 9192 9199 9206 9213 9220 9227 9234 9241 9248 9255 9262 9269 9276 9283 9290 9297 9304 9311 9318 9325 9332 9339 9346 9353 9360 9367 9374 9381 9388 9395 9402 9409 9416 9423 9430 9437 9444 9451 9458 9465 9472 9479 9486 9493 9500 9507 9514 9521 9528 9535 9542 9549 9556 9563 9570 9577 9584 9591 9598 9605 9612 9619 9626 9633 9640 9647 9654 9661 9668 9675 9682 9689 9696 9703 9710 9717 9724 9731 9738 9745 9752 9759 9766 9773 9780 9787 9794 9801 9808 9815 9822 9829 9836 9843 9850 9857 9864 9871 9878 9885 9892 9899 9906 9913 9920 9927 9934 9941 9948 9955 9962 9969 9976 9983 9990 9997 10004 10011 10018 10025 10032 10039 10046 10053 10060 10067 10074 10081 10088 10095 10102 10109 10116 10123 10130 10137 10144 10151 10158 10165 10172 10179 10186 10193 10200 10207 10214 10221 10228 10235 10242 10249 10256 10263 10270 10277 10284 10291 10298 10305 10312 10319 10326 10333 10340 10347 10354 10361 10368 10375 10382 10389 10396 10403 10410 10417 10424 10431 10438 10445 10452 10459 10466 10473 10480 10487 10494 10501 10508 10515 10522 10529 10536 10543 10550 10557 10564 10571 10578 10585 10592 10599 10606 10613 10620 10627 10634 10641 10648 10655 10662 10669 10676 10683 10690 10697 10704 10711 10718 10725 10732 10739 10746 10753 10760 10767 10774 10781 10788 10795 10802 10809 10816 10823 10830 10837 10844 10851 10858 10865 10872 10879 10886 10893 10900 10907 10914 10921 10928 10935 10942 10949 10956 10963 10970 10977 10984 10991 10998 11005 11012 11019 11026 11033 11040 11047 11054 11061 11068 11075 11082 11089 11096 11103 11110 11117 11124 11131 11138 11145 11152 11159 11166 11173 11180 11187 11194 11201 11208 11215 11222 11229 11236 11243 11250 11257 11264 11271 11278 11285 11292 11299 11306 11313 11320 11327 11334 11341 11348 11355 11362 11369 11376 11383 11390 11397 11404 11411 11418 11425 11432 11439 11446 11453 11460 11467 11474 11481 11488 11495 11502 11509 11516 11523 11530 11537 11544 11551 11558 11565 11572 11579 11586 11593 11600 11607 11614 11621 11628 11635 11642 11649 11656 11663 11670 11677 11684 11691 11698 11705 11712 11719 11726 11733 11740 11747 11754 11761 11768 11775 11782 11789 11796 11803 11810 11817 11824 11831 11838 11845 11852 11859 11866 11873 11880 11887 11894 11901 11908 11915 11922 11929 11936 11943 11950 11957 11964 11971 11978 11985 11992 11999 12006 12013 12020 12027 12034 12041 12048 12055 12062 12069 12076 12083 12090 12097 12104 12111 12118 12125 12132 12139 12146 12153 12160 12167 12174 12181 12188 12195 12202 12209 12216 12223 12230 12237 12244 12251 12258 12265 12272 12279 12286 12293 12300 12307 12314 12321 12328 12335 12342 12349 12356 12363 12370 12377 12384 12391 12398 12405 12412 12419 12426 12433 12440 12447 12454 12461 12468 12475 12482 12489 12496 12503 12510 12517 12524 12531 12538 12545 12552 12559 12566 12573 12580 12587 12594 12601 12608 12615 12622 12629 12636 12643 12650 12657 12664 12671 12678 12685 12692 12699 12706 12713 12720 12727 12734 12741 12748 12755 12762 12769 12776 12783 12790 12797 12804 12811 12818 12825 12832 12839 12846 12853 12860 12867 12874 12881 12888 12895 12902 12909 12916 12923 12930 12937 12944 12951 12958 12965 12972 12979 12986 12993 13000 13007 13014 13021 13028 13035 13042 13049 13056 13063 13070 13077 13084 13091 13098 13105 13112 13119 13126 13133 13140 13147 13154 13161 13168 13175 13182 13189 13196 13203 13210 13217 13224 13231 13238 13245 13252 13259 13266 13273 13280 13287 13294 13301 13308 13315 13322 13329 13336 13343 13350 13357 13364 13371 13378 13385 13392 13399 13406 13413 13420 13427 13434 13441 13448 13455 13462 13469 13476 13483 13490 13497 13504 13511 13518 13525 13532 13539 13546 13553 13560 13567 13574 13581 13588 13595 13602 13609 13616 13623 13630 13637 13644 13651 13658 13665 13672 13679 13686 13693 13700 13707 13714 13721 13728 13735 13742 13749 13756 13763 13770 13777 13784 13791 13798 13805 13812 13819 13826 13833 13840 13847 13854 13861 13868 13875 13882 13889 13896 13903 13910 13917 13924 13931 13938 13945 13952 13959 13966 13973 13980 13987 13994 14001 14008 14015 14022 14029 14036 14043 14050 14057 14064 14071 14078 14085 14092 14099 14106 14113 14120 14127 14134 14141 14148 14155 14162 14169 14176 14183 14190 14197 14204 14211 14218 14225 14232 14239 14246 14253 14260 14267 14274 14281 14288 14295 14302 14309 14316 14323 14330 14337 14344 14351 14358 14365 14372 14379 14386 14393 14400 14407 14414 14421 14428 14435 14442 14449 14456 14463 14470 14477 14484 14491 14498 14505 14512 14519 14526 14533 14540 14547 14554 14561 14568 14575 14582 14589 14596 14603 14610 14617 14624 14631 14638 14645 14652 14659 14666 14673 14680 14687 14694 14701 14708 14715 14722 14729 14736 14743 14750 14757 14764 14771 14778 14785 14792 14799 14806 14813 14820 14827 14834 14841 14848 14855 14862 14869 14876 14883 14890 14897 14904 14911 14918 14925 14932 14939 14946 14953 14960 14967 14974 14981 14988 14995 15002 15009 15016 15023 15030 15037 15044 15051 15058 15065 15072 15079 15086 15093 15100 15107 15114 15121 15128 15135 15142 15149 15156 15163 15170 15177 15184 15191 15198 15205 15212 15219 15226 15233 15240 15247 15254 15261 15268 15275 15282 15289 15296 15303 15310 15317 15324 15331 15338 15345 15352 15359 15366 15373 15380 15387 15394 15401 15408 15415 15422 15429 15436 15443 15450 15457 15464 15471 15478 15485 15492 15499 15506 15513 15520 15527 15534 15541 15548 15555 15562 15569 15576 15583 15590 15597 15604 15611 15618 15625 15632 15639 15646 15653 15660 15667 15674 15681 15688 15695 15702 15709 15716 15723 15730 15737 15744 15751 15758 15765 15772 15779 15786 15793 15800 15807 15814 15821 15828 15835 15842 15849 15856 15863 15870 15877 15884 15891 15898 15905 15912 15919 15926 15933 15940 15947 15954 15961 15968 15975 15982 15989 15996 16003 16010 16017 16024 16031 16038 16045 16052 16059 16066 16073 16080 16087 16094 16101 16108 16115 16122 16129 16136 16143 16150 16157 16164 16171 16178 16185 16192 16199 16206 16213 16220 16227 16234 16241 16248 16255 16262 16269 16276 16283 16290 16297 16304 1631

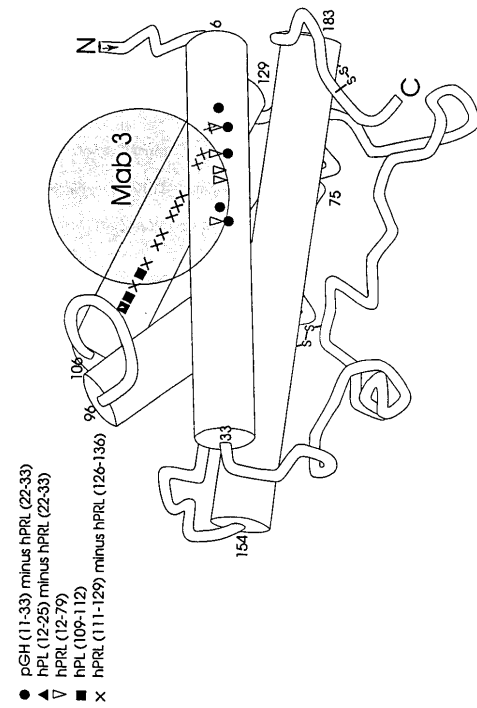
【 13 】



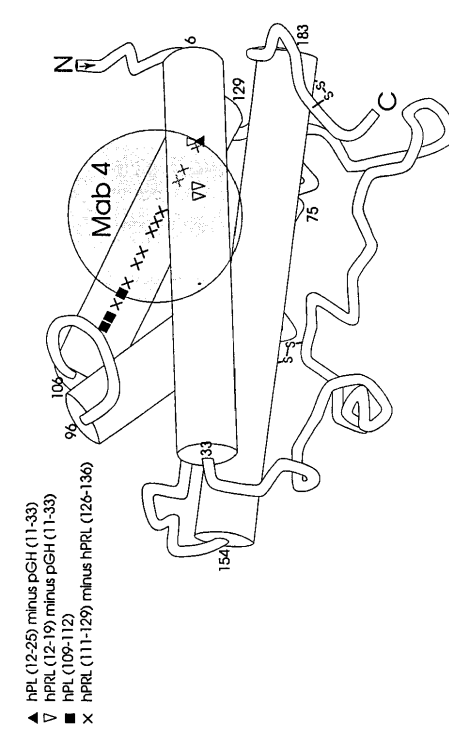
【 14 】



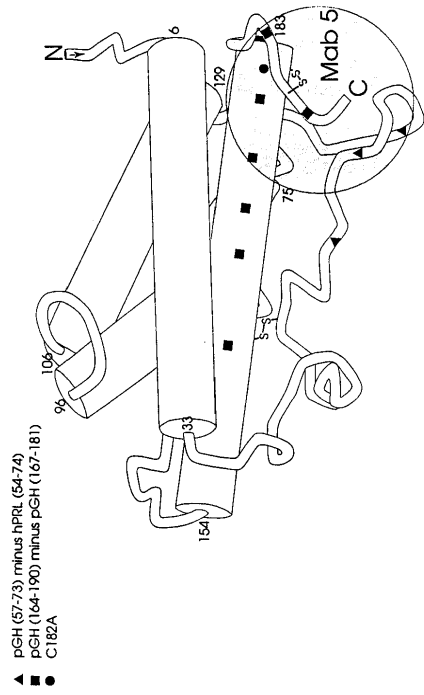
【 15 】



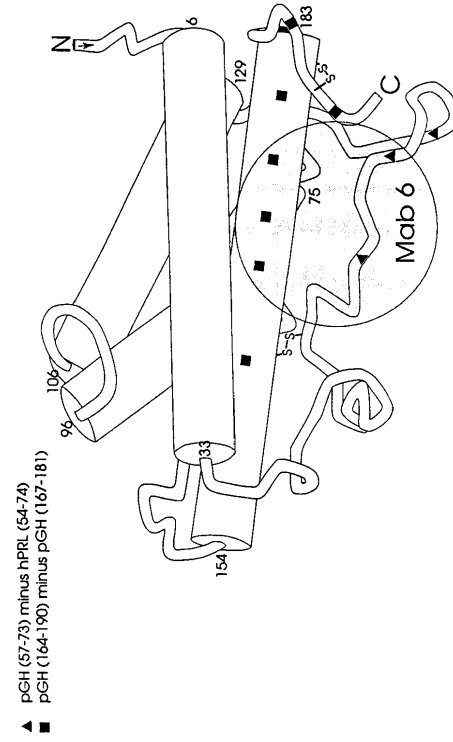
【 16 】



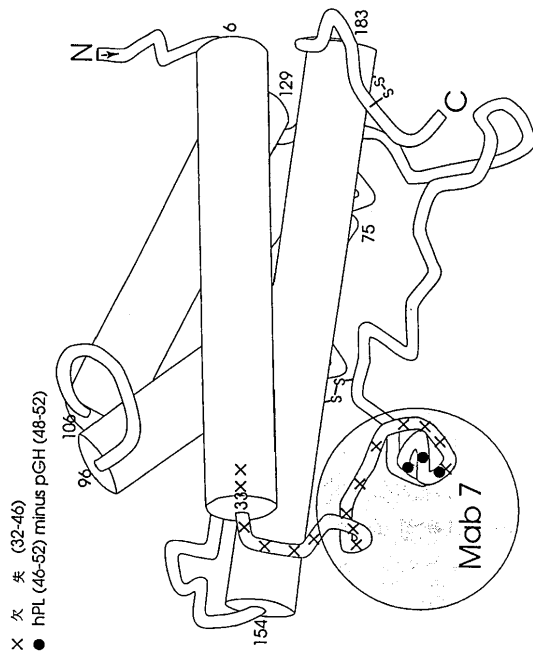
【 17 】



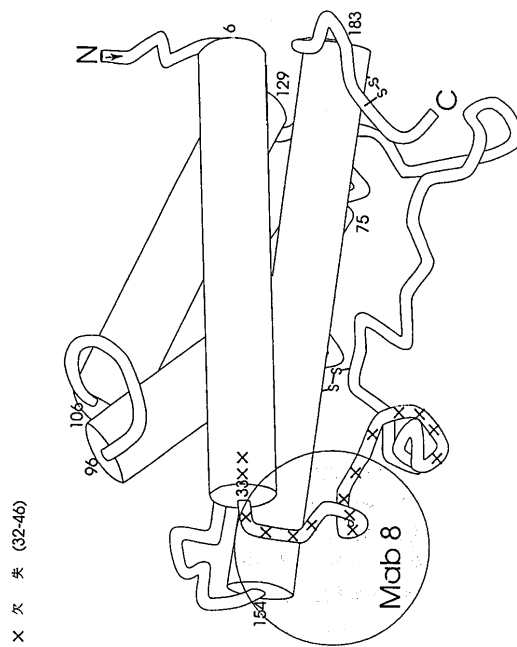
【 18 】



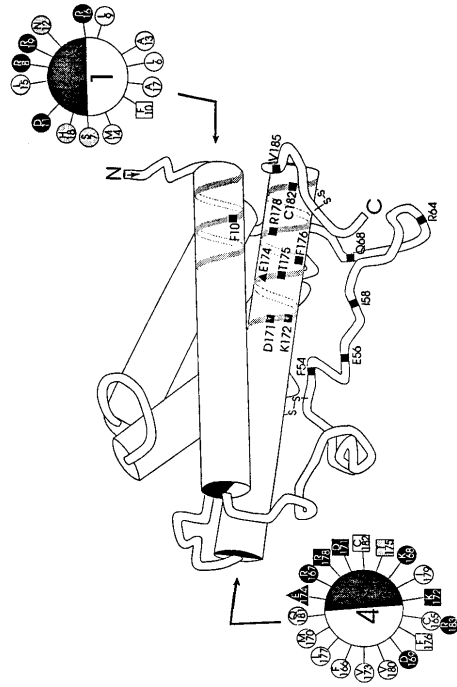
【 19 】



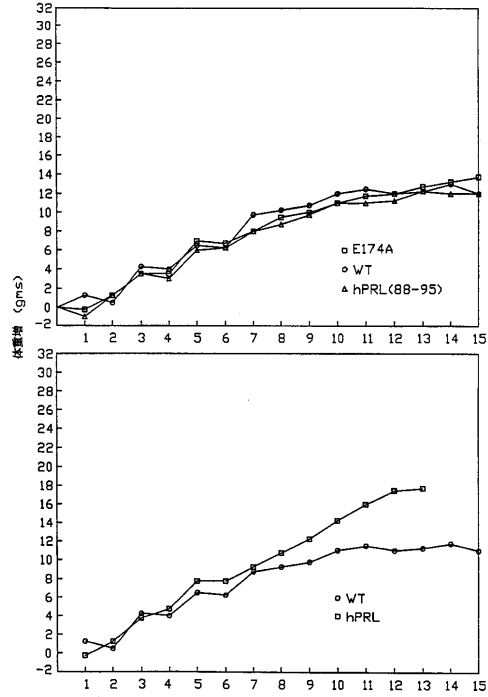
【 20 】



【 図 2 1 】

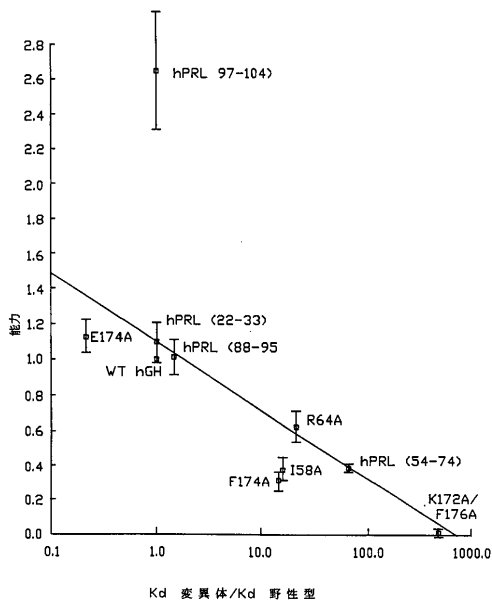


【 図 2 2 】

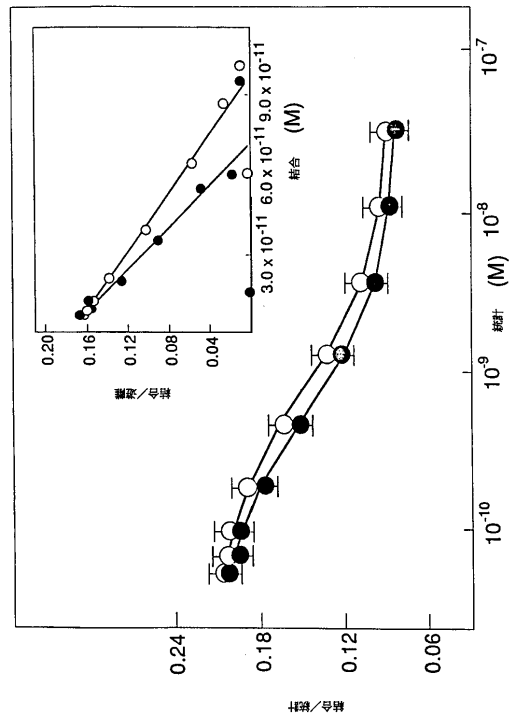


【 図 2 3 】

処理 8 日後のラットの GH 類似体の能力

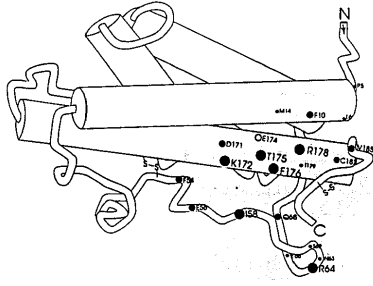


【 図 2 4 】



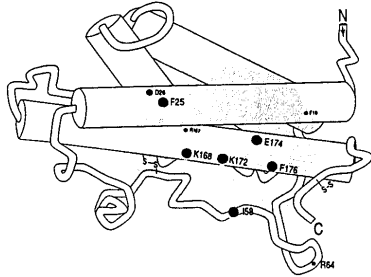
【 図 2 5 A 】

hGHr に対する結合決定基

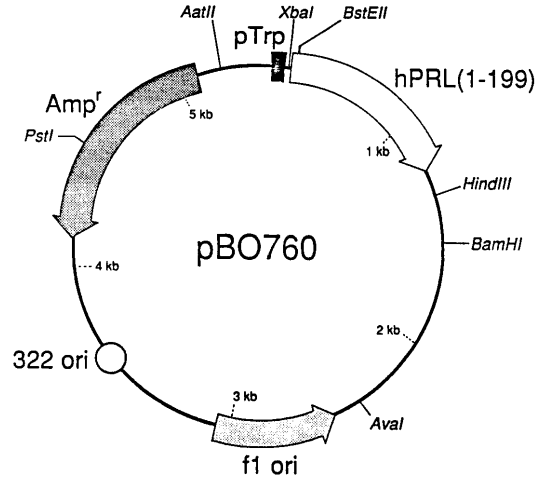


【 図 2 5 B 】

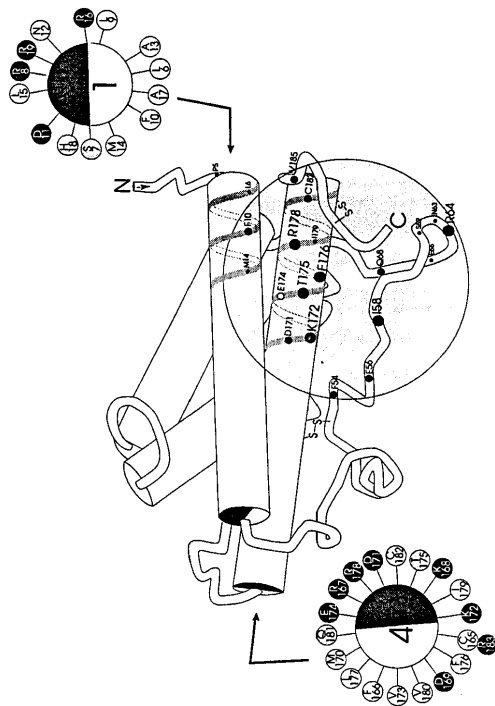
hPRLr に対する結合決定基



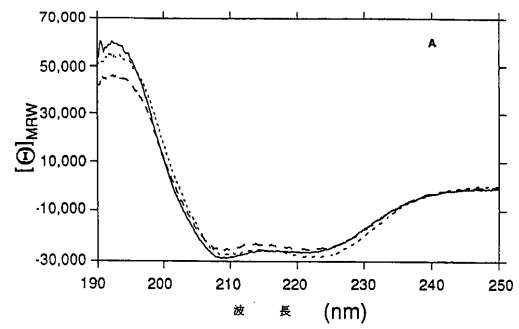
【 図 2 6 】



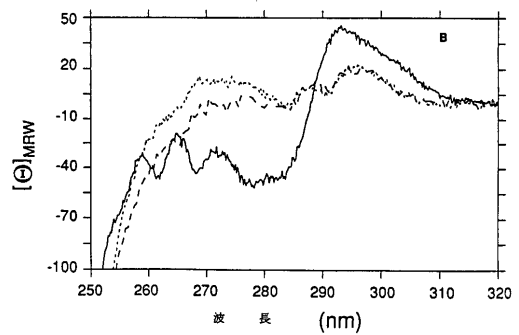
【 図 2 7 】



【 図 2 8 A 】



【 図 2 8 B 】



【 29 】

² hGH P I P - - - - - L S R L F D N A M L R A H R
 hPRL P I C P G G A R C Q V T E R D L F D R A V V L S H Y¹⁹

⁵⁴ hGH F S E I P T P S N R E E T Q Q K S N L E⁷⁴
 hPRL H T S S L A P E D K E Q A Q Q M N Q K D

¹⁶⁷ hGH R K D M D K V E T F L R I V Q C R S - V E G S C G F¹⁹¹
 hPRL R R D S H K I D N Y L K L L K C R I I H N N N C

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 P 21/02	(2006.01)	C 1 2 P 21/02	H
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A
A 6 1 K 38/27	(2006.01)	A 6 1 K 37/36	
C 1 2 R 1/19	(2006.01)	C 1 2 N 1/21	
		C 1 2 R 1:19	
		C 1 2 P 21/02	
		C 1 2 R 1:19	

(72)発明者 ウェールズ ジェイムズ エイ
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 0 1 0 バーリンガム コロンブス アベニュー 1 3
 4 2

(72)発明者 カンニンガム ブライアン シー
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 6 1 1 ピードモント オリーヴ アベニュー 2 4

審査官 光本 美奈子

(56)参考文献 特開昭62-104584(JP,A)
 Endocrine Reviews, 1986年,7(2),169-203

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 C07K 14/61
 C12N 15/00-15/90

专利名称(译)	荷尔蒙突变体		
公开(公告)号	JP3765959B2	公开(公告)日	2006-04-12
申请号	JP2000034866	申请日	2000-02-14
[标]申请(专利权)人(译)	健泰科生物技术公司		
申请(专利权)人(译)	Genentech公司		
当前申请(专利权)人(译)	Genentech公司		
[标]发明人	ウェールズジェイムズエイ カンニンガムブライアンシー		
发明人	ウェールズ ジェイムズ エイ カンニンガム ブライアン シー		
IPC分类号	C07K14/61 A61P3/10 A61P5/00 A61P5/06 C12N1/21 C12P21/02 G01N33/53 C12N15/09 A61K38/27 C12R1/19 C07K14/00 C07K14/435 C07K14/47 C07K14/575 C12N5/10 C12N15/10 C12N15/12 C12N15 /18 C12N15/62 C12N15/63 C12N15/70 C40B40/02 G01N33/68 G01N33/74		
CPC分类号	C07K14/575 C07K14/61 C07K2319/00 C07K2319/75 C12N15/1037 C12N15/62 C40B40/02 G01N33 /6878 G01N33/74 G01N2333/61		
FI分类号	C07K14/61 A61P3/10 A61P5/00 A61P5/06 C12N1/21 C12P21/02.H G01N33/53.D C12N15/00.ZNAA A61K37/36 C12R1/19 C12P21/02 A61K38/00 A61K38/27 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N15/10. P C12N15/10.Z C12N15/62.P C12N15/62.Z		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA03 4B024/CA05 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/GA19 4B024 /HA01 4B024/HA15 4B064/AG13 4B064/CA02 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B065/AA26X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/AC20 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4C084 /AA07 4C084/BA44 4C084/DB22 4C084/ZC042 4C084/ZC332 4C084/ZC352 4H045/AA10 4H045 /CA46 4H045/DA31 4H045/EA30 4H045/FA74		
代理人(译)	中村稔 小川伸男		
优先权	07/428066 1989-10-26 US		
其他公开文献	JP2000184896A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：获得具有天然不存在的氨基酸序列的新生长激素变体，具有与亲本激素相同的第一和第三部分，第二部分包含与亲本激素相似的部分，并且能够与不同于母体激素的目标物质相互作用。解决方案：与亲本生长激素相比，这种新的生长激素变体与靶物质不同地相互作用，具有自然界中不存在的氨基酸序列，并且至少包含来自N末端的第一，第二和第三部分。第一部分对应于天然存在的亲本生长激素的氨基酸序列的至少一部分，第三部分对应于亲本生长激素的氨基酸序列的至少一部分。第二部分对应于与亲本生长激素相似的天生长激素的氨基酸序列的相似部分。生长激素变体具有理想的生物学，生物化学和免疫学特性，这些特性不同于原始生长激素的特性。通过诱导生长激素基因中的突变，将突变的基因插入载体中然后在宿主细胞中表达生长激素变体来获得变体。

親ポリペプチド	類似体	標的または標的を含むアッセイ
ヒト成長ホルモン	ヒト胎盤ラクタジェン、ヒトプロラクチンおよびブタ成長ホルモン	ソマトジエニック、ラクタジェニック、ジアカクタジエニック、脂質分解、窒素遊離、マクロファージ活性化およびhGHのインシュリン様効果に対するレセプター；ラット体重法；ラット体重増アッセイ、OB/OBマウス又はイヌにおけるインシュリン耐性アッセイ、ヒト肝臓、アジポブース、リンパ球、胸腺細胞および卵巣組織上のレセプター
hPRL	pGH	ヒトプロラクチンレセプターに対する結合
ウサギGHレセプター	ヒトGHレセプター	ウサギGHへの結合
α -インターフェロン	関連ヒトインターフェロンおよび動物インターフェロン	α 1インターフェロンレセプターへの結合
ヒト組織成長因子 (TGF- β)	ヒトTGF- β 、またはインヒビリン	ヒト造血細胞増殖調節
表皮増殖因子 (EGF)	TGF- α	カロチノサイト増殖
マウス組織壊死因子 (nTNF)	(hTNF) ヒト組織壊死因子	マウスTNFレセプター活性
ヒト顆粒球マクロファージコロニー刺激因子	マウス顆粒球マクロファージコロニー刺激因子	ヒト骨髄幹細胞の増殖および分化
ヒトCD-4レセプター	マウスCD-4レセプター	HIVウイルスのgp-120
ズブチリシン (バチルスアミリルグアイフェイシヤンス)	ズブチリシン (バチルスリチエニルホルミス)	サクシニル-ala-ala-pro-glu-P-ニトロアミド
ヒト γ -インターフェロン	関連ヒトインターフェロンおよび動物インターフェロン (例えばマウス由来)	ヒトインターフェロンレセプターの活性化
インシュリン成長因子 (IGF-1)	インシュリン	IGF-1レセプター成長調節レセプター
組織プラスミノゲン活性化因子 (tPA)	トリプシノロキナーゼ	プラスミノゲン (切断) フィブリン (結合)