

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5113314号  
(P5113314)

(45) 発行日 平成25年1月9日(2013.1.9)

(24) 登録日 平成24年10月19日(2012.10.19)

(51) Int.Cl.		F I	
<b>C 1 2 N</b>	<b>15/09</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A
<b>C 0 7 K</b>	<b>14/705</b>	<b>(2006.01)</b>	C O 7 K 14/705
<b>A 6 1 K</b>	<b>38/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K 37/02
<b>A 6 1 P</b>	<b>29/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P 29/00
<b>A 6 1 K</b>	<b>48/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K 48/00

請求項の数 8 (全 75 頁)

(21) 出願番号 特願2002-522490 (P2002-522490)  
 (86) (22) 出願日 平成13年8月31日 (2001. 8. 31)  
 (65) 公表番号 特表2004-527217 (P2004-527217A)  
 (43) 公表日 平成16年9月9日 (2004. 9. 9)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2001/027227  
 (87) 国際公開番号 W02002/018583  
 (87) 国際公開日 平成14年3月7日 (2002. 3. 7)  
 審査請求日 平成20年8月19日 (2008. 8. 19)  
 (31) 優先権主張番号 60/229, 700  
 (32) 優先日 平成12年9月1日 (2000. 9. 1)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 502418712  
 ザ センター フォー ブラッド リサーチ インク  
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O 2 1 1 5 ポストン ハンティントン アベニュー 8 0 0  
 (74) 代理人 100136630  
 弁理士 水野 祐啓  
 (74) 代理人 100095577  
 弁理士 小西 富雅  
 (74) 代理人 100100424  
 弁理士 中村 知公

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 所望のコンホメーションで安定させた改変ポリペプチド及び該ポリペプチドの作製方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

LFA-1インテグリンの LサブユニットのI-ドメインを含む改変インテグリンI-ドメインポリペプチドであって、前記I-ドメインが、E284C/E301C及びK287C/K294Cから成る群より選択されるアミノ酸置換により開いたコンホメーションで固定されている、改変インテグリンI-ドメインポリペプチド。

【請求項 2】

異種ポリペプチドに作動的に連結させてある、請求項 1 に記載の改変インテグリンI-ドメインポリペプチド。

【請求項 3】

更にインテグリン サブユニットに結合させてある、請求項 1 又は 2 のいずれかに記載の改変インテグリンI-ドメインポリペプチド。

【請求項 4】

請求項 1 乃至 3 のいずれかに定義された改変インテグリンI-ドメインポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子。

【請求項 5】

請求項 1 乃至 3 のいずれかに記載の改変インテグリンI-ドメインポリペプチドの、自己免疫疾患の炎症性疾患の防止又は処置する医薬を製造するための使用。

【請求項 6】

前記改変インテグリンI-ドメインポリペプチドがリガンドに結合する、請求項 5 に記載

の使用。

【請求項 7】

請求項 4 に記載の核酸分子を有効量、含む、炎症性疾患の予防的又は治療的処置のためのワクチン製剤。

【請求項 8】

(a) 請求項 1 乃至 3 のいずれかに記載の改変インテグリンI-ドメインポリペプチド、及び

(b) 薬学的に許容可能な担体、を含む組成物。

【発明の詳細な説明】

10

【0001】

関連出願

本出願は、引用によってその全文をここに援用することとする、2000年9月1日出願の米国暫定特許出願第60/229,700号に基づく優先権を主張するものである。

【0002】

発明の背景

インテグリン・ファミリーの接着分子は非共有結合的に結合した / ヘテロ二量体である。今日までのところ、少なくとも14種類の異なるインテグリン サブユニットと8種類の異なる サブユニットが報告されている(Hynes, RO (1992) Cell 69:1-25)。リンパ球機能関連抗原1 (LFA-1)は、白血球インテグリンサブファミリーのメンバーの一つである。白血球インテグリンサブファミリーのメンバー間では、2サブユニット(CD18)は共通であるが、サブユニットは異なっており、LFA-1、Mac-1、p150.95 及び d/ 2はそれぞれ、L (CD11a)、M (CD11b)、X (CD11c)及び d を有する(Springer, TA (1990) Nature 346:425-433; Larson, RS and Springer, TA (1990) Immunol Rev 114:181-217; Van der Vieren, M et al. (1995) Immunity 3:683-690)。これら白血球インテグリンは正常な免疫性及び炎症性応答に必須な幅広い接着上の相互作用を媒介する。

20

【0003】

インテグリン 及び サブユニットは両者とも、タイプI膜貫通型糖タンパク質であり、それぞれ大きな細胞外ドメインと、一回膜貫通領域と、細胞質側の短い尾を持つ。及び サブユニットの細胞外ドメインでは、構造上異なるドメインがいくつか、同定又は予測されてきた。

30

【0004】

インテグリン サブユニットのN末端領域は、それぞれ約60個のアミノ酸が7回繰り返された部分を含有するが、これが折り畳まれて7枚の羽根のある -プロペラドメインを形成していると予測されている(Springer, TA (1997) Proc Natl Acad Sci USA 94:65-72)。白血球インテグリン サブユニットである 1、2、10、11、及び Eサブユニットは、約200個のアミノ酸から成る挿入ドメイン即ちI-ドメインを含有する(Larson, RS et al. (1989) J Cell Biol 108:703-712; Takada, Y et al. (1989) EMBO J 8:1361-1368; Briesewitz, R et al. (1993) J Biol Chem 268:2989-2996; Shaw, S K et al. (1994) J Biol Chem 269:6016-6025; Camper, L et al. (1998) J Biol Chem 273:20383-20389)。このI-ドメインは、 -プロペラドメインの シート2と3との間に挿入されていると予測されている。M、L、1及び2のI-ドメインの三次元構造が解明されており、これが、金属イオン依存性接着部位(MIDAS)と呼ばれる特有の二価陽イオン配位部位を持つジヌクレオチド結合折り畳み構造を採っていることが示されている(Lee, J-O, et al. (1995) Structure 3:1333-1340; Lee, J-O, et al. (1995) Cell 80:631-638; Qu, A and Leahy, DJ (1995) Proc Natl Acad Sci USA 92:10277-10281; Qu, A and Leahy, DJ (1996) Structure 4:931-942; Emsley, J et al. (1997) J Biol Chem 272:28512-28517; Baldwin, ET et al. (1998) Structure 6:923-935; Kallen, J et al. (1999) J Mol Biol 292:1-9)。MサブユニットのC末端領域は、サンドイッチ構造に折り畳まれていると予測されている(Lu, C et al. (1998) J Biol Chem 273:15138-15147)。

40

50

## 【 0 0 0 5 】

インテグリン サブユニットは、約 250 個のアミノ酸から成る保存ドメインを N 末端部分に、そしてシステイン - リッチな領域を C 末端部分に、含有する。保存ドメイン、又は I 様ドメインは、「I ドメインに似た」折り畳み構造を有していると予測されている (Puzon-McLaughlin, W and Takada, Y (1996) *J Biol Chem* 271:20438-20443; Tuckwell, DS and Humphries, MJ (1997) *FEBS Lett* 400: 297-303; Huang, C et al. (2000) *J Biol Chem* 275:21514-24)。サブユニットの C 末端にあるシステイン・リッチな領域は、1、2 及び 3 サブユニットに対する数多くの活性化抗体がこの領域に結合することから考えても、インテグリンの機能調節に重要であると思われる (Petruzzelli, L et al. (1995) *J Immunol* 155:854-866; Robinson, MK et al. (1992) *J Immunol* 148:1080-1085; Faul, RJ et al. (1996) *J Biol Chem* 271:25099-25106; Shih, DT et al. (1993) *J Cell Biol* 122:1361-1371; Du, X et al. (1993) *J Biol Chem* 268:23087-23092)。

10

## 【 0 0 0 6 】

インテグリンの電子顕微鏡像からは、1 及び 2 サブユニットの N 末端部分同士が折り畳まれて球形の頭部を形成し、この頭部が、3 及び 4 細胞外ドメインの C 末端部分に相当する長さ約 16 nm の二本の棹状の尾によって、膜に繋がれていることが分かる (Nermut, MV et al. (1988), *EMBO J* 7:4093-4099; Weisel, JW et al. (1992) *J Biol Chem* 267:16637-16643; Wippler, J et al. (1994) *J Biol Chem* 269: 8754-8761)。

## 【 0 0 0 7 】

LFA-1 はあらゆる白血球上に発現し、三種類の Ig スーパーファミリーのメンバーである細胞間接着分子 1、2 及び 3 の受容体である (Marlin, SD et al. (1987) *Cell* 51:813-819; Staunton, DE et al. (1989) *Nature* 339:61 -64; de Fougères, et al. (1991) *J Exp Med* 174: 253-267)。多くのデータが、LFA-1 の I ドメインがリガンドとの相互作用にとって重要であることを示している。変異誘発実験では、I ドメイン内の残基 M140、E146、T175、L205、E241、T243、S245 及び K263 が、リガンド結合にとって重要であることが示唆された (Huang, C et al. (1995) *J Biol Chem* 270:19008-19016; Edwards, CP et al. (1998) *J Biol Chem* 273:28937-28944)。これらの残基は I ドメイン表面上に位置して  $Mg^{2+}$  イオンを取り囲み、I ドメインの上側表面上でリガンド結合界面を規定している。リガンド結合におけるこのような I ドメインの重要性は、さらに mAb 遮断実験でも明らかにされている。LFA-1 の、そのリガンドとの相互作用を阻害する mAb の多くは I ドメインの位置に来る (Randi, AM et al. (1994) *J Biol Chem* 269:12395-12398; Champe, M et al. (1995) *J Biol Chem* 270:1388-1394; Huang, C et al. (1995) *J Biol Chem* 270:19008-19016; Edwards, CP et al. (1998) *J Biol Chem* 273:28937-28944)。二つのグループが最近、I ドメインを削除した LFA-1 はリガンド認識能及び結合能を欠いていることを示しており、LFA-1 機能における I ドメインの役割がさらに実証された (Leitinger, B et al. (2000) *Mol Biol Cell* 11, 677-690; Yalamanchili, P et al. (2000) *J Biol Chem* 275:21877-82)。I ドメインを含有する他のインテグリンの I ドメインも、リガンド結合における関与が指摘されている (Diamond, MS (1993) *J Cell Biol* 120:545556; Michishita, M et al. (1993) *Cell* 72:857-867; Muchowski, PJ et al. (1994) *J Biol Chem* 269:26419-26423; Zhou, L et al. (1994) *J Biol Chem* 269:17075-17079; Ueda, T et al. (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* 91:10680-10684; Kamata, T et al. (1994) *J Biol Chem* 269:96599663; Kern, A et al. (1994) *J Biol Chem* 269:22811-22816)。

20

30

40

## 【 0 0 0 8 】

LFA-1 が ICAM に結合するには、LFA-1 の活性化が必要である。LFA-1 は、「インサイド・アウト」シグナリングと呼ばれる細胞質からのシグナルによって活性化する (Diamond, MS et al. (1994) *Current Biology* 4:506-517)。二価の陽イオン  $Mn^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$  及び  $Ca^{2+}$  は、LFA-1 のリガンド結合機能を直接修飾することができる (Dransfield, I et al. (1989) *EMBO J* 8:3759-3765; Dransfield, I et al. (1992). *J Cell Biol* 116:219-226; Stewart, M P et al. (1996) *J Immunol* 156:1810-1817)。加えて、LFA-1 は、1 または 2 サブユニットの細胞外ドメインに結合するいくつかの mAb によっても活性化する (Keizer, GD et al.

50

(1988) J Immunol 140:1393-1400; Robinson, MK et al. (1992) J Immunol 148:1080-1085; Andrew, D et al. (1993) Eur J Immunol 23:2217-2222; Petruzzelli, L et al. (1995) J Immunol 155:854-866)。インテグリン活性化の分子機序はまだ余り理解が進んではいない。インテグリン活性化を伴うような分子内のコンホメーション上の変化が起きると、リガンドに対するインテグリンの親和性が増すことが提唱されているが、この考えは、活性化後のインテグリンしか認識しない抗体が存在することで裏付けられている (Dransfield, I et al. (1989) EMBO J 8:3759-3765; Diamond, MS et al. (1993) J Cell Biol 120: 545-556; Shattil, SJ et al. (1985) J Biol Chem 260:11107-11114)。このような抗体の一つであるCBRLFA-1/5は、リガンド結合部位に非常に近いMac-1 I-ドメインに結合する (Oxvig, C et al. (1999) Proc Natl Acad Sci USA 96:2215-2220)が、このことは、I-ドメイン自体が、活性化によってコンホメーション上の変化を起こすことの更なる証拠である。

10

#### 【0009】

異なる二つの形の結晶型Mac-1 I-ドメインが得られており、これら二つの構造はそれぞれ「活性」及び「不活性」コンホメーションではないかとの仮説が立てられた (Lee, J-O et al. (1995) Structure 3, 1333-1340; Lee, J-O et al. (1995) Cell 80:631-638)。Mg<sup>2+</sup>と一緒に結晶化した「活性」型では、隣のI-ドメイン由来のグルタミン酸が6番目の金属配位部位となっているが、Mn<sup>2+</sup>と錯体形成した「不活性」型コンホメーションでは、一個の水分子が金属配位領域を完成させる。このような金属配位の変化は、C末端ヘリックスの大幅なシフトに関係がある。即ち、推定「活性」コンホメーションでは、C末端ヘリックスはI-ドメイン本体の10オングストローム下に移動する (Lee, J-O et al. (1995) Structure 3:1333-1340)。活性化Mac-1しか認識しないmAb CBRM-1/5をエピトープ・マッピングした結果、このコンホメーション上の違いは生理学的なものであることが示唆された (Oxvig, C et al. (1999) Proc Natl Acad Sci USA 96:2215-2220)。LFA-1 I-ドメインの結晶構造及びNMR構造の有するコンホメーションは、Mac1 I-ドメインの推定「不活性」コンホメーションに類似である (Qu, A et al. (1995) Proc Natl Acad Sci USA 92:10277-10281; Qu, A (1996) Structure 4:, 931-942; Kallen, J et al. (1999) J Mol Biol 292:1-9; Legge, GB et al. (2000) J Mol Biol 295:1251-1264)。

20

#### 【0010】

インテグリンに加え、薬学的に重要な多くのタンパク質は、コンホメーション又はコンホーマと呼ばれる二つの代替的な三次元構造で存在する。これらのタンパク質は、しばしば、例えば小型Gタンパク質、三量体Gタンパク質 サブユニット、チロシンキナーゼ、及びGタンパク質共役受容体など、重要なシグナリング機能を有する。典型的には、これらのコンホメーションのうちの一つに酵素活性又はエフェクター機能があって、他のものにはない。従って、例えば活性コンホメーションなど、ある特定のコンホメーションになったタンパク質に特異的な抗体又は小分子治療薬は、非選択的なものに比べて、大きな長所を有するであろう。

30

#### 【0011】

##### 発明の概要

コンピュータ・デザインを利用して、あるタンパク質又はポリペプチドに、その分子が所望のコンホメーションで安定するようジスルフィド結合を導入することができる。従って、「開いた」もしくは活性コンホメーション、又は、「閉じた」もしくは不活性コンホメーションなど、ある所望のタンパク質コンホメーションに特異的な、抗LFA-1抗体などの抗体又は小分子治療薬を同定することができる。

40

#### 【0012】

本発明は、あるタンパク質の機能ドメインを含むポリペプチドなどのポリペプチドを、所望のコンホメーションで安定させる方法に関するものである。本方法は、ポリペプチドが所望のコンホメーションで安定するよう、少なくとも一つのジスルフィド結合を当該ポリペプチドに導入するステップを含む。一の好適な実施態様では、前記ジスルフィド結合は、ポリペプチドのアミノ酸配列に少なくとも一つのシステイン置換を導入することにより

50

、形成される。別の実施態様では、前記ジスルフィド結合のC 炭素間の距離が、3.00乃至8.09オングストロームの範囲内である。別の実施態様では、前記ジスルフィド結合のC 炭素間の距離が、3.41乃至7.08オングストロームの範囲内である。

【0013】

コンピュータ・デザインを利用して、あるタンパク質又はポリペプチドに、その分子が所望のコンホメーションで安定するようジスルフィド結合を導入することができる。従って、ある所望のタンパク質コンホメーションに特異的な抗体又は小分子治療薬を同定することができる。

【0014】

本発明の方法は、インテグリンサブユニット、小型Gタンパク質、ヘテロ三量体Gタンパク質アルファサブユニット、チロシンキナーゼ、Gタンパク質共役受容体、アロステリック調節を受ける酵素、チモーゲン、補体C3、補体C4、及びフィブリノーゲンを含め、二つの異なる三次元コンホメーションで存在する多種の生物学的かつ薬学的に重要なタンパク質に幅広く応用できる。ある好適な実施態様では、当該ポリペプチドはインテグリンI-ドメインポリペプチドである。

10

【0015】

別の局面では、本発明は、少なくとも一つのジスルフィド結合を導入することによって所望のコンホメーションで安定させた改変インテグリンI-ドメインポリペプチドを提供する。実施態様の一つでは、改変インテグリンI-ドメインは、ジスルフィド結合が形成されるよう野生型配列に比較して少なくとも一つのシステイン置換を含有したアミノ酸配列にコードされている。別の実施態様では、システインに置換する残基のC 炭素間の距離は、3.00乃至8.09オングストロームの範囲内である。さらに別の実施態様では、ジスルフィド結合中のC 炭素間の距離は、3.41乃至7.08オングストロームの範囲内である。

20

【0016】

一の実施態様では、本発明の改変インテグリンI-ドメインポリペプチドは、例えば 1、2、10、11、D、E、L(CD11a)、M(CD11b)、及びX(CD11c)など、インテグリンサブユニットのI-ドメインから誘導される。例えば、本発明の一実施態様では、改変インテグリンI-ドメインポリペプチドは、ヒトLサブユニットのI-ドメインから誘導され、アミノ酸置換K287C/K294C、E284C/E301C、L161C/F299C、K160C/F299C、L161C/T300C、又はL289C/K294Cを含有する。本発明の別の実施態様では、改変インテグリンI-ドメインポリペプチドは、ヒトMサブユニットのI-ドメインから誘導され、アミノ酸置換Q163C/Q309C、D294C/Q311C、又はQ163C/R313Cを含有する。

30

【0017】

一の好適な実施態様では、本発明の改変インテグリンI-ドメインポリペプチドは、開いたコンホメーションで安定している。別の実施態様では、本発明の改変インテグリンI-ドメインポリペプチドは、閉じたコンホメーションで安定している。別の実施態様では、改変インテグリンI-ドメインは、リガンドに高親和結合する。さらに別の実施態様では、改変インテグリンI-ドメインポリペプチドは、異種ポリペプチドに作動的に連結している。

【0018】

関連する一の局面では、本発明は、本発明の改変インテグリンI-ドメインポリペプチドをコードする単離された核酸分子を提供する。

40

【0019】

本改変インテグリンI-ドメインポリペプチド、及び/又は、その生物学的活性もしくは抗原性を有するフラグメントは、例えば、インテグリンが媒介する疾患の治療及び/又は診断に利用できる検定用試薬又は標的などとして、有用である。

【0020】

従って、ある局面では、本発明は、開いたコンホメーションの改変インテグリンI-ドメインに選択的に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントを提供する。別の局面では、本発明は、開いたコンホメーションのインテグリンI-ドメインポリペプチド、閉じたコンホメーションのインテグリンI-ドメインポリペプチド、又は、改変インテグリンI-ドメイン

50

ポリペプチド、に選択的に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントを提供する。一の実施態様では、本抗体は、インテグリンI-ドメイン上にある活性化特異的エピトープに結合する。別の実施態様では、本抗体はインテグリンとコグネイト・リガンドとの間の相互作用を阻害するものである。実施態様の一つでは、本抗体は、開いたもしくは閉じたコンホメーションのLFA-1ポリペプチド、又は改変LFA-1 I-ドメインインテグリンポリペプチド、又はそのフラグメント、と反応又は結合する抗LFA-1抗体など、抗LFA-1抗体又はその抗原結合フラグメントである。

#### 【0021】

別の局面では、本発明は、開いたコンホメーションで安定させた改変インテグリンI-ドメインポリペプチドに対するテスト化合物の結合能を検定するステップを含む、インテグリン活性のモジュレータを同定する方法を提供するものである。別の実施態様では、本発明は、インテグリンとコグネイト・リガンドとの間の相互作用を修飾することのできる化合物を同定する方法を提供し、この方法では、開いたコンホメーションで安定させた改変インテグリンI-ドメインポリペプチドに対するリガンドの結合が、テスト化合物の存在下及び非存在下で検定される。

10

#### 【0022】

別の局面では、本発明は、改変インテグリンI-ドメインポリペプチド又は抗インテグリンI-ドメイン抗体（又はその抗原結合フラグメント）を含んで成る組成物を提供するものであり、このような組成物には、さらに薬学的に許容可能な担体を含めることができる。

#### 【0023】

さらに別の局面では、本発明は、対象においてインテグリン媒介疾患（例えば炎症性又は自己免疫疾患）を治療又は予防する方法、又は、対象においてコグネイト・リガンドに対するインテグリンの結合を阻害する方法、に関するものであり、このとき本方法は、開いたコンホメーションで安定させた改変インテグリンI-ドメインポリペプチド、又は、開いたコンホメーションのインテグリンI-ドメインに選択的に結合する抗体（又はその抗原結合フラグメント）を、対象に治療上有効量、投与するステップを含む。一実施態様では、本抗体は、開いたコンホメーションのLFA-1 I-ドメインと特異的に反応もしくは結合する、又は、改変LFA-1 I-ドメインポリペプチドと特異的に反応もしくは結合する、LFA-1抗体又はその抗原結合フラグメントである。ある好適な実施態様では、本改変インテグリンI-ドメインポリペプチドは、リガンドに高親和結合する。別の好適な実施態様では、治療用の本改変インテグリンI-ドメインポリペプチドは、例えば融合タンパク質などの可溶性ポリペプチドである。

20

30

#### 【0024】

本発明の他の特徴及び長所は、以下の詳細な説明及び請求項から明白となるであろう。

#### 【0025】

##### 発明の詳細な説明

本発明は、少なくとも部分的には、あるポリペプチドに少なくとも一つのジスルフィド結合を導入することにより、前記ポリペプチドを所望のコンホメーションで安定させる方法に基づくものである。一実施態様では、特定のタンパク質コンホメーションのNMR又は結晶構造に基づき、コンピュータ・デザインを利用して、前記タンパク質を特定のコンホメーションで固定するようなジスルフィド結合を導入する。ここで用いる「コンホメーション」又は「コンホーマ」とは、タンパク質の三次元構造を言う。「所望の」コンホメーションには、当該ポリペプチドの特定の使用に役立つようなタンパク質コンホメーションがあり、例えば、特定の生物学的機能及び/又は活性、又は治療効果を支えるようなコンホメーションである。ここで用いる用語「ポリペプチド」及び「タンパク質」は全体的に交換可能に用いられている。

40

#### 【0026】

ある実施態様では、所望のコンホメーションは、例えば開いたもしくは活性なコンホメーションなど、生物学的機能及び/又は活性を促進又は活性化するようなタンパク質コンホメーションである。別の実施態様では、所望のコンホメーションとは、例えば閉じた又は

50

不活性のコンホメーションなど、生物学的機能及び/又は活性を阻害又は抑制するようなタンパク質コンホメーションである。

【0027】

具体的には、本発明の方法は、あるタンパク質又はその機能ドメインを、前記タンパク質の所望の三次元構造のテンプレート上でモデル化するステップと、所望のコンホメーションの前記タンパク質上でのみ、ジスルフィド結合を形成できるシステインを導入することで、その特定のコンホメーションで前記タンパク質を安定させるステップと、を含む。ここでのタンパク質は、三次元構造が公知であるか、又は生成できれば、いかなるタンパク質又はそのドメインでもよいが、好ましくは、二つの異なるコンホメーションで存在するタンパク質であるとよい。タンパク質コンホメーションをデザイン及び/又はモデル化するためのコンピュータ・アルゴリズムは、例えばWO 98/47089に記載されている。SSBONDプログラム(Hazes, B and Dijkstra, BW (1988) Protein Engineering 2:119-125)を用いると、適当な位置にある残基対をシステインに変異させることで、あるタンパク質構造にジスルフィド結合を導入できる位置を特定することができる。

10

【0028】

ジスルフィド結合の形成は、あるポリペプチドの三次元構造内で適当な位置にある二つのシステイン残基同士の間で起きる。本発明の一実施態様では、ジスルフィド結合が形成されるよう、少なくとも一つのシステイン置換をアミノ酸配列に導入することにより、ポリペプチドを所望のコンホメーションで安定させる。ポリペプチドの天然アミノ酸配列中に、ジスルフィド結合を形成するのに適当な位置に既に一つのシステイン残基が存在している場合には、一箇所においてシステイン置換が行われる。好適な一実施態様では、ポリペプチドのアミノ酸配列中、ジスルフィド結合の形成が可能な位置で、二箇所のシステイン置換を導入して、このポリペプチドを所望のコンホメーションで安定させる。別の実施態様では、システインに置換する残基のC 炭素間の距離は3.00乃至8.09オングストロームである。さらに別の実施態様では、当該ジスルフィド結合中のC 炭素間の距離は3.41乃至7.08オングストロームの範囲内である。

20

【0029】

本発明の一実施態様では、タンパク質が特定のコンホメーションで安定するようにジスルフィド結合の形成が一のタンパク質コンホメーションでのみ優先的に起きるよう、システイン置換を導入する。

30

【0030】

システイン置換の導入による本発明の改変ポリペプチドの調製は、好ましくは、目的のポリペプチド(例えばインテグリンポリペプチド)をコードするDNAの変異誘発によって行われる。例えば、コードされたタンパク質に、一箇所又はそれ以上のアミノ酸置換、例えばシステイン置換、が導入されるよう、インテグリン遺伝子のヌクレオチド配列に一箇所又はそれ以上のヌクレオチド置換を導入することで、改変インテグリンI-ドメインポリペプチドをコードする単離された核酸分子を作製することができる。例えば部位指定変異誘発法及びPCR媒介変異誘発法など、標準的な技術により、変異を核酸配列に導入することができる。

【0031】

適したタンパク質には、限定はしないが、産業上及び治療上重要なタンパク質、例えば1) 小型Gタンパク質、三量体Gタンパク質アルファサブユニット、チロシンキナーゼ、及びGタンパク質共役受容体などのシグナリング分子、2) アロステリック調節を受ける酵素、3) タンパク質開裂による活性化後にコンホメーションが変化するチモーゲン、例えば補体及び凝固カスケードのプロテアーゼ(コンパターゼ及び因子)及び4) 補体成分C3及びC4やフィブリノーゲンなどのタンパク質分解により活性化するエフェクター分子、がある。一の実施態様では、例えば「開いた」コンホメーションなど、酵素活性があるか、又は、リガンド結合能及び/又はエフェクター機能を有するようなコンホメーションなど、生物学的に活性なコンホメーションでタンパク質を安定させることに本発明の方法を利用できる。別の実施態様では、例えば「閉じた」コンホメーションなど、酵素として不

40

50

活性であるか、又は、リガンド結合能及び/又はエフェクター機能を持たないようなコンホメーションなど、生物学的に不活性なコンホメーションでタンパク質を安定させることに本発明の方法を利用できる。

#### 【0032】

特定のコンホメーションで安定させたタンパク質は、例えば、プロテオーム・スクリーニング・テクノロジーなどに、用途があるであろう。組織及び疾患状態のプロテオーム・スクリーニングでは、活性なタンパク質コンホーマ又は不活性なタンパク質コンホーマなどに特異的な抗体、ポリペプチド及び/又は小分子を、様々な細胞シグナリング経路、代謝経路及び接着経路の活動を評価するのに利用できる。こうして、特定の疾患と、特定の生化学的経路及びシグナリング経路との間の関連性を見出すことができる。さらに本発明は、ここに解説した方法を用いて同定されたポリペプチド、抗体、及び小分子や、炎症性疾患などを治療するなど、同ポリペプチド、抗体、及び小分子の用途にも関するものである。コンホーマ特異的な試薬をチップに載せて、組織抽出物をスクリーニングするのに用いたり、又は組織切片を染色するのににも利用できる。さらに、開いたコンホーマ又は閉じたコンホーマなどの特定のコンホーマに対して選択的な薬物又は抗体、例えば改変LFA-1 Iドメインポリペプチドを特異的に認識する抗LFA-1抗体などの改変インテグリンIドメインポリペプチドを特異的に認識する抗インテグリン抗体など、は、示差的な治療効果をもたらすであろう。従って、特定のコンホーマで安定させたタンパク質を用いた選択的スクリーニングアッセイを利用すれば、所望の活性を持つ化合物を合理的に得ることができる。

#### 【0033】

##### インテグリン

インテグリンは、リガンドを結合させない不活性なコンホメーションで細胞表面上に存在する。細胞が活性化すると、インテグリンは形(コンホメーション)を変えてリガンドを結合させるようになる。体内のすべての細胞で、選択的に発現する様々なインテグリンヘテロ二量体(及びサブユニットの組合せが異なる)は20種を超える。活性化後、インテグリンは、細胞外マトリックス中の、又は、凝固もしくは補体カスケード中で凝集した他の細胞表面上のタンパク質リガンドに特異的に結合する。白血球上のインテグリンは、白血球の遊出や炎症及び免疫応答において中心的な重要性を持つ。白血球インテグリンMac-1(M<sub>2</sub>)のリガンドには、炎症関連細胞表面分子ICAM-1、補体成分iC3b、及び凝固成分フィブリノーゲン、がある。白血球インテグリンLFA-1(L<sub>2</sub>)のリガンドには、ICAM-1、ICAM-2、及びICAM-3、がある。白血球インテグリンに対する抗体は、細胞対細胞の相互作用や細胞対細胞外マトリックスの相互作用を、阻害するなど修飾するなどにより、多種の炎症性疾患及び自己免疫疾患を遮断することができる。血小板上のインテグリンは凝固及び心疾患で重要であり、認可薬には、抗体アブシキシマブ(Reopro<sup>TM</sup>)及びペプチド様アンタゴニスト、エプティフィバチド(Integrilin<sup>TM</sup>)がある。結合組織細胞、上皮細胞及び内皮細胞上のインテグリンは、これらの細胞に影響する疾患状態で重要である。これらは細胞成長、分化、創傷治癒、線維症、アポトーシス、及び脈管形成を調節する。癌細胞上のインテグリンは、浸潤及び転移を調節する。

#### 【0034】

インテグリンに拮抗するには、活性化したリガンド結合性コンホメーションに結合する薬物が必要である。大半の抗体は活性及び不活性のコンホメーションの両方に結合する。なぜなら、インテグリン分子の表面上のごく小さな部分しか形が変わらないからである。不活性なコンホメーションに結合すると、副作用が起きたり、抗イディオタイプ抗体が生成されたり、抗体のクリアランスが起きて、投与量を増やしたりしなければならぬため、「開いた」コンホメーションなどの活性なインテグリンコンホメーションにのみ、抗体が結合するのが好ましい。

#### 【0035】

ここに記載した方法は、ジスルフィド結合を、LFA-1及びMac-1などのインテグリンのIドメインに導入するのに用いられ、成功を収めている。従って、別の局面では、本発明は、

10

20

30

40

50

改変I-ドメインポリペプチドが所望のコンホメーションで安定するように少なくとも一つのジスルフィド結合を含有する改変インテグリンI-ドメインポリペプチドを提供するものである。本発明の改変インテグリンI-ドメインポリペプチドは、1、2、10、11、D、E、L(CD11a)、M(CD11b)及びX(CD11c)などのインテグリンサブユニットのI-ドメインから誘導することができる。

**【0036】**

ここで用いる「改変インテグリンI-ドメインポリペプチド」又は「改変インテグリンポリペプチド」には、少なくとも一つのジスルフィド結合が当該ポリペプチドに導入されたことで、当該I-ドメインが所望のコンホメーションで安定しているように、野生型配列、即ち天然状態に比べて変更されたインテグリンI-ドメインポリペプチドが含まれる。

10

**【0037】**

ここで交換可能に用いられた用語「誘導された」又は「誘導体」とは、ある配列が、天然に存在する配列などの別の配列と同一であるか、又は、このような別の配列から改変されていることを意味することを意図している。本発明の範囲内の誘導体には、ポリヌクレオチド誘導体及びポリペプチド誘導体が含まれる。ポリペプチド誘導体又はタンパク質誘導体には、アミノ酸配列が記述済みもしくは公知であるか、又は配列に関係しない方法で記述済みもしくは公知である、あるいはこれらの両方である、ような配列とは異なるが、当該ポリペプチド又はタンパク質の活性が残っているようなポリペプチド又はタンパク質配列が含まれる。一つ又はそれ以上のアミノ酸を異なる天然アミノ酸、アミノ酸誘導体又は非天然アミノ酸に置換した場合、アミノ酸配列での誘導体が生成される。いくつかの実施態様では、タンパク質誘導体には、一つ又はそれ以上の保存的アミノ酸置換がある点で、野生型配列とは配列が異なるが、当該タンパク質又はペプチドの二次構造又は疎水性に与えた影響は概ね最小限であるような天然発生型のポリペプチドもしくはタンパク質又はその生物学的に活性なフラグメントが包含される。さらに誘導体は、当該ポリペプチド又はタンパク質の生物学的活性を損なわないような一つ又はそれ以上の非保存的アミノ酸置換、欠失又は挿入がある点で異なる配列を含んでいてもよい。

20

**【0038】**

保存的置換（置換基）には、典型的に、類似の特徴（例えば電荷、大きさ、形状、及び他の生物学的性質）を持つ別のアミノ酸に一個のアミノ酸を置換することが含まれる。例えば以下のグループ：バリン、グリシン；グリシン、アラニン；バリン、イソロイシン；アスパラギン酸、グルタミン酸；アスパラギン、グルタミン；セリン、スレオニン；リシン、アルギニン；及びフェニルアラニン、チロシン；同士の置換である。非極性（疎水性）のアミノ酸には、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン及びメチオニンがある。極性の中性のアミノ酸にはグリシン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン及びグルタミンがある。正に耐電した（塩基性）アミノ酸には、アルギニン、リシン及びヒスチジンが含まれる。負に耐電した（酸性）アミノ酸にはアスパラギン酸及びグルタミン酸が含まれる。

30

**【0039】**

他の実施態様では、比較的保存的でないアミノ酸置換を持つ誘導体により、例えば電荷、コンホメーション及び他の生物学的性質に変化を起こすなどにより、所望の誘導体が得られることもある。このような置換には、例えば、親水性残基を疎水性残基に換える置換、システイン又はプロリンを別の残基に換える置換、小さな側鎖を有する残基を大型の側鎖を有する残基に換える置換、又は、実効正電荷を有する残基を実効負電荷を有する残基に換える置換、があるであろう。ある置換を行った結果を確実に予測できない場合、ここに開示した方法により、所望の特徴の有無を調べれば、その誘導体を容易に検定できよう。さらに本発明のポリペプチド及びタンパク質に、保存的又は非保存的のいずれにしろ、例えば挿入、欠失及び置換などの多種の変更を行うとそれらの使用時に有利である場合、このような改変を行ってもよい。

40

**【0040】**

ある好適な実施態様では、改変インテグリンI-ドメインポリペプチドは開いたコンホメー

50

ションで安定させてあり、高い親和性でリガンドを結合させる。

【0041】

一実施態様では、本発明の改変インテグリンI-ドメインポリペプチドは、野生型配列に比較して少なくとも一つのシステイン置換、そして好ましくは二つのシステイン置換、を含有するアミノ酸配列にコードされている。別の実施態様では、システインに置換する残基のC 炭素間の距離は、例えばタンパク質モデリングで予測したときなどに、3.00乃至8.09オングストロームの範囲内である。更なる実施態様では、ジスルフィド結合中のC 炭素間の距離は、3.41乃至7.08オングストロームの範囲内である。

【0042】

I-ドメインポリペプチドのアミノ酸配列中の適当な位置にシステイン残基を導入すると、例えば活性な「開いた」コンホメーションや、又は、不活性な「閉じた」コンホメーションなど、特定のコンホメーションでこのドメインを安定させるジスルフィド結合を形成させることができる。例えば、 L K287C/K294C、E284C/E301C、L161C/F299C、K160C/F299C、L161C/T300C、及びL289C/K294C 変異型、及び M Q163C/Q309C 及びD294C/Q311C 変異型は、高いもしくは中程度の親和性でリガンドを結合させる「開いた」コンホメーションで安定しているが、 L L289C/K294C 変異型及び M Q163C/R313C 変異型は、リガンドを結合させない不活性即ち「閉じた」コンホメーションで安定し、一方でE284C/E301Cの親和性は、高親和性など、K287C/K294Cのそれにほぼ匹敵する。L161C/F299C、K160C/F299C、及びL161C/T300Cの親和性は、野生型よりも有意に高いが、高親和性 L I-ドメイン、K 287C/K294Cの20乃至30分の1である。L161C/F299C、K160C/F299C、及びL161C/T300Cをここでは中間親和性 L I-ドメインと呼ぶ。

【0043】

一の実施態様では、本発明は、インテグリン サブユニット内に構成され、さらにインテグリン サブユニットと結合され得る改変インテグリンI-ドメインを提供するものである。別の実施態様では、本発明の改変インテグリンI-ドメインポリペプチドは可溶性ポリペプチドである。さらに本発明は、異種ポリペプチドに作動的に連結された改変インテグリンI-ドメインポリペプチドを提供する。

【0044】

実験データ(Huang, C et al. (2000) J Biol Chem 275:21514-24) で裏付けられたインテグリン I-サブユニットのI-様ドメインのモデルも作製されている。このデータは、Iドメイン中で劇的な10オングストロームのコンホメーション上の移動を行う重要なC末端ヘリックスの位置を確認している。Iドメイン及びI-様ドメインのこの領域でのアラジメントは良好である。従って、別の局面では、本発明は、改変I-様ドメインポリペプチドを所望のコンホメーションで安定させるように、少なくとも一つのジスルフィド結合を含有させた改変インテグリンI-様ドメインポリペプチドを提供する。

【0045】

ある好適な実施態様では、改変インテグリンI-様ドメインポリペプチドは、開いたコンホメーションで安定しており、高い親和性でリガンドを結合させる。実施態様の一つでは、本発明の改変インテグリンI-様ドメインポリペプチドは、野生型配列に比較して少なくとも一つのシステイン置換、そして好ましくは二つのシステイン置換、を含有するアミノ酸配列にコードされている。

【0046】

ある実施態様では、本発明は、インテグリン サブユニット内に構成され、さらにインテグリン サブユニットと結合され得る改変インテグリンI-様ドメインを提供するものである。別の実施態様では、本発明の改変インテグリンI-様ドメインポリペプチドは可溶性ポリペプチドである。さらに本発明は、異種ポリペプチドに作動的に連結された改変インテグリンI-様ドメインポリペプチドを提供する。

【0047】

インテグリンは数多くの疾患で鍵となるターゲットである。よって、本発明における分離された高親和I-ドメインや、活性化した白血球インテグリンに対して選択的な抗体又は小

10

20

30

40

50

分子アンタゴニストを利用すると、自己免疫及び炎症性疾患、移植片拒絶、及び、血液量減少性ショック、心筋梗塞及び脳ショックの場合の虚血性/再灌流傷害を、阻害又は防止するなど、修飾することができる。さらに、天然のリガンドに結合させた高親和ドメインの共結晶、及び/又は、小分子アンタゴニストを容易に生成でき、またこのような再結晶及び小分子アンタゴニストは、コンピュータ・ドラッグ・デザインを可能にし、薬物開発候補の改良及び向上に進展をもたらすであろう。

【0048】

従って、本発明は、開いたコンホメーションで安定させた改変インテグリンI-ドメインポリペプチドに対するテスト化合物の結合能を検定するステップを含む、インテグリン活性のモジュレータを同定する方法を提供する。別の実施態様では、本発明は、インテグリンとコグネイト・リガンドとの間の相互作用を修飾することのできる化合物を同定する方法を提供し、当該方法では、開いたコンホメーションで安定させた改変インテグリンI-ドメインポリペプチドに対するリガンドの結合を、テスト化合物の存在下及び非存在下で検定する。

10

【0049】

さらに本発明は、改変インテグリンI-ドメインポリペプチドか、又は、開いたコンホメーションのI-ドメインなどの改変インテグリンI-ドメインに選択的に結合する高LFA-1抗体（又はその抗原結合フラグメント）などの抗インテグリン抗体と、薬学的に許容可能な担体と、を含んで成る組成物を提供する。本発明の組成物は、本発明の治療法に用いられる。例えば本発明は、対象においてインテグリンが媒介する疾患（例えば炎症性又は自己免疫性疾患）を治療又は予防する方法、又は、対象においてコグネイト・リガンドに対するインテグリンの結合を阻害する方法を提供し、当該方法は、開いたコンホメーションで安定させた改変インテグリンI-ドメインポリペプチドか、又は、開いたコンホメーションのインテグリンI-ドメインに選択的に結合する抗インテグリン抗体（又はその抗原結合フラグメント）、を、治療上有効量、投与するステップを含む。ある好適な実施態様では、本改変インテグリンI-ドメインポリペプチドは、リガンドに高親和結合する。別の好適な実施態様では、治療用の本改変インテグリンI-ドメインポリペプチドは、融合タンパク質などの可溶性ポリペプチドである。

20

【0050】

ここで用いる場合の、インテグリンが媒介する疾患には、例えば炎症性もしくは免疫系疾患、及び/又は、細胞増殖性疾患がある。インテグリンが媒介する疾患の例には、心筋梗塞、卒中、再狭窄、移植片拒絶、移植片対宿主疾患又は宿主対移植片疾患、及び再灌流傷害、がある。炎症性又は免疫系疾患には、限定はしないが、成人呼吸窮迫症候群（ARDS）、敗血症又は外傷に続発する多臓器傷害症候群、ウイルス感染、炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、クローン病、白血球接着欠陥II症候群、熱損傷、血液透析、白血球搬出、腹膜炎、慢性閉塞性肺疾患、肺炎、喘息、急性虫垂炎、急性炎症成分を伴う皮膚病、創傷治癒、敗血症性ショック、急性腎炎、腎炎、アミロイド症、反応性関節炎、リウマチ性関節炎、慢性気管支炎、シェーグレン症候群、サルコイドーシス、強皮症、狼瘡、多発性筋炎、ライター症候群、乾癬、皮膚炎、骨盤炎症疾患、炎症性乳房疾患、眼窩炎症性疾患、免疫不全疾患（例えばHIV、後天性免疫不全、先天性X染色体小児性低ガンマグロブリン血症、一過性低ガンマグロブリン血症、選択性免疫グロブリンA欠損症、壊死性小腸大腸炎、顆粒球輸血随伴性症候群、サイトカイン誘導性傷害、慢性粘膜皮膚カンジダ症、重症複合型免疫不全）、自己免疫疾患、及び急性化膿性髄膜炎又は他の中枢神経系炎症疾患、がある。

30

40

【0051】

「細胞増殖性疾患」には、細胞の増殖、活性化、接着、成長、分化、又は移動のプロセスに影響を与える疾患が含まれる。ここで用いる場合の「細胞の増殖、活性化、接着、成長、分化、又は移動のプロセス」とは、細胞が数、大きさ、活性化状態、又は内容量を増すプロセス、細胞が他の細胞のそれとは異なる一組の特化した特徴を生ずるプロセス、又は、細胞が特定の位置又は刺激に近寄る又は遠ざかるプロセス、である。疾患は、成長、活

50

性化、接着、分化、又は移動の調節異常を特徴とする。このような疾患には、癌、例えば癌腫、肉腫、リンパ腫又は白血病があるが、その例には、限定はしないが、例えば乳房、子宮内膜、卵巣、子宮、肝臓、胃腸管、前立腺、結腸直腸、及び肺の癌、黒色腫、神経線維腫、腺腫様多発結腸ポリープ、ウィルムス腫瘍、腎芽細胞腫、奇形腫、横紋筋肉腫；腫瘍の浸襲、脈管形成及び転移；骨格形成異常；造血系及び/又は骨髄増殖性疾患、がある。

【 0 0 5 2 】

本発明の多様な局面を、以下の小節でさらに詳述することとする。

【 0 0 5 3 】

改変インテグリンI-ドメインポリペプチド及び抗インテグリンI-ドメイン抗体

10

本発明の方法は、分離された改変インテグリンポリペプチド、及びその生物学的活性部分の使用を包む。ここで用いる場合の改変インテグリンポリペプチドは、改変I-ドメインポリペプチド及び改変I-様ドメインポリペプチドを包含する。本発明の改変インテグリンポリペプチドは、それぞれインテグリン 又は サブユニットポリペプチド内に構成された改変インテグリンI-ドメイン及びI-様ドメインポリペプチド；可溶性の改変インテグリンI-ドメイン及びI-様ドメインポリペプチド；及び、融合タンパク質など、異種ポリペプチドに作動的に連結された改変インテグリンI-ドメイン及びI-様ドメインポリペプチド、を包含するものである。

【 0 0 5 4 】

多数のヒトインテグリン 及び サブユニットポリペプチドの c D N A のクローンが作製され、配列決定されて、そのポリペプチド配列が決定されている（例えばジェンバンク登録番号：NM\_002203 ( 2)、AF112345 ( 10)、NM\_012211 ( 11)、NM\_005353 ( D)、NM\_002208 ( E)、NM\_000887 ( X)、NM\_000632 ( M)、NM\_002209 ( L)、X68742 及び P56199 ( 1)、NM\_000211 ( 2)、NM\_000212 ( 3)、NM\_002214 ( 8)を参照されたい)。具体的には、ヒト L及び Mをコードするポリペプチド配列を、それぞれSEQ ID NO:2 (ジェンバンク登録番号P20701)及びSEQ ID NO:4 (ジェンバンク登録番号P11215)に記載してある。加えて、他の種由来のインテグリン 及び サブユニットポリペプチドをコードする配列も、当該技術分野において入手できる。さらに、前述したように、M、L、1及び 2 のI-ドメインの三次元構造が解明されている(Lee, J-O, et al. (1995) Structure 3:1333-1340; Lee, J-O, et al. (1995) Cell 80:631-638; Qu, A and Leahy, DJ (1995) Proc Natl Acad Sci USA 92:10277-10281; Qu, A and Leahy, DJ (1996) Structure 4:931-942; Emsley, J et al. (1997) J Biol Chem 272:28512-28517; Baldwin, ET et al. (1998) Structure 6:923-935; Kallen, J et al. (1999) J Mol Biol 292:1-9)。

20

30

【 0 0 5 5 】

本発明の分離された改変インテグリンポリペプチドは、好ましくは、天然インテグリンポリペプチドのアミノ酸配列に充分同一であるが、当該ポリペプチドを所望のコンホメーションで安定させるジスルフィド結合が形成されるよう、少なくとも一つ、そして好ましくは二つのシステイン置換を含むようなアミノ酸配列を有するとよい。ここで用いる用語「充分同一である」とは、あるアミノ酸（又はヌクレオチド）配列が、インテグリンアミノ酸（又はヌクレオチド）配列と同一又は同等（例えば類似の側鎖を有するアミノ酸残基など）アミノ酸残基（又はヌクレオチド）を充分もしくは最小限の数、含有する結果、これらポリペプチドが天然インテグリンポリペプチドと共通の構造ドメイン又はモチーフ、及び/又は共通の機能的活性を有することを言う。例えば、少なくとも30%、40%、又は50%、好ましくは60%、より好ましくは70%、75%、80%、85%又は90%、91%、92%、93%、94%、95%又はそれより大きい同一性を有し、（例えばここに解説した通りの改変インテグリンI-ドメイン又はI-様ドメインの活性など）共通の機能的活性を有するアミノ酸又はヌクレオチド配列が、充分に同一である、とここに定義しておく。インテグリンI-ドメインポリペプチドは、天然のアレルの違い又は変異誘発のために、ここに開示したインテグリンポリペプチドとはアミノ酸配列が異なることもある。

40

50

## 【0056】

二つのアミノ酸配列又は二つの核酸配列のパーセント同一性を決定するには、最適な比較が行えるように、これら配列をアライメントする（最適なアライメントを行うには第一及び第二のアミノ酸又は核酸配列の一方又は両方にギャップを導入してもよく、同一でない配列は、比較を目的にしたときは無視してもよい）。ある好適な実施態様では、基準配列のうちで比較用にアライメントする長さは、基準配列の長さの少なくとも30%、好ましくは少なくとも40%、より好ましくは少なくとも50%、さらにより好ましくは少なくとも60%、そしてさらにより好ましくは少なくとも70%、80%、又は90%である。次に、対応するアミノ酸位置又はヌクレオチド位置にあるアミノ酸残基又はヌクレオチドを比較する。第一の配列中のある一つの位置に、第二の配列中の対応する位置にあるのと同じアミノ酸残基又はヌクレオチドが来ていれば、それら分子はその位置において同一であることになる（ここで用いる場合のアミノ酸又は核酸の「同一性」は、アミノ酸又は核酸の「ホモロジー」と同等である）。二つの配列間のパーセント同一性は、これら二つの配列を最適にアライメントするのに導入せねばならないギャップの数、及び各ギャップの長さを考慮に入れたときの、これら配列に共通の同一位置の数の関数である。

10

## 【0057】

二つの配列間の配列の比較及びパーセント同一性の決定は、数学的アルゴリズムを用いて行うことができる。ある好適な実施態様では、二つのアミノ酸配列間のパーセント同一性を、GCGソフトウェア・パッケージ（<http://www.gcg.com>で入手できる）のGAPプログラムに組み込まれたニードルマン及びワンシュ（*J. Mol. Biol.* (48):444-453 (1970)）のアルゴリズムを用い、Blossom 62 行列又はPAM250行列を用いて、ギャップ・ウェイトを16、14、12、10、8、6、又は4にし、レングス・ウェイトを1、2、3、4、5、又は6にして、決定する。さらに別の好適な実施態様では、二つのヌクレオチド配列間のパーセント同一性を、GCGソフトウェア・パッケージ（<http://www.gcg.com>で入手できる）のGAPプログラムを用い、NWSgapdna.CMP 行列を用いて、ギャップ・ウェイトを40、50、60、70、又は80にし、そしてレングス・ウェイトを1、2、3、4、5、又は6にして決定する。別の実施態様では、二つのアミノ酸又はヌクレオチド配列間のパーセント同一性を、ALIGNプログラム（バージョン2.0）に組み込まれた E. マイヤース及びW. ミラーのアルゴリズム（*Comput. Appl. Biosci.*, 4:11-17 (1988)）を用い、PAM120 ウェイト残基表を用いて、ギャップ・レングス・ペナルティを12、そしてギャップ・ペナルティを4にして、決定する。

20

30

## 【0058】

ここで用いる場合の、ある改変インテグリンポリペプチド（例えば改変インテグリンI-ドメインポリペプチド）の「生物学的活性部分」とは、改変インテグリンポリペプチドの活性を保持した改変インテグリンポリペプチドのフラグメントを包含するものである。典型的には、改変インテグリンポリペプチドの生物学的活性部分は、リガンド結合など、改変インテグリンポリペプチドの少なくとも一つの活性を持つ少なくとも一つのドメイン又はモチーフを含んで成るものである。ある好適な実施態様では、改変インテグリンポリペプチドの生物学的活性部分には、改変インテグリンI-ドメインポリペプチドが含まれる。改変インテグリンポリペプチドの生物学的活性部分は、改変インテグリンポリペプチドのアミノ酸配列と充分同一もしくはそれに由来するアミノ酸配列を含んで成り、完全長改変インテグリンポリペプチドよりも少ないアミノ酸を含有し、改変インテグリンポリペプチドの少なくとも一つの活性を呈するであろう。改変I-ドメイン又はI-様ドメインなど、改変インテグリンポリペプチドの生物学的活性部分は、リガンド結合、細胞間接着や、細胞と細胞外マトリックスの接着などの接着、及び/又は、シグナリング活性などのインテグリンポリペプチド活性を修飾する薬剤を開発するためのターゲットとして利用できる。改変インテグリンポリペプチドの生物学的活性部分は、遺伝子組換え技術で調製でき、かつ、改変インテグリンポリペプチドの機能的活性の一つ以上について評価できる一ポリペプチドを含んで成る。

40

## 【0059】

ある好適な実施態様では、改変インテグリンポリペプチドは、組換えDNA技術で調製さ

50

れる。例えば、改変インテグリンポリペプチド（例えばI-ドメインポリペプチド又は可溶性I-ドメイン融合たんぱくなど）をコードするポリヌクレオチド配列をトランスフェクトした宿主細胞から、標準的なタンパク質精製技術を用いた、適当な精製スキームを利用して改変インテグリンポリペプチドを単離することができる。組換え発現の代わりに、標準的なペプチド合成技術を利用して改変インテグリンポリペプチドを化学合成することもできる。

#### 【0060】

「単離された」または「精製された」ポリペプチド又はタンパク質、あるいはその生物学的活性部分は、改変インテグリンI-ドメインポリペプチドが由来する細胞源などのソースにある細胞性物質又は他の夾雑タンパク質を実質的に含まないか、あるいは、化学合成した場合には前駆化学物質又は他の化学物質を実質的に含まないものである。「細胞性物質を実質的に含まない」という文言は、当該タンパク質が、それが単離もしくは組換え生産された基の細胞の細胞成分から分離されているような、改変インテグリンポリペプチドの調製品を包含するものである。一実施態様では、「細胞性物質を実質的に含まない」という文言は、（未改変のインテグリンポリペプチドここでは「夾雑タンパク質」とも言及された）を約30%未満（乾燥重量で）、より好ましくは、未改変のインテグリンポリペプチドを約20%未満、さらにより好ましくは未改変のインテグリンポリペプチドを約10%未満、そして最も好ましくは未改変のインテグリンポリペプチドを約5%有するような、改変インテグリンポリペプチドの調製品を包含する。改変インテグリンポリペプチド又はその生物学的活性部分を組換え生産した場合、培地を実質的に含まないことが好ましく、即ち、タンパク質調製品の体積のうちで培地の占める割合が、約20%未満、より好ましくは約10%未満、そして最も好ましくは約5%未満であるとよい。

#### 【0061】

「前駆化学物質又は他の化学物質を実質的に含まない」という文言は、当該タンパク質の合成に關与する前駆化学物質又は他の化学物質から当該タンパク質が分離されている、改変インテグリンポリペプチド調製品を包含する。一実施態様では、文言「前駆化学物質又は他の化学物質を実質的に含まない」は、約30%未満（乾燥重量で）の前駆化学物質又は未改変インテグリンポリペプチド化学物質、より好ましくは約20%未満の前駆化学物質又は未改変インテグリンポリペプチド化学物質、さらにより好ましくは約10%未満の前駆化学物質又は未改変インテグリンポリペプチド化学物質、そして最も好ましくは約5%未満の前駆化学物質又は未改変インテグリンポリペプチド化学物質、を有する改変インテグリンポリペプチドの調製品を包含する。

#### 【0062】

本発明の方法では、さらにキメラタンパク質又は融合タンパク質である改変インテグリンポリペプチドを使用してもよい。ここで用いる場合の改変インテグリン「キメラタンパク質」又は「融合タンパク質」は、異種ポリペプチドなどの未改変のインテグリンポリペプチドに作動的に連結させた改変インテグリンポリペプチドを含んで成る。ある好適な実施態様では、改変インテグリン融合タンパク質は、少なくとも一つのI-ドメイン又は一つのI-様ドメインを含んで成る。融合タンパク質内で、「作動的に連結させた」とは、当該改変インテグリンポリペプチドと、異種ポリペプチド配列とが、相互にインフレームで融合されていることを指すことを意図している。異種ポリペプチドは、改変インテグリンポリペプチドのN末端に融合させても、C末端に融合させてもよい。

#### 【0063】

例えば、ある好適な実施態様では、前記融合タンパク質は、例えば免疫グロブリン（例えばIgG1）のヒンジ、C1及びC2配列などのFc領域を、改変インテグリン配列のC末端に融合してある改変インテグリンI-ドメイン融合タンパク質である。インテグリン免疫グロブリンキメラは、基本的にはWO 91/08298に解説された通りに構築することができる。このような融合タンパク質があると、組換え改変インテグリンポリペプチドの精製が簡便となる。別の実施態様では、前記融合タンパク質は、当該融合タンパク質が細胞表面上に発現するよう、異種の膜貫通ドメインに融合してある改変インテグリンI-ドメインポリペプチド

10

20

30

40

50

である。

【0064】

本発明の改変インテグリンポリペプチド及び融合タンパク質を医薬組成物中に組み込み、対象にインビボで投与することもできる。ある実施態様では、開いた、リガンド結合型のコンホメーションで安定させた可溶性の改変インテグリンI-ドメインポリペプチドか、又はその融合タンパク質を、対象のインテグリン活性（例えばコグネイト・リガンドに対するインテグリンの結合）を修飾するのに利用され得る。別の実施態様では、可溶性の改変インテグリンI-ドメインポリペプチド又は融合タンパク質を、炎症性疾患や、自己免疫疾患などの免疫系の疾患を治療するのに利用できよう。別の実施態様では、可溶性改変インテグリンポリペプチド又は融合タンパク質を、細胞増殖性疾患を治療するのに利用できよう。さらに、可溶性改変インテグリンポリペプチド及び融合タンパク質の使用を利用して、ICAMなどインテグリンリガンドの生物学的利用能に影響を与えることもできる。

10

【0065】

さらに、本発明の改変インテグリンポリペプチド及び融合タンパク質を、対象において抗LFA-1抗体などの抗インテグリン抗体を産生させる免疫原として用いたり、インテグリン活性を修飾する分子、及び/又は、インテグリンリガンド又は受容体とのインテグリンポリペプチドの相互作用を修飾する分子、を同定するスクリーニング検定に用いることもできる。

【0066】

好ましくは、本発明の改変インテグリン融合タンパク質は、標準的な組換えDNA技術で作製される。例えば、連結に平滑末端又は付着末端を利用すること、制限酵素消化を行って適した末端にすること、付着末端を適宜充填すること、アルカリホスファターゼ処理して不要な接合を防ぐこと、酵素による連結を行うことなどの常法で異なるポリペプチド配列をコードするDNA断片を相互にインフレイムで連結する。別の実施態様では、自動化DNA合成装置を含む従来技術により、融合遺伝子を合成することもできる。代替的には、二本の連続した遺伝子断片の間に相補的な張り出し部を生ずるようなアンカー・プライマーを用いて遺伝子断片のPCR増幅を行い、その後これら断片をアニールし、再増幅してキメラ遺伝子配列を作製することもできる（例えばCurrent Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel et al. John Wiley & Sons: 1992を参照されたい）。さらに、最初から一融合成分（例えばGSTポリペプチド）をコードしている多くの発現ベクタが市販されている。このような融合成分が改変インテグリンポリペプチドにインフレイムで連結されるよう、改変インテグリンポリペプチドをコードする核酸をこのような発現ベクタ内にクローンすることもできる。

20

30

【0067】

さらに本発明の方法には、インテグリン・アゴニスト（ミメティック）又はインテグリン・アンタゴニストのいずれかとして機能する改変インテグリンポリペプチドの使用を含み得る。インテグリンポリペプチドのアゴニストには、天然発生型のインテグリンポリペプチドの生物学的活性と実質的に同じ活性を維持していても、又は、その一部分を維持していてもよい。インテグリンポリペプチドのアンタゴニストは、例えばインテグリン活性を競合的に修飾するなどにより、天然型のインテグリンポリペプチドの活性のうちの一つ又はそれ以上を阻害することができる。このように、所望のコンホメーションで安定させた改変インテグリンポリペプチドで処理すると、特定の生物学的効果を引き出すことができる。

40

【0068】

改変LFA-1ポリペプチドなどの分離された改変インテグリンポリペプチド、又はその一部分もしくはフラグメントを免疫原として用い、ポリクローナル及びモノクローナル抗体作製のための標準的な技術を利用すると、インテグリンI-ドメインなどの特定のコンホメーションのインテグリンに結合する抗体を生成させることができる（概略的には、R. H. Kenneth, in Monoclonal Antibodies: A New Dimension In Biological Analyses, Plenum Publishing Corp., New York, New York (1980); E. A. Lerner (1981) Yale J. Biol. M

50

ed., 54:387-402; M. L. Gefter et al. (1977) Somatic Cell Genet. 3:231-36を参照されたい)。さらに、当業者であれば、このような方法の変更例を数多く知るところであり、このような変法も有用であろう。抗LFA-1の調製は、例えば、その内容全文を引用をもってここに援用することとする米国特許第5,622,700号に解説されている。

【0069】

ここで用いる用語「抗体」とは、免疫グロブリン分子や、免疫グロブリン分子の免疫学的活性部分、即ち、開いた又は閉じたコンホメーションのインテグリンI-ドメイン、又は改変インテグリンI-ドメイン、例えばLFA-1 I-ドメイン、例えば開いた又は閉じたLFA-1 I-ドメイン、又は、LFA-1の改変インテグリンI-ドメイン、などの抗原に特異的に結合する（免疫反応する）抗原結合部位を含有する分子、を言う。免疫グロブリン分子の免疫学的活性部分の例には、抗体をペプシンなどの酵素で消化して生成できる F(ab)及びF(ab)'<sub>2</sub>フラグメントがある。本発明は、改変LFA-1ポリペプチド又はその一部分もしくはフラグメントなどの改変インテグリンポリペプチドに結合するポリクローナル及びモノクローナル抗体を提供する。ここで用いる用語「モノクローナル抗体」又は「モノクローナル抗体組成物」とは、改変LFA-1ポリペプチド又はその一部分もしくはフラグメントなどの改変インテグリンポリペプチドの特定のエピトープと免疫反応できる抗原結合部位を一種しか含まない一集団の抗体分子を言う。従って、モノクローナル抗体組成物は、典型的には、免疫反応する相手である特定の改変インテグリンポリペプチド又はその一部分もしくはフラグメントに対して、単一の結合親和性を呈する。

【0070】

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製する代わりに、組換えコンビナトリアル免疫グロブリン・ライブラリ（例えば抗体ファージディスプレイライブラリ）を、例えば開いたコンホメーションで安定させた改変インテグリンI-ドメインなど、改変インテグリンポリペプチドでスクリーニングすれば、モノクローナル抗インテグリン抗体を同定及び単離でき、ひいては開いたコンホメーションなどのインテグリンポリペプチド上のコンホメーション特異的エピトープに結合する免疫グロブリンライブラリメンバを単離することができる。ファージディスプレイライブラリを作製及びスクリーニングするキットは市販されている（例えばファルマシア・リコンビナント・ファージ・アンティボディ・システム、カタログ番号27-9400-01；及びストラタジーンSurfZAP<sup>TM</sup>ファージ・ディスプレイ・キット、カタログ番号240612）。ジスルフィド結合によって高親和性コンホメーションで固定されたインテグリンI-ドメインを持つファージ・ライブラリをスクリーニングする際は、ジスルフィドを破壊してI-ドメインの高親和性コンホメーションを無くす還元試薬を加えたときに、特定のファージを溶離できなければならないことに留意されたい。

【0071】

加えて、抗体ディスプレイライブラリを作製及びスクリーニングするための使用に特に適する方法及び試薬の例は、例えばラドナー氏らの米国特許第5,223,409号；カン氏らのPCT国際公報No. WO 92/18619；ダワー氏らのPCT国際公報No. WO 91/17271；ウィンター氏らのPCT国際公報WO 92/20791；マークランド氏らのPCT国際公報No. WO 92/15679；ブレイトリング氏らのPCT国際公報WO 93/01288；マッカファーティ氏らの PCT国際公報No. WO 92/01047；ジェラード氏らのPCT国際公報No. WO 92/09690；ラドナー氏らのPCT 国際公報No. WO 90/02809；Fuchs et al. (1991) Bio/Technology 9:1370-1372；Hay et al. (1992) Hum. Antibod. Hybridomas 3:81-85；Huse et al. (1989) Science 246:1275-1281；Griffiths et al. (1993) EMBO J 12:725-734；Hawkins et al. (1992) J. Mol. Biol. 226:889-896；Clarkson et al. (1991) Nature 352:624-628；Gram et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:3576-3580；Garrad et al. (1991) Bio/Technology 9:1373-1377；Hoogenboom et al. (1991) Nuc. Acid Res. 19:4133-4137；Barbas et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7978-7982；及びMcCafferty et al. Nature (1990) 348:552-554に見ることができる。

【0072】

さらに、標準的な組換えDNA技術を用いて作製できる、ヒト及び非ヒト部分の両方を含

10

20

30

40

50

んで成る、キメラ及びヒト化モノクローナル抗体などの組換え抗インテグリン抗体も、本発明の方法に利用できる。このようなキメラ及びヒト化モノクローナル抗体は、例えばロビンソン氏らの国際出願No. PCT/US86/02269；アキラ氏らのヨーロッパ特許出願184,187；タニグチ.M氏らのヨーロッパ特許出願171,496；モリソン氏らのヨーロッパ特許出願173,494；ノイベルガー氏らのPCT国際公報No. WO 86/01533；キャビリー氏らの米国特許第4,816,567号；キャビリー氏らのヨーロッパ特許出願125,023；Better et al. (1988) Science 240:1041-1043；Liu et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443；Liu et al. (1987) J. Immunol. 139:3521-3526；Sun et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218；Nishimura et al. (1987) Canc. Res. 47:999-1005；Wood et al. (1985) Nature 314:446-449；and Shaw et al. (1988) J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-1559；Morrison, S. L. (1985) Science 229:1202-1207；Oi et al. (1986) BioTechniques 4:214；ウインター氏らの米国特許第5,225,539号；Jones et al. (1986) Nature 321:552-525；Verhoeyan et al. (1988) Science 239:1534；及びBeidler et al. (1988) J. Immunol. 141:4053-4060に解説された方法を用いるなど、当該分野で公知の組換えDNA技術によって作製できる。

10

## 【0073】

ある好適な実施態様では、本発明の抗インテグリン抗体は、活性化したインテグリンに固有のエピトープ（ここでは活性化特異的エピトープとも呼ばれる）など、開いた、高親和性コンホメーションのインテグリンI-ドメインに選択的に結合する。ある好適な実施態様では、本発明の抗インテグリン抗体は、活性化インテグリンとそのコグネイト・リガンドとの間の結合相互作用を修飾する（例えば阻害するなど）。別の実施態様では、抗インテグリン抗体は、白血球接着及び/又は凝集を阻害する。別の実施態様では、本発明の抗インテグリン抗体は、開いたコンホメーションのLFA-1 I-ドメインなどの開いたインテグリンI-ドメインや、又は、LFA-1分子の改変I-ドメインなどの改変インテグリンI-ドメインに、選択的に結合する。

20

## 【0074】

抗インテグリン抗体（例えばモノクローナル抗体など）は、本発明の方法において、インテグリン又はインテグリンI-ドメインポリペプチドの発現及び/又は活性を修飾することにも、利用することができる。また抗インテグリン抗体は、アフィニティークロマトグラフィ又は免疫沈降などの標準的な技術を用いて、改変LFA-1ポリペプチド、又は融合タンパク質などの改変インテグリン又はインテグリンI-ドメインポリペプチドを単離することにも、利用できる。別の実施態様では、抗インテグリン抗体を用いて、活性化インテグリンを発現している細胞を除去する及び/又は死滅させることもできる。さらに、抗インテグリン抗体を用いて、特定のコンホメーション（活性化インテグリンなど）のインテグリンポリペプチドを検出すると、被刺激白血球及び/又は活性化白血球の局在定位などを行うことができる。さらに、開いたコンホメーションのインテグリンI-ドメイン又は改変インテグリンI-ドメインと反応もしくは結合する抗体などの抗インテグリン抗体を、ここに解説するように治療上利用することもできる。従って、抗インテグリン抗体を診断に用いて、炎症を検出するなど、臨床検査法の一部として血中のタンパク質レベルを観察することもできる。検出は、抗体を、検出可能な物質に共役（即ち物理的に連結）することで、簡便化できる。検出可能な物質の例には、多様な酵素、補欠分子団、蛍光物質、発光物質、生物発光物質、及び放射性物質がある。適した酵素の例には、西洋わさびペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、又はアセチルコリンエステラーゼがある。適した補欠分子団複合体の例には、ストレプトアビジン/ビオチン及びアビジン/ビオチンがある。適した蛍光物質の例には、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、塩化ダンジル又はフィコエリトリンがある。発光物質の例にはルミノールがある。生物発光物質の例には、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、及びエクオリンがある。適した放射性物質の例には125I、131I、35S又は3Hがある。

30

40

## 【0075】

50

### 単離された核酸分子

本発明は、インテグリンポリペプチド（例えば改変インテグリンI-ドメインポリペプチド、例えば改変インテグリンI-ドメイン又はI-様ドメインポリペプチド）又はその生物学的活性部分をコードする、単離された核酸分子の使用を包含する。

#### 【0076】

ここで用いる場合の用語「核酸分子」には、DNA分子（例えばcDNA又はゲノムDNA）及びRNA分子（例えばmRNA）や、ヌクレオチド類似体を用いて作製したDNAもしくはRNAの類似体が含まれることを、意図している。当該核酸分子は一本鎖でも、二本鎖でもよいが、好ましくは二本鎖DNAである。野生型ヒト L 及び M ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を、それぞれSEQ ID NO:1（ジェンバンク登録番号NM\_002209）及びSEQ ID NO:3（ジェンバンク登録番号No. J03925）に記載する。本発明の単離された核酸分子は、例えば以下の表9に特定したものなど、ここに解説した L 及び M 変異型の改変後アミノ酸配列をコードするSEQ ID NO:1 及びSEQ ID NO:3のヌクレオチド配列を包含する。表9は、ここに解説した改変 L 及び M 変異型になるように変更された特定のヌクレオチド残基を示す。例えば、 L K287C/K294C 変異型は改変 L ポリペプチドであり、この場合 L (SEQ ID NO:2) のアミノ酸配列に変更を行った結果、アミノ酸残基287位及び294位がシステイン残基に置換されている。対応する野生型ヌクレオチド配列SEQ ID NO:1は、それぞれヌクレオチド残基1022-1024 及び1143-1145で改変がある。従って、表9に示すように、 L K287C/K294C変異型のアミノ酸K287位では、野生型 L 核酸配列(SEQ ID NO:1)の対応ヌクレオチド残基であるヌクレオチド残基1022-1024が「aa

#### 【0077】

#### 【表9】

表9.

変異型	変異	#アミノ酸	#ヌクレオチド	ヌクレオチド配列	
				WT	変異体
αL	K287C/K294C	K287	1022-1024	aaa	tgt
		K294	1043-1045	aag	tgt
	E284C/E301C	E284	1013-1015	gag	tgt
		E301	1064-1066	gag	tgt
	L161C/F299C	L161	644-646	ctc	tgt
		F299	1058-1060	ttc	tgt
K160C/F299C	K160	641-643	aaa	tgt	
	F299	1058-1060	ctc	tgt	
L161C/T300C	L161	644-646	ctc	tgt	
	T300	1061-1063	act	tgt	
L289C/K294C	L289	1028-1030	ctg	tgt	
	K294	1043-1045	aag	tgt	
αM	Q163C/Q309C	Q163	607-609	caa	tgt
		Q309	1045-1047	cag	tgt
	D294C/Q311C	D294	1000-1002	gat	tgt
		Q311	1051-1053	cag	tgt
	Q163C/R313C	Q163	607-609	caa	tgt
R313	1057-1059	cgg	tgt		

#### 【0078】

L ; ジェンバンクNM 002209

M ; ジェンバンク J03925

#### 【0079】

用語「単離された核酸分子」には、当該核酸の天然源に存在する他の核酸分子から分離された核酸分子が含まれる。例えばゲノムDNAの場合、用語「単離された」には、ゲノム

DNAが天然で結合している先の染色体から分離された核酸分子が含まれる。好ましくは「単離された」核酸分子が、当該核酸の由来である生物のゲノムDNA中で、天然で当該核酸の両側にある配列（即ち当該核酸の5末端及び3末端にある配列）を含まないとよい。例えば、多様な実施態様では、改変インテグリンI-ドメインポリペプチドをコードする単離核酸分子が、当該核酸の由来である細胞のゲノムDNA中で当該核酸分子の両側に天然で存在するヌクレオチド配列を、約5kb、4kb、3kb、2kb、1kb、0.5kb又は0.1kb未満、含有していてもよい。さらに、cDNA分子などの「単離された」核酸分子は、組換え技術で作製した場合に他の細胞性物質、又は培地を実質的に含まない状態であり得、あるいは、化学合成した場合には前駆化学物質又は他の化学物質を実質的に含まない状態であり得る。

10

#### 【0080】

当業者であれば、さらに、改変インテグリンポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に更なる変更を変異により加えて、コードされた改変インテグリンポリペプチドのアミノ酸配列を、当該改変インテグリンポリペプチドの構造上の特徴又は機能的な能力をそれ以上変えることなく、変更できることは認識されるであろう。例えば、「重要でない」アミノ酸残基位置でアミノ酸置換が起きるようなヌクレオチド置換を、改変インテグリンポリペプチドをコードする配列中で行うことができる。「重要でない」アミノ酸残基とは、当該構造及び/又は生物学的活性をそれ以上変化させることなく、改変インテグリンポリペプチドの配列から変更できる残基である。本発明の方法に基づいて、コンピュータ・デザイン及びモデリングを用いて、所望のタンパク質コンホメーションを得るために、いずれの

20

#### 【0081】

従って、本発明の方法には、活性にとって重要でないアミノ酸残基の変更を含有する改変インテグリンポリペプチドをコードする核酸分子の使用が含まれよう。

#### 【0082】

好ましくは、保存的アミノ酸置換は、重要でないと予測される一つ又はそれ以上のアミノ酸残基で行うとよい。「保存的アミノ酸置換」とは、類似の側鎖を有するアミノ酸残基に、当該アミノ酸残基が置換されるものである。類似の側鎖を有するアミノ酸残基の系統群が当該分野で定義されている。これらの系統群には、塩基性の側鎖（例えばリシン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性の側鎖（例えばアスパラギン酸、グルタミン酸）、無電荷の極性側鎖（例えばグリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性の側鎖（例えばアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、ベータ分岐側鎖（例えばスレオニン、バリン、イソロイシン）及び芳香族の側鎖（例えばチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）、を持つアミノ酸がある。このように、改変インテグリンポリペプチド中で重要でないと予測されるアミノ酸残基を、同じ側鎖系統群の別のアミノ酸残基に置換することが好ましい。

30

#### 【0083】

##### 組換え発現ベクタ及び宿主細胞

本発明の別の局面は、インテグリンI-ドメインもしくはI-様ドメインポリペプチドなどの改変インテグリンポリペプチド（又はその一部分）又は融合タンパク質をコードする核酸を含有する組換え発現ベクタなどのベクタに関するものである。ここで用いる用語「ベクタ」とは、連結された相手である別の核酸を輸送できる核酸分子を言う。ベクタの一つの形は、別のDNAセグメントを途中で連結できる環状の二本鎖DNAループを言う「プラスミド」である。もう一つの種類のベクタは、別のDNAセグメントをウィルスゲノム中に連結できるウィルスベクタである。いくつかのベクタは、導入された先の宿主細胞で自律的複製が可能である（例えば、細菌由来の複製開始点を有する細菌ベクタ及びエピソードほ乳類ベクタなど）。他のベクタ（例えば非エピソードほ乳類ベクタなど）は、宿主細胞に導入されると、宿主細胞中のゲノムに組み込まれて、宿主ゲノムと一緒に複製される。さらに、いくつかのベクタは、作動的に連結された先の遺伝子の発現を命令す

40

50

ることができる。このようなベクタをここでは「発現ベクタ」と呼ぶ。一般に、組換えDNA技術で実用性のある発現ベクタは、プラスミドの形であることが多い。本明細書では、プラスミドが最もよく用いられている形のベクタであるため、「プラスミド」及び「ベクタ」を交換可能に用いている場合がある。しかし、本発明の方法には、例えばウイルスベクタ（複製能欠損レトロウイルス、アデノウイルス及びアデノ随伴ウイルスなど）など、同等の機能を果たす他の形の発現ベクタも含まれよう。

#### 【0084】

本発明の組換え発現ベクタは、本発明の核酸を、当該核酸が宿主細胞内で発現するのに適した形で含むが、このことは、この組換え発現ベクタには、発現に用いる宿主細胞に基づいて選択され、発現させようとする核酸配列に作動的に連結させた一つ又はそれ以上の調節配列が含まれることを意味する。組換え発現ベクタ内で、「作動的に連結されている」とは、当該ヌクレオチド配列の発現が可能な態様で（例えばインビトロ転写／翻訳系で、又は、ベクタを宿主細胞内に導入した場合には宿主細胞内で）、目的のヌクレオチド配列が調節配列に連結されていることを意味することを、意図している。用語「調節配列」には、プロモータ、エンハンサ及び他の発現調節配列（例えばポリアデニレーション・シグナル）が含まれることを、意図している。このような調節配列は、例えば Goedel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)に解説がある。調節配列には、多種の宿主細胞でヌクレオチド配列の構成的発現を命令するものや、特定の宿主細胞でのみ、ヌクレオチド配列の発現を命令するもの（例えば組織特異的調節配列）、がある。発現ベクタのデザインは、例えば、形質転換させようとする宿主細胞の選択、所望のタンパク質の発現レベル、等々の因子に応じて様々であろうことは、当業者であれば理解されよう。本発明の発現ベクタを宿主細胞に導入することで、融合タンパク質又はペプチドを含め、ここに解説したように核酸がコードするタンパク質又はペプチド（例えば改変インテグリンI-ドメインポリペプチド、融合タンパク質等）を産生させることができる。

#### 【0085】

従って本発明は、当該タンパク質が産生するよう組換え発現ベクタを含有する本発明の宿主細胞（例えば原核宿主細胞又は真核宿主細胞）を適した培地で培養することで、改変インテグリンI-ドメインポリペプチドなどの改変インテグリンポリペプチドを生成する方法を提供する。

#### 【0086】

本発明の組換え発現ベクタは、例えば本発明の方法に用いるためなど、原核細胞又は真核細胞における改変インテグリンポリペプチド又は融合タンパク質の発現用として設計することができる。例えば、E. coliなどの細菌細胞、（バキュロウイルス発現ベクタを用いて）昆虫細胞、酵母細胞又は哺乳動物細胞などで、改変インテグリンI-ドメインポリペプチド又は融合タンパク質を発現させることができる。適した宿主細胞はさらにGoedel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)に解説されている。あるいは、組換え発現ベクタは、T7プロモータ調節配列及びT7ポリメラーゼを用いるなどして、インビトロで転写及び翻訳させることもできる。

#### 【0087】

原核細胞によるタンパク質の発現は、多くの場合、E. coliで、融合タンパク質又は非融合タンパク質の発現を命令する構成的もしくは誘導性プロモータを含有するベクタを用いて行われる。融合ベクタは、数多くのアミノ酸を、それにコードされたタンパク質、通常は組換えタンパク質のアミノ末端、に付加する。このような融合ベクタは、典型的には三つの目的：即ち1)組換えタンパク質の発現を増加させる；2)組換えタンパク質の可溶性及び／又は安定性を増加させる；及び3)アフィニティ精製の際にリガンドとして働くことで、組換えタンパク質の精製を助ける、に役立つ。融合発現ベクタの場合、しばしば、タンパク質分解開裂部位を融合部分と組換えタンパク質との間の接合部位に導入して、融合タンパク質の精製後に、融合部分から組換えタンパク質を切り離せるようにする

10

20

30

40

50

。このような酵素、及びそれらのコグネイト認識配列には、因子Xa、スロンピン、及びエンテロキナーゼ、がある。典型的な融合発現ベクタには、それぞれグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST)、マルトース E 結合たんぱく、又はプロテイン A を標的組換えたんぱくに融合させる pGEX (ファルマシア・バイオテック社製; Smith, D.B. and Johnson, K.S. (1988) *Gene* 67:31-40)、pMAL (ニューイングランド・バイオラズ社、マサチューセッツ州ビバリー) 及び pRIT5 (ファルマシア社、ニュージャージー州ピスカタウェイ) がある。精製された改変インテグリン I-ドメイン融合タンパク質 (例えば可溶性 I-ドメイン-Ig) は、ここに解説するようにインテグリン活性を修飾するのに利用できる。

#### 【 0 0 8 8 】

適した誘導性非融合 E . c o l i 発現ベクタの例には、pTrc (Amann et al., (1988) *Gene* 69:301-315) 及び pET 11d (Studier et al., *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, California (1990) 60-89) がある。pTrc ベクタからの標的遺伝子の発現は、ハイブリッド trp-lac 融合プロモータからの宿主 RNA ポリメラーゼ転写に依拠するものである。pET 11d ベクタからの標的遺伝子の発現は、共発現するウィルス RNA ポリメラーゼ (T7 gn1) が媒介する、T7 gn10-lac 融合プロモータからの転写に依拠するものである。このウィルスポリメラーゼは、宿主株 BL21(DE3) 又は HMS174(DE3) により、T7 gn1 遺伝子を lacUV 5 プロモータの転写制御下に持つ定住プロファージから提供される。

#### 【 0 0 8 9 】

E . c o l i 内での組換えタンパク質の発現を最大にする戦略の一つは、タンパク質分解により組換えタンパク質を開裂する能力を欠損した宿主細菌で当該タンパク質を発現させることである (Gottesman, S., *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, California (1990) 119-128)。もう一つの戦略は、各アミノ酸に対応する個々のコドンが E . c o l i 内で優先的に利用されるものとなるよう、発現ベクタに挿入しようとする核酸の核酸配列を変更することである (Wada et al., (1992) *Nucleic Acids Res.* 20:2111-2118)。本発明の核酸配列のこのような変更は、標準的な DNA 合成技術で行うことができる。

#### 【 0 0 9 0 】

別の実施態様では、前記発現ベクタは酵母発現ベクタである。酵母 S . セレビジエで発現させるためのベクタの例には、pYepSec1 (Baldari, et al., (1987) *EMBO J.* 6:229-234)、pMFa (Kurjan and Herskowitz, (1982) *Cell* 30:933-943)、pJRY88 (Schultz et al., (1987) *Gene* 54:113-123)、pYES2 (カリフォルニア州サンジエゴ、インビトロジェン社) 及び picZ (カリフォルニア州サンジエゴ、インビトロジェン社)、がある。

#### 【 0 0 9 1 】

あるいは、改変インテグリンポリペプチドは、バキュロウィルス発現ベクタを用いて昆虫細胞で発現させることができる。培養昆虫細胞 (例えば Sf9 細胞) でタンパク質を発現させるのに利用できるバキュロウィルスベクタには、pAc シリーズ (Smith et al. (1983) *Mol. Cell Biol.* 3:2156-2165) 及び pVL シリーズ (Lucklow and Summers (1989) *Virology* 170:31-39) がある。

#### 【 0 0 9 2 】

さらに別の実施態様では、本発明の核酸を、哺乳動物発現ベクタを用いて哺乳動物細胞で発現させる。哺乳動物発現ベクタの例には、pCDM8 (Seed, B. (1987) *Nature* 329:840) 及び pMT2PC (Kaufman et al. (1987) *EMBO J.* 6:187-195) がある。哺乳動物細胞で用いる場合、発現ベクタの制御機能は、しばしばウィルス調節配列によって提供される。例えば、よく用いられるプロモータは、ポリオーマ、アデノウィルス 2、サイトメガロウィルス及び シミアン・ウィルス 40 由来のものである。原核細胞及び真核細胞の両方にとって適した他の発現系については、Sambrook, J., Fritsh, E. F., and Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989 の第 16 章及び第 17 章を参照されたい。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 9 3 】

別の実施態様では、前記組換え哺乳動物発現ベクタは、特定の細胞種で優先的に核酸の発現を命令することができる（例えば組織特異的調節配列を用いて核酸を発現させるなど）。組織特異的調節配列は当業で公知である。適した組織特異的プロモータの非限定的な例には、アルブミンプロモータ（肝臓特異的；Pinkert et al. (1987) Genes Dev. 1:268-277）、リンパ球特異的プロモータ(Calame and Eaton (1988) Adv. Immunol. 43:235-275)、特にT細胞受容体のプロモータ(Winoto and Baltimore (1989) EMBO J. 8:729-733)及び免疫グロブリンのプロモータ (Banerji et al. (1983) Cell 33:729-740; Queen and Baltimore (1983) Cell 33:741-748)、神経細胞特異的プロモータ（例えば神経フィラメントプロモータ；Byrne and Ruddle (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5473-5477）、内皮細胞特異的プロモータ（例えばKDR/flk プロモータ；米国特許第5,888,765号）、膵臓特異的プロモータ(Edlund et al. (1985) Science 230:912-916)、及び乳腺特異的プロモータ（例えば乳清プロモータ；米国特許第4,873,316号及びヨーロッパ特許出願公報第264,166号）、がある。例えば、マウスホックスプロモータ (Kessel and Gruss (1990) Science 249:374-379)及び  $\beta$ -フェトタンパク質プロモータ (Campes and Tilghman (1989) Genes Dev. 3:537-546)などの発生調節性プロモータも、包含するところである。

10

## 【 0 0 9 4 】

本発明の他の局面は、例えば改変インテグリンI-ドメイン核酸分子を含有させた組換え発現ベクタや、又は、ホスト細胞のゲノムの特定の部位で相同組換えが可能なような配列を含有する改変インテグリンI-ドメイン核酸分子などの本発明の改変インテグリンポリペプチドをコードする核酸分子を導入する先のホスト細胞に関する。用語「ホスト細胞」及び「組換えホスト細胞」はここでは交換可能に用いられている。このような用語は特定の対象細胞だけでなく、このような細胞の後代又は潜在的な後代の細胞も言うとして理解されたい。突然変異又は環境の影響により、何らかの改変が後の世代に起きることがあるため、このような後代は実際のところ、親細胞と同一でないかも知れないが、それでもなお、ここで用いるこの用語の範囲内に包含される。

20

## 【 0 0 9 5 】

ホスト細胞はいかなる原核もしくは真核細胞でもよい。例えば、改変インテグリンポリペプチド又は融合タンパク質を、E. coliなどの細菌細胞、昆虫細胞、酵母もしくは哺乳動物細胞（例えば造血細胞、白血球、K562細胞、293T細胞、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)、ヒト微小血管内皮細胞(HMVEC)、チャイニーズ・ハムスター卵巣細胞(CHO)もしくはCOS細胞など)で、発現させることができる。他の適したホスト細胞は当業者に公知である。

30

## 【 0 0 9 6 】

ベクタDNAは、原核もしくは真核細胞に、常法である形質転換もしくはトランスフェクション技術を通じて導入することができる。ここで用いる場合の用語「形質転換」及び「トランスフェクション」とは、リン酸カルシウムもしくは塩化カルシウム共沈殿法、DEAE-デキストラン-媒介トランスフェクション、リポフェクション、又は電気穿孔法を含め、ホスト細胞に外来の核酸（例えばDNA）を導入するための、多種の当業者に公知の技術を言うとして、意図している。ホスト細胞を形質転換もしくはトランスフェクトする適した方法は、サムブルック氏らの文献(Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989)、及び他の実験用マニュアルに見ることができる。

40

## 【 0 0 9 7 】

哺乳動物細胞の安定なトランスフェクトに関しては、用いる発現ベクタ及びトランスフェクション技術によっては、細胞の一部しか、外来のDNAをそのゲノムに組み込まないことがあることが知られている。これらの組み込み体を同定及び選別するには、選択マーカ（例えば抗生物質に対する耐性）をコードする遺伝子を目的の遺伝子と一緒にホスト細胞に導入することが多い。好適な選択マーカには、例えばG418、ヒグロマイシン及びメトトレキセートなどの薬物に対する耐性をもたらすものがある。選択マーカをコードする核酸

50

を宿主細胞に導入するには、改変インテグリンポリペプチドをコードするのと同じベクタに載せて導入しても、又は別のベクタに載せて導入してもよい。導入した核酸が安定にトランスフェクトした細胞は、薬物選択（例えば選択マーカー遺伝子を取り込んだ細胞は生き残り、他のものは死滅するなど）で判定できる。

【0098】

培養液中の原核もしくは真核宿主細胞などの、本発明の宿主細胞を利用すると、本発明の方法で使用できる改変インテグリンポリペプチド、例えば改変インテグリンI-ドメインポリペプチド又は融合タンパク質など、を産生（即ち発現）させることができる。一実施態様では、宿主細胞を（改変インテグリンI-ドメインポリペプチド又は融合タンパク質をコードする組換え発現ベクタを導入した）、改変インテグリンI-ドメインポリペプチド又は融合タンパク質が産生されるように、適した培地で培養する。別の実施態様では、改変インテグリンI-ドメインポリペプチド又は融合タンパク質を培地又は宿主細胞から単離する。さらに、インテグリン活性を修飾するために、改変インテグリンポリペプチド又は融合タンパク質を発現している組換え細胞を対象に投与してもよい。

10

【0099】

さらに本発明の宿主細胞は、非ヒトトランスジェニック動物を作製するのにも利用できる。例えば、ある実施態様では、本発明の宿主細胞は、改変インテグリンI-ドメインポリペプチドをコードする配列が導入してある受精卵母細胞又は胚性幹細胞である。次に、このような宿主細胞を用いて、外因性の改変インテグリンI-ドメイン配列がそれらのゲノムに導入された非ヒトトランスジェニック動物や、又は、内因性のインテグリンI-ドメイン配列が変更された相同組換え動物を作製することができる。このような動物は、改変インテグリンI-ドメイン分子の機能及び/又は活性を研究したり、また、改変インテグリンI-ドメインポリペプチド活性のモジュレータを同定及び/又は評価するのに、有用である。ここで用いる「トランスジェニック動物」とは、当該動物の一つ又はそれ以上の細胞が導入遺伝子を含有する、非ヒト動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはラットもしくはマウスなどのげっ歯類、である。トランスジェニック動物の他の例には、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ウシ、ヤギ、ニワトリ、両生類等がある。導入遺伝子とは、トランスジェニック動物が発生する元となる細胞のゲノム中に組み込まれ、成熟動物のゲノム中に留まって、そのトランスジェニック動物の一つ又はそれ以上の細胞種又は組織で、コードされた遺伝子産物の発現を命令する外因性のDNAである。ここで用いる「相同組換え動物」とは、当該動物の発生前に、当該動物の胚細胞など、動物の細胞中に導入された外因性DNA分子と内因性遺伝子との間で相同組換えが起きることで、内因性インテグリンI-ドメイン遺伝子が変更されている非ヒト動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはマウス、である。

20

30

【0100】

本発明のトランスジェニック動物は、改変インテグリンI-ドメインをコードする核酸を、受精卵母細胞の雄前核に、マイクロインジェクション、レトロウイルス感染などで導入し、この卵母細胞を偽妊娠の借り腹動物で発生させることで、作製できる。導入遺伝子には、導入遺伝子の発現効率を高めるために、イントロン配列及びポリアデニレーションシグナルも含めてもよい。組織特異的調節配列を改変インテグリンI-ドメイン導入遺伝子に作動的に連結させると、特定の細胞に改変インテグリンI-ドメインタンパク質の発現を命令することができる。胚の操作及びマイクロインジェクションを通じてトランスジェニック動物、特にマウスなどの動物を作製する方法は従来技術となっており、例えば、両者ともレダー氏らの米国特許第4,736,866号及び第4,870,009号、ワグナー氏らの米国特許第4,873,191号、及びHogan, B., Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986)に解説がある。

40

【0101】

相同組換え動物を作製するには、欠失、付加又は置換を導入することで、改変インテグリンI-ドメイン遺伝子を機能的に破壊するなど変更してあるような改変インテグリンI-ドメイン遺伝子を少なくとも一部分を含有するベクタを作製する。改変インテグリンI-ドメイ

50

ン遺伝子は、ヒト遺伝子でもよいが、より好ましくはヒト改変インテグリンI-ドメイン遺伝子の非ヒト相合体である。例えばマウス改変インテグリンI-ドメイン遺伝子を用いて、マウスゲノム中の内因性改変インテグリンI-ドメイン遺伝子を改変するのに適した、ベクタなどの相同組換え核酸分子を構築することができる。ある好適な実施態様では、相同組換えが起きると、当該内因性改変インテグリンI-ドメイン遺伝子が機能的に破壊される（即ち機能タンパク質をもはやコードしていない；ここでは「ロックアウト」ベクタとも呼ぶ）よう、相同組換え核酸分子をデザインする。代替的に、相同組換えが起きると、内因性改変インテグリンI-ドメイン遺伝子の変異もしくは変化するが、以前として機能タンパク質をコードしているよう、相同組換え核酸分子をデザインすることができる（例えば、上流の調節領域を変えることで、内因性改変インテグリンI-ドメインタンパク質の発現を変えることができる）。相同組換え核酸分子において、改変インテグリンI-ドメイン遺伝子のうちで変更された部分は、その5末端及び3末端で、改変インテグリンI-ドメイン遺伝子の追加の核酸配列部分でフランクされているため、胚性幹細胞中などの細胞中で、相同組換え核酸分子が持つ外因性改変インテグリンI-ドメイン遺伝子と、内因性改変インテグリンI-ドメイン遺伝子との間で、相同組換えが起きる。この追加のフランキング改変インテグリンI-ドメイン核酸配列は、内因性遺伝子との間の相同組換えが成功するよう、十分な長さのものである。典型的には、数キロベースの（5末端及び3末端の両側の）フランキングDNAが相同組換え核酸分子に含まれる（相同組換えベクタの解説については、例えばThomas, K.R. and Capecchi, M. R. (1987) *Cell* 51:503 を参照されたい）。相同組換え核酸分子を胚性幹細胞株などの細胞中に（例えばエレクトロポレーションで）導入し、導入された改変インテグリンI-ドメイン遺伝子が、内因性の改変インテグリンI-ドメイン遺伝子と相同組換えを起こした細胞を選択する（例えばLi, E. et al. (1992) *Cell* 69:915を参照されたい）。こうして選択された細胞を、動物（マウスなど）の胚盤胞に注射して凝集キメラを形成することができる（例えばBradley, A. in *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, E.J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987) pp. 113-152）。次に、キメラ胚に適した偽妊娠のメス借り腹動物に移植することができ、この胚を産期に至らせる。相同組換えを起こしたDNAを生殖細胞中に持つ後代を用いれば、導入遺伝子の生殖細胞系伝播により、動物のすべての細胞が相同組換えを起こしたDNAを含有するような動物を育種することができる。例えばベクタ、又は、相同組換え動物など、相同組換え核酸分子を構築する方法は、さらにBradley, A. (1991) *Current Opinion in Biotechnology* 2:823-829 及びル・ムーレック氏らのPCT 国際公報Nos.: WO 90/11354 ; スミシース氏らのWO 91/01140 ; ジズルストラ氏らのWO 92/0968 ; 及びバーンズ氏らのWO 93/04169に解説されている。

#### 【0102】

別の実施態様では、導入遺伝子の発現を調節可能とする所定の系を含有するトランスジェニック非ヒト動物を作製することができる。このような系の一例は、バクテリオファージP1のcre/loxPリコンビナーゼ系である。cre/loxPリコンビナーゼ系の解説については、例えばLakso et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:6232-6236を参照されたい。リコンビナーゼ系のもう一つの例は、サッカロミセス - セレビジエのFLPリコンビナーゼ系である(O'Gorman et al. (1991) *Science* 251:1351-1355)。cre/loxP リコンビナーゼ系を用いて導入遺伝子の発現を調節する場合、Creリコンビナーゼ及び所定のタンパク質の両方をコードする導入遺伝子を含有する動物が必要である。このような動物は、例えば一方が所定のタンパク質をコードする導入遺伝子を含有し、他方がリコンビナーゼをコードする導入遺伝子を含有するような二種のトランスジェニック動物を交配するなどにより、「二重」トランスジェニック動物を構築することで、提供できる。

#### 【0103】

##### スクリーニング検定

本発明は、インテグリン活性を修飾するモジュレータ、即ち候補もしくはテスト化合物又は薬剤（例えばペプチド、抗体、ペプチドミメティック、小分子（有機もしくは無機）又は他の薬剤など）を同定する方法（ここでは「スクリーニング検定」とも呼ぶ）を提供す

10

20

30

40

50

るものである。これらの検定を、例えば活性コンホメーションのインテグリンI-ドメインポリペプチドなどのインテグリンI-ドメインポリペプチドに結合する、インテグリンI-ドメインポリペプチドと相互作用する他のタンパク質と結合する、インテグリンI-ドメインポリペプチドと他のタンパク質、例えばICAMなどのインテグリンリガンド、との結合を誘導し、その相互作用を修飾することで、インテグリン活性を修飾する、などのような化合物を同定するよう、デザインする。

#### 【0104】

ここで用いる用語「インテグリン活性のモジュレータ」には、ここに解説するように、少なくとも一つのインテグリン活性を修飾又は調節できる化合物又は作用薬が包含される。インテグリン活性のモジュレータには、限定はしないが、小型の有機もしくは無機分子、核酸分子、ペプチド、抗体等が含まれよう。インテグリン活性のモジュレータは、例えば細胞接着又はリガンド結合など、インテグリン活性の誘導物質又は阻害物質であってよい。ここで用いる「インテグリン活性の誘導物質」は、インテグリン活性を刺激、亢進、及び/又は、模倣するものである。ここで用いる「インテグリン活性の阻害物質」は、インテグリン活性を低減、遮断又は拮抗するものである。

10

#### 【0105】

ここで交換可能に用いられるように、「インテグリン活性」又は「インテグリン媒介活性」とは、インピトロ及びインピボで、標準的手法に従って調べたときに、インテグリンポリペプチド又は核酸分子が、インテグリン応答性細胞、又はインテグリンリガンドもしくは受容体に及ぼす活性を言う。一の実施態様では、インテグリン活性は、例えば細胞間又は細胞と細胞外マトリックス間の接着などの細胞接着事象の媒介能である。別の実施態様では、インテグリン活性は、細胞シグナリング事象の伝達能である。さらに別の実施態様では、インテグリン活性は、ICAMなどのリガンドに対する結合能である。

20

#### 【0106】

ある好適な実施態様では、可溶性の組換え高親和インテグリンI-ドメインは、インテグリンリガンド結合を阻害する小分子アンタゴニストをスクリーニングするのに、利用できる。さらに、最小限のリガンド結合活性を示す野生型インテグリンI-ドメインに対する作用との比較に基づき、直接的/競合的及び間接的/非競合的な阻害の態様を持つ、抗体などのアンタゴニストを区別することができる。例えば、間接的な阻害物質は、活性化野生型インテグリンI-ドメインではリガンド結合を阻害するであろうが、ジスルフィドで固定された高親和I-ドメインではしないはずである。

30

#### 【0107】

別の実施態様では、検定は細胞ベースの検定であり、改変インテグリンポリペプチドを細胞表面上に発現している細胞にテスト化合物を接触させるステップと、テスト化合物のインテグリン活性の修飾（誘導又は阻害など）能を調べるステップとを含む。例えば、開いたコンホメーションで安定した改変インテグリンI-ドメインポリペプチドを細胞表面上に発現している細胞を、テスト化合物に接触させ、このテスト化合物の、インテグリンリガンドに対する接着の修飾能を、ここに解説し、例示するように調べる。

#### 【0108】

さらに別の実施態様では、例えば開いたコンホメーションで安定させた改変インテグリンI-ドメインポリペプチドを検出可能な標識に共役させて、改変インテグリンポリペプチドの結合を、固定化インテグリンリガンドに対する標識付インテグリンI-ドメインの結合量を検出することで調べられるようにしても、テスト化合物によるインテグリンリガンド結合の修飾能を調べることができる。

40

#### 【0109】

炎症の動物モデルなど、動物ベースのモデル系を、例えばインテグリン活性のモジュレータである化合物を同定するようデザインされたスクリーニング戦略の一部として使用してもよい。このように、動物ベースのモデルを、炎症を修飾したり、インテグリン媒介疾患を治療するのに効果的であろう薬剤、薬品、治療法及び介入法を判定するのに、用いてもよい。例えば、動物モデルを、インテグリン活性の修飾能を示すと思われる化合物に暴露

50

し、この動物のその暴露に対する応答を、処置前後の炎症性活性を評価することでモニターすることができる。ここに解説したような改変インテグリンI-ドメインポリペプチドを発現するトランスジェニックマウスなどのトランスジェニック動物を用いても、炎症を修飾したり、インテグリン媒介疾患を治療するのに効果的であるう薬剤、薬品、治療法及び介入法を判定することができる。

【0110】

別の局面では、本発明は、ここに解説した検定法の二つ又はそれ以上の組合せに関する。例えば、インテグリン活性のモジュレータは、細胞ベースの検定法を使用して同定することができ、作用薬のインテグリン活性修飾能を、炎症の動物モデルなどの動物などで、*in vivo*で確認してもよい。

10

【0111】

さらに、スクリーニング検定法を用いてインテグリン活性の誘導物質を同定することができ、例えばインテグリンのリガンド又は受容体への結合などのインテグリンポリペプチド活性を模倣したり、インテグリンのインテグリン応答細胞に対する活性を模倣したりするような誘導物質を同定することができる。このような化合物には、限定はしないが、ペプチド、抗体、又は小有機もしくは無機化合物が含まれるであろう。ある実施態様では、開いた活性化コンホーマに選択的に結合する本発明の抗LFA-1抗体など、抗インテグリン抗体を用いても、テスト化合物のインテグリン活性化能を評価することができる。

【0112】

テスト化合物は、生物学的ライブラリ；空間指定可能なパラレル固相又は液相ライブラリ；逆重畳積分が必要な合成ライブラリ法；「ワン・ピース・ワン・コンパウンドライブラリ法；及びアフィニティ・クロマトグラフィ選別法を用いた合成ライブラリ法を含め、当該分野で公知のコンビナトリアル・ライブラリ法での数多くのアプローチのいずれを用いて得てもよい。生物学的ライブラリ法はペプチド・ライブラリに限られるが、他の四つの方法は、化合物のペプチド、非ペプチド・オリゴマー又は小分子ライブラリに応用できる (Lam, K.S. (1997) *Anticancer Drug Des.* 12:145)。

20

【0113】

分子ライブラリの合成法の例は、例えばDeWitt et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:6909; Erb et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:11422; Zuckerman et al. (1994). *J. Med. Chem.* 37:2678; Cho et al. (1993) *Science* 261:1303; Carr 30  
ell et al. (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2059; Carell et al. (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2061; 及び Gallop et al. (1994) *J. Med. Chem.* 37:1233  
に見ることができる。

【0114】

化合物のライブラリは、溶液中(例えばHoughten (1992) *Biotechniques* 13:412-421)で提供されても、又はビーズ(Lam (1991) *Nature* 354:82-84)、チップ(Fodor (1993) *Nature* 364:555-556)、細菌(ラドナー氏の米国特許第5,223,409号)、孢子(ラドナー氏の米国特許第'409号)、プラスミド(Cull et al. (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89:1865-1869) 又はファージ (Scott and Smith (1990) *Science* 249:386-390); (Devlin (1990) *Science* 249:404-406); (Cwirla et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:6378-6382); (Fel 40  
lici (1991) *J. Mol. Biol.* 222:301-310); (ラドナー氏の上記文献.)上でも提供され得る。

【0115】

さらに本発明は、上記のスクリーニング検定法で同定された新規な作用薬に関するものである。介入法に関しては、インテグリン活性及び/又は炎症性活性を修飾するあらゆる処置を、ヒトの治療的介入法候補とみなすべきである。

【0116】

医薬組成物

本発明の改変インテグリンポリペプチドをコードする核酸分子、改変インテグリンポリペプチド(例えば改変I-ドメインポリペプチド及び融合タンパク質)、及びそれらの活性フ 50

ラグメント、抗インテグリンI-ドメイン抗体、及びインテグリンモジュレータ（ここでは「有効化合物」ともよぶ）DNAワクチン、又はDNAベクタは、投与に適した医薬組成物中に組み込むことができる。ここで用いる、インテグリン活性の「モジュレータ」、例えば阻害物質及び誘導物質など、には、例えばインテグリン媒介シグナリング事象、インテグリン媒介接着事象、又は、コグネイト・リガンドに対するインテグリン結合などのインテグリン活性を修飾する化合物が含まれる。インテグリンモジュレータには、本発明の改変インテグリンI-ドメイン又はI-様ドメインポリペプチド、抗インテグリンI-ドメインポリペプチドや、ここで解説したスクリーニング検定で同定された化合物がある。このような組成物は典型的に、当該化合物、核酸分子、ベクタ、タンパク質又は抗体と、薬学的に許容可能な担体とを含んで成る。ここで用いる用語「薬学的に許容可能な担体」は、薬学的投与に適合性ある、あらゆる溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤及び抗カビ剤、等張剤及び吸収遅延剤等が含まれることを意図する。薬学的に有効な物質のためのこのような媒質及び薬剤の使用は当該分野で公知である。従来媒質又は薬剤が有効化合物に対して適合性がない場合を除き、組成物中へのその使用が考慮される。補助的な有効化合物も本組成物中に取り入れてよい。

10

**【0117】**

本発明の医薬組成物は、意図した投与経路にとって適合性あるように調合される。投与経路の例には、疾患部位への直接的設置を含め、非経口、例えば静脈内、皮内、皮下、経口（例えば吸入）、経皮（局所）、経粘膜、眼内、及び直腸投与がある。非経口、皮内、又は皮下投与用に用いられる溶液又は懸濁液には、以下の成分：注射用の水、生理食塩水、不揮発性油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコール又は他の合成溶媒などの無菌の希釈剤；ベンジルアルコール又はメチルパラベンなどの抗菌剤；アスコルビン酸又は亜硫酸水素ナトリウムなどの抗酸化剤；エチレンジアミン四酢酸などのキレート剤；酢酸、クエン酸又はリン酸などの緩衝剤や、塩化ナトリウム又はデキストロースなどの張性調節剤、がある。pHは、塩酸又は水酸化ナトリウムなどの酸又は塩基で調節できる。非経口用製剤は、ガラス製又はプラスチック製のアンプル、使い捨ての注射筒又は複数容量用バイアルに封入することができる。

20

**【0118】**

注射用途に適した医薬組成物には、無菌の水溶液（水溶性の場合）又は分散液や、無菌の注射用溶液又は分散液の即時調合用の無菌粉末がある。静脈内投与の場合、適した担体には、生理食塩水、静菌水、クレモフォールEL™（BASF社製、ニュージャージー州パーシパニー）又はリン酸緩衝生理食塩水（PBS）がある。いずれの場合も、組成物は無菌でなければならず、注射筒への注入が容易な程度に流動的でなければならない。また、製造及び保管の条件下で安定でなくてはならず、細菌及びカビなどの微生物の汚染作用から守られていなければならない。担体は、例えば水、エタノール、ポリオール（例えばグリセロール、プロピレングリコール、及び液体ポリエチレングリコール等や、これらの適した混合物を含有する溶媒又は分散媒であってよい。適当な流動性は、例えばレシチンなどのコーティングを用いたり、分散液の場合には必要な粒子の大きさを維持したり、そして界面活性剤を利用するなどにより、維持できる。微生物の活動を防ぐには、多種の抗菌剤及び抗カビ剤、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサル等により、可能である。多くの場合、糖類、マンニトール、ソルビトールなどの多価アルコールや、塩化ナトリウムなどの等張剤を組成物中に含めるのが好ましいであろう。注射用組成物の吸収を長引かせるには、モノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンなど、吸収を遅らせる薬剤を組成物中に含めると可能である。

30

40

**【0119】**

無菌の注射用溶液は、有効化合物（例えば可溶性の改変インテグリンI-ドメイン融合タンパク質）を必要量、適した溶媒中に、必要に応じて上に列挙した成分のうちの一つ又は組合せと一緒に取り入れた後、濾過滅菌して調製することができる。一般的には、分散液は、塩基性分散媒と、上に列挙したうちで必要な他の成分とを含有する無菌の賦形剤に有効化合物を取り入れることにより、調製されている。無菌の注射用溶液の調製用の無菌粉末

50

の場合、好適な調製法は真空乾燥及び凍結乾燥であり、その結果、有効成分と、予め無菌濾過したその溶液から出た更なる所望の成分とから成る粉末が生じる。

【0120】

経口用組成物には、一般に不活性の希釈剤又は食用の担体が含まれる。これらをゼラチンカプセルに封入することができ、又は圧縮して錠剤にしてもよい。経口による治療用投与の場合、有効化合物は医薬品添加物と一緒に組み込み、錠剤、トローチ、又はカプセルの形で用いることができる。経口用組成物はさらに、含嗽剤として利用するために流動性担体を用いて調製してもよく、この場合この流動性担体中の化合物は経口投与され、スイッシュ（原語：swish）、喀出、又は嚥下される。薬学的に適合性ある結合剤、及び/又はアジュバント材料を、組成物の一部として含めてもよい。錠剤、丸剤、カプセル、トローチ等は、以下の成分：即ち、例えば微小結晶セルロース、トラガカントゴム又はゼラチンなどの結合剤；でんぷん又は乳糖などの医薬品添加剤、アルギン酸、プリモゲル、又はコーン・スターチなどの崩壊剤；ステアリン酸マグネシウム又はステロートなどの潤滑剤；コロイド状二酸化珪素などの推進剤；シヨ糖又はサッカリンなどの甘味料；ペパーミント、サリチル酸メチル、又はオレンジ甘味料などの着香料、か、又は同様な性質の化合物のいずれを含有してもよい。

10

【0121】

吸入による投与の場合、二酸化炭素などの気体などの適した噴射剤を含有する加圧容器又はディスペンサ、又はネブライザから、エーロゾル・スプレーの形で化合物を送達する。

【0122】

全身投与は経粘膜もしくは経皮手段によってもよい。経粘膜もしくは経皮投与の場合、透過させようとする障壁に適当な浸透剤を、製剤中に用いる。このような浸透剤は一般に当該分野で公知であるが、例えば経粘膜投与用には、界面活性剤、胆汁酸塩、及びフシジン酸誘導体がある。経粘膜投与は鼻孔用スプレー又は座薬の利用を通じて行うことができる。経皮投与には、有効化合物を当該分野で広く公知の軟膏、軟膏剤、ゲル又はクリームに調合する。

20

【0123】

また化合物を、直腸送達用の座薬（例えばココア・バター及び他のグリセリドなどの従来の座薬用基剤を用いて）又は停留浣腸剤の形で調製することもできる。

【0124】

一の実施態様では、インプラント及びマイクロ封入送達系を含め、制御放出製剤など、身体から化合物が急速に失われないようにする担体と一緒に、有効化合物を調製する。エチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、及びポリ乳酸など、生分解性で生体適合性のあるポリマーを利用してもよい。このような製剤の調製法は当業者に明白である。材料はアルザ・コーポレーション及びノバ・ファーマシューティカルズ社から市販のものを利用できる。リポソーム懸濁液（感染細胞を狙うようウィルス抗原に対するモノクローナル抗体で標的決めしたリポソームを含む）も、薬学的に許容可能な担体として利用できる。これらは、例えば米国特許第4,522,811号に解説されているように、当業者に公知の方法に基づいて調製できる。

30

【0125】

投与が簡単なよう、かつ投薬量が均一になるように、単位剤形で経口もしくは非経口組成物を調合すると、特に有利である。ここで用いる単位剤形とは、治療しようとする対象の一回ごとの投薬量として合わせた物理的に個別の単位を言う。このとき各単位は、必要な薬剤担体との関連から所望の治療効果を生じるよう計算された所定量の有効化合物を含有する。本発明の単位剤形の詳細は、有効化合物に固有の特徴や、達成しようとする特定の治療効果、及び、個人を治療するためのこのような有効化合物を配合する当業に内在する限界の制約を受け、またこれらに直接依存する。

40

【0126】

本発明の有効化合物の投与は、予防目的又は治療目的のいずれであってもよい。従って、一実施態様では、「治療上有効な用量」とは、投与を受ける患者において生理学的に検出

50

可能な変化をもたらすのに十分な量の有効化合物を言う。一実施態様では、治療上有効な用量とは、炎症及び/又は免疫応答の修飾を得るのに十分な有効化合物量を言う。別の実施態様では、治療上有効な用量とは、炎症及び/又は免疫系疾患の症状を寛解させるのに十分な有効化合物量を言う。別の実施態様では、治療上有効な用量とは、炎症及び/又は免疫系応答を妨げるのに十分な有効化合物量を言う。さらに別の実施態様では、治療上有効な用量とは、ここに解説したインテグリン活性（例えばシグナリング活性、接着活性又はリガンド結合活性）を修飾するのに十分な有効化合物量を言う。

**【0127】**

このような化合物の毒性及び治療効果は、例えばLD50（集団の50%にとって致命的な用量）及びED50（集団の50%において治療上有効な用量）を調べるなどの、細胞培養又は実験動物による標準的な薬学的手法により決定することができる。毒性効果対治療効果の用量比が治療指数であり、比LD/ED50で表すことができる。大きな治療指数を呈する化合物が好適である。毒性の副作用を呈する化合物を用いてもよいが、非感染細胞へのダメージを抑え、ひいては副作用を軽減するためには、感染組織部位へこのような化合物をターゲティングする送達系をデザインするよう、配慮が必要である。

10

**【0128】**

細胞培養アッセイ及び動物実験で得られるデータは、ヒトで用いる投薬量範囲を設定する上で利用することができる。このような化合物の用量は、好適には、毒性が小さいかもしくははないような、ED50を含む血中濃度範囲内であるとよい。投薬量は、用いる剤形及び利用する投与経路に応じて、この範囲内で様々であってよい。本発明の方法で用いる化合物の場合、まず細胞培養アッセイで治療上の有効量を推測することができる。動物モデルで用量を設定して、細胞培養で調べたときにIC50（即ち、症状の半分-最大を抑制するようなテスト化合物濃度）を含む血中血漿濃度範囲が得られるようにしてもよい。このような情報は、ヒトに応用できる用量をより精確に決定するのに、利用できる。血漿中のレベルは、例えば高速液体クロマトグラフィーで測定してもよい。

20

**【0129】**

ここで定義するように、抗体、タンパク質又はポリペプチドの治療上有効な量（即ち有効量）は、約0.001乃至30mg/kg体重、好ましくは約0.01乃至25mg/体重1kg、より好ましくは約0.1乃至20mg/体重1kg、そしてさらにより好ましくは約1乃至10mg/kg、2乃至9mg/kg、3乃至8mg/kg、4乃至7mg/kg、又は5乃至6mg/体重1kgの範囲である。上記の値の中間の範囲も、本発明の一部として意図されたところである。例えば、上に挙げた値のいずれかを、上限及び/又は下限値として組み合わせる用いた範囲も包含されるものと、意図する。

30

**【0130】**

当業者であれば、疾患又は障害の重症度、治療歴、対象の全身の健康及び/又は年齢、及び現在の他の疾患、を含め、しかしこれらに限らず、いくつかの因子が、対象を効果的に治療するのに必要な投薬量を左右するであろうことを、認識するであろう。さらに、あるタンパク質、ポリペプチド、又は抗体の治療上有効な量による対象の治療には、一回の処置を含めることができるが、又は好ましくは一連の処置を含めることもできる。

**【0131】**

ある好適な実施態様では、約0.1乃至20mg/体重1kgの範囲の抗体、タンパク質、又はポリペプチドで、1週当たり1回を約1乃至10週間、好ましくは2乃至8週間、より好ましくは約3乃至7週間、そしてさらにより好ましくは約4、5、又は6週間、対象を処置する。さらに、処置に用いる抗体、タンパク質、又はポリペプチドの有効量は、特定の処置経過にわたって増減させてもよいことも理解されよう。投薬量を変更してもよく、投薬量の変更は、ここに解説する診断検定の結果から明白となるであろう。

40

**【0132】**

別の好適な実施態様では例えば、開いたもしくは活性コンホメーションのインテグリンのI-ドメインと反応又は結合する抗LFA-1抗体などの抗インテグリン抗体か、又は、改変LFA-1 I-ドメインと反応もしくは結合する抗LFA-1抗体などの抗インテグリン抗体を、治療上

50

有効量、初回投与して対象を処置し、次に、前記抗体の初回投薬量の100%未満の治療上有効量の抗体を、日毎で計算して間欠的に投与する。このとき、前記抗体は、後続の投薬中、1週間当たり1回を越えて投与されない。別の実施態様では、後続の投薬は1週間当たり2回以上である。別の実施態様では、後続の投薬は2週間毎に1回以上である。別の実施態様では、後続の投薬は3週間毎に1回以上である。別の実施態様では、後続の投薬は4週間毎に1回以上である。一の実施態様では、後続の投薬は、一日単位で計算して、当該抗体の初回の投薬量の約50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、又は1%未満である。一の実施態様では、初回の投薬量は、0.001乃至30 mg/体重1kg、好ましくは約0.01乃至25 mg/体重1kg、より好ましくは約0.1乃至20 mg/体重1kg、そしてさらにより好ましくは約1乃至10 mg/kg、2乃至9 mg/kg、3乃至8 mg/kg、4乃至7 mg/kg、又は5乃至6 mg/体重1kg、の間である。一の好適な実施態様では、初回の投薬量は、0.3 mg/体重1kg未満、例えば0.001乃至0.30の間、例えば0.1、0.125、0.15、0.175、0.2、0.225、0.25、及び0.275など、である。上記の値の中間の範囲も、本発明の一部と意図する。

10

**【0133】**

さらに別の実施態様では、例えば開いたもしくは活性コンホメーションのインテグリンのI-ドメインと反応又は結合する、抗LFA-1抗体などの抗インテグリン抗体か、又は、改変LFA-1 I-ドメインと反応もしくは結合する抗LFA-1抗体などの抗インテグリン抗体を、治療上有効量、初回投与して対象を処置し、次に、前記抗体の初回投薬量の100%を越える治療上有効量の抗体を、日毎で計算して間欠的に投与する。このとき、前記抗体は、後続の投薬中、1週間当たり1回を越えて当該哺乳動物に投与されない。別の実施態様では、後続の投薬は1週間当たり2回以上である。別の実施態様では、後続の投薬は2週間毎に1回以上である。さらに別の実施態様では、後続の投薬は3週間毎に1回以上である。さらに別の実施態様では、後続の投薬は4週間毎に1回以上である。ある実施態様では、初回の投薬量は、0.001乃至30 mg/体重1kg、好ましくは約0.01乃至25 mg/体重1kg、より好ましくは約0.1乃至20 mg/体重1kg、そしてさらにより好ましくは約1乃至10 mg/kg、2乃至9 mg/kg、3乃至8 mg/kg、4乃至7 mg/kg、又は5乃至6 mg/体重1kg、の間である。ある好適な実施態様では、初回の投薬量は、0.3 mg/体重1kg未満、例えば0.001乃至0.3の間であり、例えば0.1、0.125、0.15、0.175、0.2、0.225、0.25、及び0.275、である。上記の値の中間の範囲も、本発明の一部と意図する。抗LFA-1などの抗インテグリン抗体の投薬量は、例えば米国特許第5,622,700号に解説されている。

20

30

**【0134】**

さらに別の実施態様では、初回の投薬量の次に、同じ投薬量を、例えば後続の投薬中、1週間毎に1回を越えずに行う。別の実施態様では、後続の投薬は一週間当たり2回以上である。別の実施態様では、後続の投薬は2週間毎に1回以上である。さらに別の実施態様では、後続の投薬は、3週間毎に1回以上である。さらに別の実施態様では、後続の投薬は、4週間毎に1回以上である。

**【0135】**

抗LFA-1などの抗インテグリン抗体の投薬量は、例えば米国特許第5,622,700号に解説されている。

40

**【0136】**

別の実施態様では、有効量の抗炎症性又は免疫抑制性の薬剤を、哺乳動物に対し、同時又は異なる時点で、本抗体と組み合わせて投与する。

**【0137】**

本発明は、インテグリン活性を修飾する有効な作用薬を包含するものである。作用薬は例えば小分子であるかも知れない。例えば、このような小分子には、限定はしないが、ペプチド、ペプチドミメティック、アミノ酸、アミノ酸類似体、ポリヌクレオチド、ポリヌクレオチド類似体、ヌクレオチド、ヌクレオチド類似体、分子量が1モル当たり約10,000グラム未満の有機もしくは無機の(即ちヘテロ有機及び有機金属化合物を含む)化合物、分子量が1モル当たり約5,000グラム未満の有機もしくは無機の化合物、分子量が1モル当

50

たり約1,000グラム未満の有機もしくは無機の化合物、分子量が1モル当たり約500グラム未満の有機もしくは無機の化合物、並びにこのような化合物の塩、エステル、及び薬学的に許容可能な他の形、がある。小分子作用薬の適当な用量は、当業の担当医、獣医、又は研究者の知る範囲の数多くの因子に依存すると、思われる。小分子の用量は、例えば、治療しようとする対象又はサンプルのアイデンティティ、大きさ、及び状態に依存し、またさらに該当すれば当該組成物を投与する経路に応じて、さらに本発明の核酸又はポリペプチドに対して当該小分子が有するとよいと担当医が思う作用に応じて変動するであろう。

【0138】

用量の例には、対象もしくはサンプルの体重1キログラム当たりの小分子の量ミリグラム又はマイクログラム量（例えば1キログラムあたり約1マイクログラムから、1キログラムあたり約500ミリグラム、1キログラムあたり約100マイクログラムから1キログラムあたり約5ミリグラム、又は、1キログラムあたり約1マイクログラムから1キログラムあたり約50マイクログラム）がある。さらに、小分子の適当な用量は、修飾しようとする発現又は活性に対する、小分子の効力に依存するとも考えられる。このような適当な用量は、ここに解説した検定を用いて調べることができる。本発明のポリペプチド又は核酸の発現又は活性を修飾するために、これらの小分子の一つ又はそれ以上を動物（例えばヒト）に投与する場合、担当医、獣医又は研究者は、例えば、まず比較的到低い用量を処方し、その後適当な応答が得られるまでこの用量を増加させていってもよい。加えて、特定の対象動物にとっての特定の用量レベルは、用いる特定の化合物の活性、対象の年齢、体重、全身の健康状態、性別、及び食事、投与期間、投与経路、排出速度、薬剤の組合せ、及び、修飾しようとする発現又は活性の程度、を含む多様な因子に依存することであろうと理解される。

【0139】

本発明のいくつかの実施態様では、インテグリン活性のモジュレータを、他の薬剤（例えば小分子）と組み合わせて、又は別の補足的な治療計画と連携させて、投与する。例えばある実施態様では、インテグリン活性の阻害物質を用いて、炎症性もしくは免疫系疾患を治療する。従って、対象をインテグリン活性の阻害物質で処置し、さらに抗炎症性薬剤又は免疫抑制剤で処置してもよい。

【0140】

さらに、例えば抗LFA-1抗体などの抗体（又はそのフラグメント）を、細胞毒、治療薬又は放射性金属イオンなどの治療部分に結合させてもよい。本発明の複合体は、任意の生物学的応答を調節するのに利用でき、また当該薬剤部分は、伝統的な化学治療薬に限られるとみなしてはならない。例えば、当該薬剤部分は、所望の生物活性を持つタンパク質又はポリペプチドであってもよい。このようなタンパク質には、例えば、組織因子などの凝固因子；血管内皮細胞成長因子（「VEGF」）、血小板由来成長因子、及び組織プラスミノゲン活性化因子などのタンパク質、例えばリンホカイン、サイトカイン及び成長因子などの生物学的応答調節因子；又はトキシンなどが含まれよう。

【0141】

このような治療部分を抗体に結合させる技術は公知であり、例えば Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in *Controlled Drug Delivery (2nd Ed.)*, Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pincher et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), and Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.*, 62:119-58 (1982)を参照された

10

20

30

40

50

い。あるいは、抗体を二次抗体に結合させると、シーガル氏が米国特許第4,676,980号に解説した抗体ヘテロ結合抗体を形成することができる。

【0142】

高親和改変インテグリンI-ドメインポリペプチド又はその活性フラグメントなどをコードする核酸分子など、本発明の核酸分子を単独で遺伝子ベースの治療に用いることもできるが、又は、ベクターに挿入して遺伝子治療ベクターとして用いてもよい。遺伝子治療は、患者の細胞に機能遺伝子を挿入して、(i)代謝の先天異常を補正したり、又は(ii)細胞に新しい機能を提供する、ことである (Kulver, K. W., "Gene Therapy", 1994, p. xii, Mary Ann Liebert, Inc., Publishers, New York, N.Y.)。ウィルスベクタなどのベクタを用いると、当該遺伝子が天然では存在しないような体内位置などに、哺乳動物で通常発現している遺伝子を導入し、安定に発現させることができよう。遺伝子治療ベクタは、例えば静脈注射、局所投与(例えば米国特許第5,328,470号を参照されたい)又は定位注射(例えばChen et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3054-3057)などにより、対象に送達することができる。遺伝子治療ベクタには、例えば、対象で*in vivo*で免疫応答を誘導するための目的抗原をコードするDNAなどを含めることができる。従って、高親和改変インテグリンI-ドメインポリペプチド又はその活性フラグメントなどの改変インテグリンI-ドメインポリペプチドは、抗原に対する亢進した抗体反応を生ずるアジュバントとして働く。遺伝子治療ベクタの医薬製剤には、許容可能な希釈剤に入れた遺伝子治療ベクタを含めることができ、あるいは、遺伝子送達媒体を包埋した徐放型マトリックスを含めることもできる。あるいは、完全な遺伝子送達ベクタをレトロウィルスベクタなどの組換え細胞からインタクトで作製する場合、当該医薬製剤には、遺伝子送達系を形成する一つ又はそれ以上の細胞を含めてもよい。

【0143】

また本発明の核酸分子は、炎症性疾患などのインテグリン媒介疾患の治療的もしくは予防的処置のためのDNAワクチン製剤中にも、利用できる。一の実施態様では、本DNAワクチン製剤は、改変インテグリンI-ドメインポリペプチド又はそのフラグメントなど、改変インテグリンポリペプチドをコードする核酸分子を、抗原性成分をコードするDNAなどの抗原性成分に共役させたものを含んで成る。ここで用いる抗原性成分とは、特異抗体に十分な高親和性で結合することで検出可能な抗原-抗体複合体を形成することのできる部分である。別の実施態様では、本DNAワクチンは薬学的に許容可能な担体をさらに含んで成る。

【0144】

本医薬組成物を、容器、パック、又はディスペンサに、投与の際の注意書きと一緒に封入してもよい。

【0145】

処置の方法

本発明は、炎症性もしくは免疫疾患、及び/又は、細胞増殖性疾患など、インテグリン媒介疾患の危険性があるか、又は、インテグリン媒介疾患を有する対象を処置する予防法及び治療法の両方を提供するものである。ここで用いる「処置」とは、疾患もしくは異常、疾患もしくは異常の症状、又は疾患又は異常への素因を有する患者に対し、前記疾患もしくは異常、疾患もしくは異常の症状、又は疾患又は異常への素因を治癒させる、直す、寛解させる、軽減する、変化させる、治療する、改善させる、向上させるもしくは影響を与える目的で、治療薬を適用もしくは投与すること、又は、患者の摘出組織もしくは細胞株へ治療薬を適用もしくは投与すること、と定義される。治療薬には、限定はしないが、核酸分子、DNAワクチン、遺伝子ベースの治療法、改変I-ドメインポリペプチドと反応もしくは結合する小分子、ペプチド、抗LFA-1抗体などの抗体、リボザイム及びアンチセンスオリゴヌクレオチド、が含まれる。

【0146】

予防的処置法及び治療的処置法の両方に関しては、このような処置を、ファーマコゲノミクス分野で得られた知見に基づき、特異的にテーラー・メードにしたり、又は改良して

10

20

30

40

50

もよい。ここで用いる「ファーマコゲノミクス」とは、遺伝子配列決定、統計学的遺伝学、及び臨床開発中及び市場にある薬剤に対する遺伝子発現解析、などのゲノミクス・テクノロジーの応用を言う。より具体的には、この用語は、ある患者の遺伝子が、薬物に対してどのような応答をするか（例えば、患者の「薬物応答表現型」、又は「薬物応答遺伝子型」など）を調べる研究を言う。このように、本発明の別の局面では、個人の薬物応答遺伝子型に基づいて、本発明のインテグリンI-ドメインポリペプチド又はそのモジュレータのいずれかを用いた個人の予防的処置法又は治療的処置法をテーラーする方法を提供する。ファーマコゲノミクスにより、臨床医又は担当医は、当該処置から最も大きな利益を得るであろう患者に予防的もしくは治療的処置のターゲットを決め、そして薬物の関連する毒性の副作用が出るであろう患者の処置を避けることができる。

10

#### 【0147】

##### 1. 予防の方法

一の局面では、本発明は、本発明のインテグリンI-ドメインポリペプチド又はそのモジュレータを一種又はそれ以上、対象に投与することにより、対象におけるインテグリン媒介異常に関連する疾患又は状態を防ぐ方法を提供するものである。インテグリン媒介異常の危険性のある対象は、例えば、ここに解説する診断検定又は予後検定のいずれか又は組み合わせで、特定することができる。予防的作用薬の投与は、インテグリン媒介疾患の特徴を示す症状が発現する前に行って、疾患又は異常が防がれるか、又は、その進行が遅れるようにしてもよい。インテグリン媒介疾患の種類に応じて、例えば、本発明の適当なインテグリンI-ドメインポリペプチド又はそのモジュレータを、対象を治療するのに利用することができる。この適当な作用薬は、ここに解説するスクリーニング検定に基づいて決定することができる。

20

#### 【0148】

##### 2. 治療の方法

本発明の別の局面は、治療を目的として、インテグリンI-ドメインポリペプチドの発現又はそれらの活性を修飾する（例えば、炎症性もしくは免疫疾患、及び/又は細胞増殖性疾患などのインテグリン媒介疾患の危険性があるか、又は、インテグリン媒介疾患を有する対象を治療するなど）方法に関するものである。従って、一実施態様では、本発明の修飾法は、本発明の一種又はそれ以上のインテグリンI-ドメインポリペプチド、又はその一種又はそれ以上のモジュレータ、例えば、開いたコンホメーションのインテグリンI-ドメインと反応又は結合する抗体など、や、開いたコンホメーションのLFA-1 I-ドメインもしくは改変LFA-1 I-ドメインポリペプチドに特異的な抗LFA-1抗体などの改変インテグリンI-ドメインポリペプチドなど、に細胞を接触させるステップを含む。インテグリンI-ドメインポリペプチド活性を修飾する作用薬は、例えば核酸又はタンパク質、インテグリンI-ドメインポリペプチドの標的分子（例えば基質）、改変インテグリンI-ドメインポリペプチドと反応もしくは結合する抗体、インテグリンI-ドメインポリペプチドアゴニストもしくはアンタゴニスト、インテグリンI-ドメインポリペプチドアゴニストもしくはアンタゴニストのペプチドミメティック、又は他の小分子など、ここに解説した作用薬とすることができる。一実施態様では、本作用薬は一種又はそれ以上のインテグリンI-ドメインポリペプチド活性を刺激するものである。このような刺激性作用薬の例には、活性インテグリンI-ドメインポリペプチドタンパク質や、細胞に導入してある、インテグリンI-ドメインポリペプチドをコードする核酸分子がある。別の実施態様では、本作用薬は、一種又はそれ以上のインテグリンI-ドメインポリペプチド活性を阻害するものである。このような阻害性作用薬の例には、アンチセンスインテグリンI-ドメインポリペプチド核酸分子、遺伝子治療ベクタ、DNAワクチン、抗インテグリンI-ドメインポリペプチド抗体、及びインテグリンI-ドメインポリペプチド阻害剤、がある。これらの修飾法はインビトロで（例えば細胞を当該作用薬と一緒に培養するなどにより）行っても、又はその代わりにインビボで（例えば当該作用薬を対象に投与するなどにより）行ってもよい。従って、本発明は、インテグリン媒介疾患に関連する特徴とする疾患又は異常に罹患した個体を処置する方法を提供するものである。ある実施態様では、本方法は、インテグリンI-ドメインポリペプチ

30

40

50

ド発現又は活性を修飾（例えば上方調節又は下方調節）する作用薬（例えばここに解説するスクリーニング検定で同定した作用薬など）又は作用薬の組合せを投与することを含む。

【0149】

### 3. ファーマコゲノミクス

本発明のインテグリンI-ドメインポリペプチド分子や、インテグリンI-ドメインポリペプチド活性（例えばインテグリンI-ドメインポリペプチドの遺伝子発現）に対する刺激性もしくは阻害性作用を有することが、ここに解説するスクリーニング検定で判明した作用薬、又はモジュレータは、炎症性もしくは免疫疾患、及び/又は、細胞増殖性疾患などのインテグリン媒介疾患を処置（予防的もしくは治療的に）するために、個体に投与することができる。このような処置と関連して、ファーマコゲノミクス（即ち、個体の遺伝子型と、その個体の外来化合物又は薬物に対する応答との間の関係の研究）を考慮してもよい。治療薬の代謝の違いが原因で、薬理的に活性な薬物の用量と血中濃度との関係が変化して、重篤な毒性もしくは治療上の失敗が起きる可能性がある。このように、担当医又は臨床医は、インテグリンI-ドメインポリペプチド分子（及び/又はそのモジュレータ）を投与するかどうかを決定したり、このような分子及び/又はモジュレータによる処置の投薬量及び/又は治療計画を調整する上で、関連するファーマコゲノミクス研究で得られた知見を応用することを考慮してもよい。

10

【0150】

ファーマコゲノミクスでは、薬物の性質が変化したり、患者で異常な働きをすることを原因とする、薬物に対する応答の臨床上有意な遺伝的ばらつきを扱う。例えばEichelbaum, M. et al. (1996) Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 23(10-11): 983-985 and Linder, M. W. et al. (1997) Clin. Chem. 43(2):254-266を参照されたい。一般的には、二種類の薬理遺伝学的条件を区別できる。即ち、薬物が身体に作用する態様の違いを生ずる（薬物作用の違い）単一の因子として伝えられる遺伝的条件、又は、身体が薬物に働きかける態様の違いを生ずる（薬物代謝の違い）単一の因子として伝えられる遺伝的条件、である。これらの薬理遺伝学的条件は、まれな遺伝的欠陥として起きたり、又は、天然発生型の多型現象として起きたりする。例えば、グルコース-6-リン酸アミノペプチダーゼ欠損症（G6PD）は、よくある遺伝性酵素欠損症であり、その主な臨床上の合併症は、酸化剤薬物（抗マラリア剤、スルホンアミド、鎮痛剤、ニトロフラン）の摂取後及びソラマメ摂取後の溶血である。

20

30

【0151】

「ゲノム-ワイド-アソシエーション（原語：genome-wide association）として公知の、薬物応答を予測する遺伝子を同定するファーマコゲノミクスのアプローチの一つは、既知の遺伝子関連マーカ（例えば、それぞれが二つのバリエーションを有する、ヒトゲノム上で60,000乃至100,000箇所の多型性もしくは可変部位から成る「バイ-アレルック」遺伝子マーカマップなど）から成るヒトゲノムの高解像度マップに主に依拠するものである。このような高解像度遺伝子マップを、第2相/3相薬物治療に参加する統計上有意な数の患者のそれぞれのゲノムのマップと比較すると、観察された特定の薬物応答又は副作用に伴うマーカを特定することができる。あるいは、このような高解像度マップは、ヒトゲノム中の数千万の公知の単一塩基多型（SNP）を組み合わせて作製することもできる。ここで用いる「SNP」とは、ある範囲のDNA中の一個のヌクレオチド塩基に起き得るごく普通の変化である。例えば、SNPはDNAの1000塩基毎に一回、あると思われる。SNPは疾患のプロセスに関与していることもあるが、大半は疾患に関係ないであろう。このようなSNPの存在に基づいた遺伝子マップを基に、個々のゲノム中のSNPの特定のパターンに応じて、個体を遺伝子カテゴリーに分類することができる。このような方法で、このような遺伝子上似た個体間で共通であろう形質を考慮に入れながら、遺伝子的に似た個体群に合わせて、治療計画をテーラーメイドすることができる。

40

【0152】

実例として、薬物代謝酵素の活性は、薬物作用の強さ及び持続性の両方の主要な決定因子

50

である。薬物代謝酵素（例えばN-アセチルトランスフェラーゼ2（NAT2）及びチトクロームP450酵素CYP2D6及びCYP2C19）の遺伝子多型の発見により、標準的かつ安全な用量の薬物を摂取した後の患者の中に、予測通りの薬物効果が得られなかったり、又は、過剰な薬物応答が起きて重篤な毒性を呈するような者がなぜいるかが、解明された。これらの多型は、集団中で、高代謝群（EM）及び低代謝群（PM）という二つの表現型で表される。PMの頻度は集団によって異なる。例えば、CYP2D6をコードする遺伝子は多型性が高く、いくつかの変異がPMで判明しているが、そのいずれも機能的CYP2D6の欠損を起こす。CYP2D6及びCYP2C19による低代謝群は、標準的用量を摂取しても、過剰な薬物応答及び副作用を頻繁に起こす。代謝産物が有効治療成分の場合、PMは、CYP2D6がコデインから形成する代謝産物モルヒネの鎮痛効果で実証されるような、治療上の応答を示さない。反対の極端な例は、標準的用量では応答を生じないいわゆる超高代謝群である。最近、超高代謝群の分子的機序が解明されて、CYP2D6遺伝子の増幅が原因であることが分かった。

10

## 【0153】

あるいは、「遺伝子発現プロファイリング」と呼ばれる方法を用いて、薬物応答を予測する遺伝子を同定することもできる。例えば、ある薬物（例えばインテグリンI-ドメインポリペプチド分子又はインテグリンI-ドメインポリペプチドモジュレータ）を投薬した動物の遺伝子発現が、毒性に関係する遺伝子経路のスイッチが入ったかどうかを示す指標となることがある。

## 【0154】

上のファーマコゲノミクスのアプローチのうちの一つ以上から得られた情報を、個人の予防的もしくは治療的処置に適切な投薬量及び処置計画を決定するのに利用してもよい。この知見を、投薬量又は薬物の選択に利用すると、インテグリンI-ドメインポリペプチド分子や、ここで解説したスクリーニング検定例の一つで同定されたモジュレータなどのそのモジュレータで対象を処置したときの薬害反応又は治療の失敗を防ぎ、ひいては、治療もしくは予防効率を高めることができる。

20

## 【0155】

以下の実施態様では本発明をさらに解説するが、以下の例を限定的なものと捉えられてはならない。本出願を通じて引用された全参考文献、特許及び公開済み特許出願の内容や、図面及び配列表を、引用をもってここに援用することとする。

## 【0156】

## 実施例

実施例1 開いたもしくは閉じたコンホメーションで固定したLFA-1及びMac-1変異型のデザイン

LFA-1 Iドメインの現在の結晶及びNMR構造(Qu, A and Leahy, DJ (1995) Proc Natl Acad Sci USA 92:10277-10281; Qu, A and Leahy, DJ (1996) Structure 4:931-942; Kallen, J et al. (1999) J Mol Biol 292:1-9)は、Mac-1 Iドメインの低親和性の閉じたコンホーマ(1jlm)と類似のコンホメーションを有している(Lee, J-O et al. (1995) Cell 80:631-638)。従って、Mac-1 Iドメインの高親和性の開いたコンホーマ(1ido) (Lee, J-O et al. (1995) Structure 3:1333-1340)を用いて、高親和性の開いたLFA-1 Iドメインのモデルを作製した。このモデルのテンプレートは、C骨格が1jlm構造とは著しく異なる領域の1ido構造部分と、1ido及び1jlmが類似である領域の1lfa構造部分とから成る。

40

## 【0157】

簡単に説明すると、以下のタンパク質データベース(PDB)同定記号: Mac-1、1ido及び1jlm (Lee, J-O et al. (1995) Structure 3:1333-1340; Lee, J-O et al. (1995) Cell 80:631-638); LFA-1、1lfa分子A及びB (Qu, A and Leahy, DJ (1995) Proc Natl Acad Sci USA 92:10277-10281)、1zon及び1zop (Qu, A and Leahy, DJ (1996) Structure 4:931-942); 及びVLA-2、1aox (Emsley, J et al. (1997) J Biol Chem 272:28512-28517)を持つIドメインを、Cカーボン、MODELLER 4のCD MALIGNアルゴリズム(Sali, A and Blundell, TL (1993) J Mol Biol 234:779-815)、1オングストロームのギャップ伸長ペナルティを用いて構造を重ねた。このアルゴリズムでは、重ねに用いられた121の

50

フレームワーク残基が見つかった。次に配列のアラインメントを行った。1ido 及び1jlm 構造をそれらの配列でアラインメントし、そして1lfa 分子 A 及び 1zon は1jlm に対する構造上の類似性でアラインメントした。構造の重層と配列のアラインメントを利用して、対応するの配列位置にあるすべての C 炭素同士の距離を、マイクロソフト・エクセル・スプレッドシートを用いて計算した。これは、1jlm と 1ido を比較するのと同等の意味になるが(Lee, J-O et al. (1995) Structure 3:1333-1340)、例外としてLFA-1 Iドメイン構造も含めた。高親和性の開いたLFA-1 Iドメインモデルのテンプレートとして用いるために、1lfa 分子Aのうちで、四つのIドメイン同士の間の違いが小さいか、又は、1lfa 及び1jlm (低親和性の閉じたLFA-1 及びMac-1 Iドメイン) 間の違いが1ido 及び1jlm 間(開いた及び閉じたMac-1 Iドメイン) よりも大きいような、いくつかのセグメントを選び出した。1ido からは、1ido と1jlm との違いが1lfa と1jlm との違いよりも大きいいくつかのセグメントを選び出した。これらのセグメントを、骨格ができるだけ同じになるような領域で一緒にスプライスした。このように、当該テンプレートは、1lfa のセグメントG128 から F136、M154 から L203、F209 からL234、T243 からI255、及びE272 からA282 ; 及び1ido のセグメント D140 からF156、G207 からT211、V238 から K245、R266 からR281、及びR293からK315を用いていた。LOOK™ (カリフォルニア州パロアルト、モラキュラー・アプリケーション・グループ) では、lfa-mac と呼ぶスプライス後のテンプレートに、鎖のちぎれは検出されなかった。高親和性の開いた形のLFA-1 のモデルを、MODELLER 4™ で、このテンプレートと、1ido のMg<sup>2+</sup>、水分子403 及び 404 を用い、ヘテロ原子、水、及び水素の添加を「入り」に、そしてクーロン力を「入り」にして、作製した。その結果得られたモデル(lfa\_hi.063)はテンプレート C 座標に近似していた (RMS = 0.12オングストローム)。QUACHK スコア (Vriend, G (1990) J Mol Graph 8:52-56) は優秀 (lfa-mac テンプレートでは-0.215、1ido では-0.08、そして1lfa では0.0とは対照的に、-0.135) だった。

#### 【 0 1 5 8 】

二つの適当な位置にある対の残基をシステインに変異させれば、ジスルフィド結合を導入できそうな位置を、SSBOND プログラム(Hazes, B and Dijkstra, BW (1988) Protein Engineering 2:119-125) を用いて特定した。LFA-1 Iドメインを開いたもしくは閉じたコンホメーションのいずれかに固定するのに、ジスルフィド結合を利用できるのではないかと、仮説を立てた。

#### 【 0 1 5 9 】

高親和性の開いたLFA-1 Iドメインモデル(lfa\_hi.063 モデル)と、二つの低親和性の閉じたLFA-1 Iドメイン構造である1lfa 及び1zonを、SSBOND で調べ、14 乃至19 対のこのような残基を各構造に見出した。これらのうち、高親和性の開いたモデルの対の残基と、低親和性の閉じた構造中の対の残基とが、二つのコンホーマのうちで大規模な移動を行った結果、ジスルフィド結合の形成は一方のコンホーマでしか起きなかった(図1)。これらのジスルフィドは、ストランド6をC末端 ヘリックス 6に架橋する。ストランド及び ヘリックスの番号は、Iドメイン間で異なる。我々は統一した命名法を用いている(Huang, C et al. (2000) J Biol Chem, 275:21514-24)。ヘリックス 6はその軸方向に、高親和性の開いた構造のIドメイン本体を下へ10オングストローム移動する。この移動には、6及び6間のループの完全なリモデリング及び下向きのシフトが伴う。K287及びK294の代わりに導入されるシステインは、高親和性の開いたコンホーマのみジスルフィドを形成するため、Iドメインを高親和性の開いた状態に固定するだろうと予測した(図2)。K287 及びK294のC 炭素は、高親和性の開いたモデル (lfa\_hi.063)では、ジスルフィド結合にとって理想的な3.41乃至4.25オングストロームの範囲内である3.8オングストローム、離れていると予測でき、C-S 及びS-S 距離を調べると、四つの好ましい側鎖ジスルフィドコンホメーションを有することが見出された。対照的に、低親和性の閉じたコンホーマ 1lfa 及び1zonでは、これらの残基のC 原子同士は8.9 乃至9.2オングストローム、離れている(図2)。

#### 【 0 1 6 0 】

L289及びK294の代わりに導入するシステインは、親和性の低い閉じたコンホーマ(図2)のみでジスルフィドを形成して、このドメインを低親和性の閉じた状態に固定すると予測された。L289及びK294のC-カーボン同士は、低親和性の閉じた1Ifa及び1zonコンホーマでは、好ましい範囲内である3.9乃至4.0オングストローム離れているが、好ましいシステイン側鎖コンホメーションは見つからなかった。しかしながら、残基294が存在するヘリックスは、1Ifa、1zon、及び最近のNMR構造(Qu, A and Leahy, DJ (1995) Proc Natl Acad Sci USA 92:10277-10281; Qu, A and Leahy, DJ (1996) Structure 4:931-942; Kallen, J et al. (1999) J Mol Biol 292:1-9)間で小さな変位を示し、ヘリックスを微調節すればジスルフィドが形成されるのではないかと予測された。対照的に、高親和性の開いたモデルでは、これらの残基のC-原子は、8.0オングストローム離れていると予測できる(図2)。

10

## 【0161】

予測上のシステインが存在し、適当な場合にはジスルフィド結合が形成されているようなモデルも、MODELLER 4のPATCH DISULFIDEルーチンを用いて構築した(図2)。しかし、ここで報告されているすべてのC-原子距離は、ジスルフィドを導入していないモデル又は構造に基づくものであることに注意されたい。

## 【0162】

コンホメーション特異的なジスルフィド架橋を形成するための対のシステイン置換を探すコンピュータ検索に加え、構造を基にした手動的方法(又は視覚的検査)も用いた。開いたコンホメーションと閉じたコンホメーションというコンホメーション間で異なるドメインの領域を検査して、一方のコンホメーションが他方のコンホメーションに比べてジスルフィドが形成され易いような、対のシステインを導入できそうな位置を探した。このように、コンホメーション上可動のC-末端ヘリックスの領域と、それに先行するループを調べて、一個のシステインを導入できそうな位置を探し、また構造上隣接する領域を調べて、ジスルフィド結合を形成するであろう第二のシステインを導入できそうな位置を探した。側鎖が互いに向かい合う対の残基を選んだ。これらの対のそれぞれのC-及びC-原子間の距離を、ソフトウェアLOOK<sup>TM</sup>で、開いた及び閉じたコンホメーションの両方で測定した。ジスルフィド結合が形成されるのに理想的なシステインC-カーボンの分離は3.41乃至4.25オングストロームであると報告されている。しかしながら、これらを測定した結晶構造又はモデルは、平均的なスナップショットの位置を示すものであり、他方、タンパク質は動的であり、その原子は可動性である。さらに、ジスルフィド結合を取り入れるよう、構造調節も可能である。シートよりもループ及びヘリックスの方が、はるかに多くの調節が可能であると期待できる。従って、残基の一つがループ内又はヘリックス内にあると、ジスルフィド形成に、より長い距離を持たせることができると予測した。

20

30

## 【0163】

Lの場合、C-C及びC-C距離が、開いたコンホメーションの方が閉じたコンホメーションよりもジスルフィド形成にとって、より好適になっている4対のシステイン置換が見つかった; E284C/E301C、L161C/F299C、K160C/F299C、及びL161C/T300C(表1)。

## 【0164】

Mの場合、C-C及びC-C距離が、開いたコンホメーションの方が閉じたコンホメーションよりもジスルフィド形成にとって、より好適になっている4対のシステイン置換が見つかった; Q163C/Q309C、Q298C/N301C、D294C/T307C、及びD294C/Q311c(表7)、そしてC-C及びC-Cの距離が、開いたコンホメーションより閉じたコンホメーションの方がジスルフィド形成にとって好適になっている1対のシステイン置換が見られた: Q163C/R313C。加えて、LでのK287C/K294Cの変異に相似のF297C/A304Cも含めた。

40

## 【0165】

実施例2 LFA-1システイン置換変異型の構築及び発現

5種の開いたL1-ドメイン変異型を作製した。高親和性の開いた変異型K287C/K294Cを

50

作製するために、 $\alpha$ LサブユニットのI-ドメインのK287及びK294をシステインに置換した。高親和性の開いた変異型E284C/E301Cを作製するには、 $\alpha$ LサブユニットのI-ドメインのE284及びE301をシステインに置換した。加えて、3種類の中間の親和性の開いた $\alpha$ L I-ドメイン変異型を作製したが、ここで以下： $\alpha$ L161C/F299C、K160C/F299C、及び $\alpha$ L161C/T300Cと特定しておく。 $\alpha$ L161C/F299Cは、 $\alpha$ L161及びF299をシステインに置換して作製した。K160C/F299Cは、K160及びF299をシステインに置換して作製した。 $\alpha$ L161C/T300Cは、 $\alpha$ L161及びT300をシステインに置換して作製した。低親和性の閉じた変異型L289C/K294Cは、L289及びK294をシステインに置換して作製した。これらの6種類の変異型の変異させた残基同士の距離を下の表1に示す。また、一箇所だけシステインを置換した変異型K287C、L289C及びK294Cも作製した。

【0166】

【表1】

表1. 開いた又は閉じたコンホメーションでの変異残基間の $C\alpha$ 及び $C\beta$

$\alpha$ L I-domain	開いた コンホメーション		閉じたコンホメーション	
	$C\alpha$ (Å)	$C\beta$ (Å)	$C\alpha$ (Å)	$C\beta$ (Å)
<u>開いた状態に固定</u>				
K287C/K294C	6.32	3.75	10.72	9.08
E284C/E301C	9.12	6.96	12.88	12.52
L161C/F299C	9.16	8.09	11.87	11.38
K160C/F299C	9.97	7.75	9.83	7.96
L161C/T300C	12.30	13.00	13.50	14.87
<u>閉じた状態に固定</u>				
L289C/K294C	7.90	7.96	6.19	3.86

開いたコンホメーション又は閉じたコンホメーションにおける野生型残基間の距離はLook<sup>TM</sup>ソフトウェアで測定した。

【0167】

ヒト $\alpha$ L cDNAをCDM8の誘導体であるベクタAprM8に入れた(Seed, B and Aruffo, A (1987) Proc Natl Acad Sci USA 84:3365-3369)。重複伸長PCR法を用いてシステイン置換変異を $\alpha$ L I-ドメインに起こした(Ho, SN et al. (1989) Gene 77:51-59; Horton, RM et al. (1990) BioTechniques 8:528)。PCR伸長反応の外側左側のプライマは、ベクタの配列に、1826位でEcoRI部位の5'末端に相補的であり、外側右側のプライマは、 $\alpha$ L cDNAのEcoRI部位の3'末端にあった。内側のプライマは、それぞれ個々の変異用にデザインされており、重複配列を含有していた。AprM8中の野生型 $\alpha$ L cDNAを、一回目のPCR反応のテンプレートとして用いた。二回目のPCR産物をEcoRIで消化し、AprM8中の野生型 $\alpha$ L cDNAの同じ部位に連結した。インサートの方向が正しいかを、制限酵素消化で確認した。変異はすべて、DNA配列決定法で確認した。

【0168】

安定に発現させるために、 $\alpha$ L野生型及び変異型のcDNAのXbaI断片を、安定発現ベクタpEFpuroの同じ部位にサブクローンした(Lu, C and Springer, TA. (1997) J Immunol 159:268-278)。

## 【 0 1 6 9 】

変異型の Lサブユニットを、 2サブユニットと一緒に293T細胞で一過的に共発現させ、 L / 2複合体の細胞表面上の発現を、 L / 2複合体中の Lサブユニットに対するモノクローナル抗体TS2/4を使ったフローサイトメトリで調べた。

## 【 0 1 7 0 】

簡単に説明すると、ヒト胚性腎293T細胞 (SV40で形質転換させたもの) を、10%ウシ胎児血清 (FBS)、2mMグルタミン及び50 µg/mlゲンタマイシンを添加したDMEM培地で培養した。293T細胞をリン酸カルシウム法を用いて一過的にトランスフェクトした (DuBridge, RB et al. (1987) Mol Cell Biol 7:379-387; Heinzl, SS et al. (1988) J Virol 62:3738-3746)。簡単に説明すると、プラスミドAprM8に入れた7.5 µgの野生型もしくは変異型 L cDNAと、AprM8に入れた7.5 µgの 2 cDNAを用いて、70乃至80%コンフルエントの細胞の1枚の6cmプレートを同時トランスフェクトした。トランスフェクト後2日目に、5mMのEDTAを含有するハंकス液 (H B S S) を用いてプレートから細胞を剥がし、LFA-1の発現を調べ、機能解析を行った。

## 【 0 1 7 1 】

既述(Lu, C and Springer, TA (1997) J Immunol 159:268-278)のようにフローサイトメトリ解析を行った。簡単に説明すると、細胞を洗浄し、2.5%FBSを添加したL15培地 (シグマ社製) (L15/FBS) 中に再懸濁させた。1 × 10 × 10<sup>5</sup>細胞を、100 µlのL15/FBS内の一次抗体と一緒に氷上で30分間、インキュベートした。モノクローナル抗体を、1:20のハイブリドーマ上清、1:200の腹水、又は10 µg/ml精製IgGの最終濃度になるように用いた。次に細胞をL15/FBSで2回、洗浄し、FITC結合ヤギ抗マウスIgG (重鎖及び軽鎖、カリフォルニア州サンフランシスコ、ザイメッド・ラボラトリーズ社製) と一緒に30分間、氷上でインキュベートした。洗浄後、細胞を低温のPBS中に再懸濁させ、FACSscan (カリフォルニア州サンホセ、ベクトン・ディッキンソン社製) で解析した。

## 【 0 1 7 2 】

図3Aに示すように、推定上の高及び低親和性の変異型と、システイン置換を一箇所のみした変異型とでは、発現した細胞表面 L / 2複合体は、同様なレベルであった。

## 【 0 1 7 3 】

システインの導入が、I-ドメインの全体的なコンホメーションに影響を与えるかどうかを調べるために、I-ドメインの様々な領域に対する一パネルのモノクローナル抗体を、I-ドメイン変異型との各々の反応性についてテストした。これらの研究で用いたモノクローナル抗体は以下の通りである：

## 【 0 1 7 4 】

マウス抗ヒト L (CD11a) モノクローナル抗体TS1/11、TS1/12、TS1/22、TS2/4、TS2/6 及びTS2/14；抗- 2(CD18)モノクローナル抗体TS1/18、CBRLFA-1/2、及びCBRLFA-1/7；mAb YFC51；及び非結合性のmAb X63が以前に解説されている (Sanchez-Madrid, F et al. (1982) Proc Natl Acad Sci USA 79:7489-7493; Hale, LP et al. (1989) Arthritis Rheum 32:22-30; Petruzzelli, L et al. (1995) J Immunol 155:854-866)。モノクローナル抗体BL5、F8.8、25-3-1、May.035、CBRLFA-1/9、CBRLFA-1/1、S6F、及びMay.017 は、Leukocyte Type V に解説されており、フィフス・インターナショナル・ロイコサイト・ワークショップから入手した。

## 【 0 1 7 5 】

モノクローナル抗体X63 及びTS1/11を、ハイブリドーマ上清の形で、1:20の希釈度で用い、モノクローナル抗体TS1/12、DBRLFA-1/2、CBRLFA-1/7 及びYFC51を、精製済みIgGとして、10 µg/ml用い、モノクローナル抗体TS1/2、TS2/14、TS1/18 及びTS2/4は腹水の形で、1:200の希釈度で用い、そしてフィフス・インターナショナル・ロイコサイト・ワークショップから得たモノクローナル抗体はすべて、1:200の希釈度で用いた。CBRLFA-1/1を除き、抗体はすべて、変異型K287C/K294C及びL289C/K294C と野生型 LFA-1に同等に良好に結合した (表2)。このことは、当該システイン置換が、I-ドメイン構造を破壊しなかったことを示唆している。モノクローナル抗体CBRLFA-1/1 の、高親和性の開いた変異

10

20

30

40

50

型K287C/K294C への結合は、野生型の40乃至50%に低下していたが、この抗体は変異型L289C/K294Cや、一箇所のみシステイン置換した変異型K287C、L289C及びK294Cとも、野生型とも反応した。抗体CBRLFA-1/1は残基301位～359位に位置し (Huang, C and Springer, TA (1995) J Biol Chem 270:19008-19016)、K287及びK294の一箇所のみシステイン置換は、この抗体の結合に影響しなかったため、CBRLFA-1/1の変異型K287C/K294Cへの結合の低下は間接的な効果であると思われる。従って、変異型 K287C/K294CのI-ドメインと -プロペラドメインとの間の界面におけるコンホメーションは、野生型LFA-1のそれとは異なるのであろう。

【0176】

Lの -プロペラドメインや 2サブユニットに対する抗体の、変異型K287C/K294C及びL289C/K294Cとの反応性は、野生型LFA-1のそれと同様であり、LFA-1分子の他のドメインの構造が変異の影響を受けていないことが確認できた。

【0177】

【表2】

表2. LFA-1 システイン置換変異型に対する抗体反応性(%対野生型の結合)

Mab	エピトープ	K287C/K294C		L298C/K294C		K287C		L289C		K294C	
		293T	K562	293T	K562	293T	K562	293T	K562	293T	K562
	I-ドメイン										
BL5	119-153, 185-215	92.4±11.29	92.39	85.79±16.4	97.61	93.35	92.44	88.31			
F8.8	119-153, 185-215	93.70	102.15	83.56	93.88	95.86	99.63	95.47			
CBRLFA-1/9	119-153, 185-215	ND	84.7	ND	ND	ND	ND	ND			
TS2/6	154-183	84.88±5.64	89.24	78.59±2.62	95.89	91.39	88.24	91.67			
May.035	185-215	92.61±8.4	92.59	82.14±14.15	101.10	95.8	95.4	106.39			
TS1/11	185-215	94.36	95.96	93.67	104.54	ND	ND	ND			
TS1/12	185-215	88.66	87.32	101.98	105.63	99.32	103.89	93.68			
TS1/22	185-302	95.85±12.04	93.06	90.96±8.11	110.49	102.99	96.21	92.24			
TS2/14	250-303	85.54±9.38	95.41	83.31±10.59	102.85	102.6	100.4	102.83			
25-3-1	250-303	93.06	88.48	90.93	85.66	ND	ND	ND			
CBRLFA-1/1	I 及びβプロペラ	43.59±0.58	55.53	95.89±7.74	118.44	86.11	93.32	89.41			
S6F1	β-プロペラ	89.39	97.38	95.32	85.69	98.3	86.39	92.34			
	β2サブユニット										
TS1/18	I 様ドメイン	99.82±10.47	97.42	95.72±4.67	105.71	87.88	87.35	107.58			
YFC51	I 様ドメイン	102.63	100.73	95.09	110.96	ND	ND	ND			
CLBLFA-1/1	I 様ドメイン	ND	96.48	ND	100.50	ND	ND	ND			
CBRLFA-1/7	C 末端領域	95.32	95.25	91.68	97.19	ND	ND	ND			

【 0 1 7 8 】

野生型LFA-1及びLFA-1変異型K287C/K294C、L289C/K294C、K287C、L289C、及びK294Cを、293T細胞の表面上に一過的に発現させるか、又はK562トランスフェクタント上で安定に発現させた。これらトランスフェクタントとの抗体の反応性をフローサイトメトリで調べた。各抗体の結合の平均蛍光をウェルで正規化した。結果を、野生型結合に対するパーセン

10

20

30

40

50

トで表す。データは少なくとも二つの独立したFCAS実験の平均 ± S Dである。いくつかの抗体では、実験を一回のみ行った。N Dは決定できずを示す。

【 0 1 7 9 】

実施例 3 LFA-1システイン置換変異型のリガンド結合活性

LFA-1システイン置換変異型のLFA-1リガンドICAM-1に対する結合能を調べた。野生型LFA-1と、推定上の高親和性の開いたI-ドメイン変異型K287C/K294Cを発現する293T細胞トランスフェクタントは、固定化ICAM-1に対して構成的に強い結合を示した(図4A)。対照的に、低親和性の閉じた変異型L289C/K294CはICAM-1に結合しなかった。システイン置換が一箇所である変異型K287C及びL289Cの呈するICAM-1への結合は低い、変異型K294Cの結合は野生型のそれに匹敵した。変異型K287C及びL289Cの結合は、活性化モノクローナル抗体CBRLFA-1/2により、野生型の結合と同様のレベルまで上昇した。しかしながら、CBRLFA-1/2は、低親和性の閉じた変異型L289C/K294CのICAM-1への結合を活性化できなかった(図4A)。同様な結果は、2種の他のLFA-1活性化モノクローナル抗体Kim127及びKim185でも得られた。推定上の高親和性の変異型K287C/K294C及び低親和性の閉じた変異型L289C/K294Cの機能をさらに研究するために、これらの変異型を発現する安定なK562トランスフェクタントを作製した。

10

【 0 1 8 0 】

簡単に説明すると、ヒト赤白血病細胞株K562をRPMI 1640、10% FBS 及び50 µg/ml ゲンタマイシン中で培養した。安定なK562細胞株を作製するために、LサブユニットcDNAを含有する2 µgのPvuI-直線化pEFpuroに、2サブユニットcDNAを含有する40 µgのSfiI-直線化AprM8を、250V及び960 µFでのエレクトロポレーションで同時トランスフェクトした。4 µg/mlのプロマイシン(シグマ社製)に対する耐性でトランスフェクタントを選択し、限界希釈でサブクローンした。安定な細胞株をすべて、4 µg/mlプロマイシンを添加したRPMI 1640、10% FBS中に維持した。

20

【 0 1 8 1 】

モノクローナル抗体TS2/4を用いたフローサイトメトリで調べたときに同様なレベルの細胞表面LFA-1を発現していたトランスフェクタントのクローン(図3B)を既述(Lu, C and Springer, TA (1997) J Immunol 159:268-278)のように、固定化ICAM-1への結合能についてテストした。

【 0 1 8 2 】

簡単に説明すると、既述(Lu, C and Springer, TA (1997) J Immunol 159:268-278)のように、ICAM-1をヒト口蓋扁桃から精製し、96穴プレートにコートした。細胞に蛍光染料2',7'-ビス-(カルボキシエチル)-5(及び-6)-カルボキシフルオレセイン、アセトキシメチルエステル(BCECF-AM)で標識し、 $1 \times 10^6$ /ml になるようにL15/FBS中に再懸濁させた。50 µlの細胞懸濁液を、ICAM-1でコートしたたウェルの中で、モノクローナル抗体(CBRLFA-1/2、10 µg/ml)を加えてもしくは加えずに、等量のL15/FBSと混合した。モノクローナル抗体は、最終濃度で、1:20のハイブリドーマ上清、1:200の腹水又は10 µg/mlの精製済IgGを用いた。2価陽イオンの効果をテストするために、BCECF-AMで標識した細胞を、5mMのEDTAを含有するTS緩衝液、pH7.5 (20 mM トリス、pH 7.5、150 mM NaCl)で2回、洗浄した後、TS 緩衝液、pH7.5で2回、洗浄した。次に細胞を、1 mM MgCl<sub>2</sub>/CaCl<sub>2</sub>、MgCl<sub>2</sub>、MnCl<sub>2</sub>又は5mM EDTAを添加した TS 緩衝液、pH7.5中に $5 \times 10^5$ /ml になるように、再懸濁させ、100 µlの細胞懸濁液を、ICAM-1でコートしたウェルに加えた。37 °Cで30分間インキュベートした後、結合しなかった細胞をマイクロプレート・オートワッシャ(ヴァーモント州ウィヌースキ、バイオ・テック・インスツルメンツ社製)で洗い落とした。各ウェル中の総投入細胞及び結合した細胞の蛍光量を、フルオレセント・コンセントレーション・アナライザ(メーン州ウェストブルック、IDEXX社製)で定量した。結合した細胞は、サンプルウェル当たりの総投入細胞のパーセンテージで表した。

30

40

【 0 1 8 3 】

野生型LFA-1を発現するK562トランスフェクタントが示したICAM-1への基礎結合量は低かったが、この結合は、活性化モノクローナル抗体 CBRLFA-1/2により大きく上昇した(図

50

4 B)。対照的に、推定上の高親和性の開いた変異型K287C/K294Cを発現している細胞は、ICAM-1に強く結合し、モノクローナル抗体CBRLFA-1/2によっても、この変異型の結合がそれ以上、高められることはなかったが、一方、推定上の低親和性の閉じた変異型L289C/K294Cは、活性化抗体が存在した場合でも、ICAM-1に結合しなかった。

【0184】

K562トランスフェクタントのICAM-1への結合に二価陽イオンが及ぼす作用も調べた。図4Cに示すように、変異型K287C/K294CのICAM-1への結合はEDTAがあると妨げられたことから、変異型K287C/K294Cのリガンド結合は二価イオン依存的であることが裏付けられた。他方、野生型LFA-1の結合は $Mn^{2+}$ があると大きく高まり、また $Mg^{2+}$ があっても程度は劣るが高まったが、低親和性の閉じた変異型L289C/K294Cのリガンドへの結合は、 $Mn^{2+}$ 及び $Mg^{2+}$ があっても増加しなかった。

10

【0185】

野生型LFA-1、変異型K287C/K294C、又は変異型L289C/K294Cを発現したK562トランスフェクタントへの可溶性ICAM-1の結合も評価した。簡単に説明すると、既述(Martin, S et al. (1993) J Virol 67:3561-3568)のように、ヒトICAM-1の5つのIgドメインを含有する可溶性ICAM-1-IgAキメラを、モノクローナル抗体R6.5アフィニティ・クロマトグラフィにより、安定なCHOトランスフェクタントの培養上清から精製した。K562トランスフェクタントをL15/FBSで一回、洗浄し、同じ緩衝液中に $1 \times 10^7$ /mlになるように再懸濁させた。25  $\mu$ lの細胞懸濁液を、抗体CBRLFA-1/2 (10  $\mu$ g/ml)を加えたもしくは加えない、ICAM-1-IgA融合タンパク質を最終濃度100  $\mu$ g/mlで含有する25  $\mu$ lのL15/FBSに混合し、37 で30分間、インキュベートした。インキュベート後、細胞をL15/FBSで一回、洗浄し、FITC結合抗ヒトIgA (シグマ社製)と一緒に室温で20分間、インキュベートした。2回洗浄後、細胞をPBS中に再懸濁させ、FACSscan (カリフォルニア州サンホセ、ベクトン・ディッキンソン社製)で解析した。

20

【0186】

図5に示すように、可溶性のICAM-1-IgA融合タンパク質は、高親和性の開いた変異型K287C/K294Cを発現している細胞に結合し、活性化モノクローナル抗体CBRLFA-1/2の存在下では、結合は更に増加した。しかしながら、ICAM-1融合タンパク質は、野生型LFA-1を発現していたトランスフェクタントにも、あるいは低親和性の閉じた変異型L289C/K294Cを発現していたトランスフェクタントにも、モノクローナル抗体CBRLFA-1/2が存在してもしなくとも結合しなかった。またICAM-1融合タンパク質濃度を高く(300  $\mu$ g/ml)しても、結合は検出されなかった。

30

【0187】

これらのデータをまとめると、高親和性の開いた変異型K287C/K294Cは、構成的に活性であるが、他方、低親和性の閉じた変異型L289C/K294Cは、不活性の状態で固定されており、リガンド結合能に欠けると思われる。

【0188】

別の研究では、L及び2サブユニットの様々なドメインに対する一パネルのモノクローナル抗体を、野生型LFA-1及び変異型K287C/K294Cのリガンド結合に及ぼすそれらの阻害作用について調べた。293T一過性トランスフェクタント及びK562安定トランスフェクタントで得られた結果は同様であり、表3に要約する。CBRLFA-1/1を除くすべての抗体は、高親和性の開いた変異型K287C/K294Cや野生型と反応した(表2)が、野生型LFA-1及び変異型K287C/K294Cのリガンド結合に対してこれらが示した阻害作用は異なった。

40

【0189】

図3に示すように、I-ドメイン抗体は、野生型LFA-1及び高親和性の開いた変異型K287C/K294CのICAM-1への結合を示差的に阻害した。モノクローナル抗体BL5、F8.8、CBRLFA-1/9、May.035、TS1/22及びTS2/6は、野生型及び変異型K287C/K294Cの両方の結合を強く阻害し、野生型LFA-1と変異型とに対する阻害のレベルは同様であった。モノクローナル抗体TS1/11及びTS1/12は、野生型LFA-1を発現するトランスフェクタントの結合の90%を超える結合を阻害した。一方、これらの抗体が、変異型K287C/K294Cに対して示す結合阻害

50

作用はそれより低かった(40~60%)。野生型の結合に対して90%を超える阻害を示したモノクローナル抗体TS2/14、25-3-1及びCBRLFA-1/1は、変異型K287C/K294CのICAM-1への結合はほとんど阻害しなかった。-プロペラドメイン抗体S6F1及びTS2/4と、2サブユニットのC末端領域に対する抗体CBRLFA-1/7は、野生型及び変異型K287C/K294Cの両方で結合を阻害しなかったが、2保存ドメインに対する5種の抗体TS1/18、YFC51、CLBLFA-1/1、May.017、及び6.5Eはすべて、野生型LFA-1の結合は阻害した(90%を超える阻害)が、変異型K287C/K294Cの結合は阻害しなかった。

## 【0190】

-プロペラドメインに対する抗体と、2のC末端領域に対する抗体は、野生型LFA-1の結合も、又は変異型K287C/K294Cの結合も阻害しなかった。サブユニットのI-様ドメインに対する抗体は、野生型LFA-1のICAM-1への結合を遮断したが、変異型K287C/K294Cは遮断しなかった。

## 【0191】

## 【表3】

表3. 固定化ICAM-1への野生型LFA-1及び変異型K287C/K294Cの結合に対する抗体阻害の差異

Mab	エピトープ	% 阻害			
		野生型 LFA-1		K287C/K294C	
		293T	K562 (+CBRLFA-1/2)	293T	K562
RR1/1	I-CAM-1	95.98	ND	97.89	ND
	I-domain				
BL5	119-153, 185-215	97.01±1.63	97.54	91.06±3.8	90.68±6.23
F8.8	119-153, 185-215	94.51	97.61	91.94	98.18
CBRLFA-1/9	119-153, 185-215	ND	97.83	ND	3.60
TS2/6	154-183	96.84±1.73	91.76±4.67	79.09±10.06	88.12±7.40
May.035	185-215	96.20±0.57	95.80±1.66	97.43±1.52	93.33±2.54
TS1/11	185-215	94.12	96.55	45.18	41.30
TS1/12	185-215	95.68±3.92	97.46±0.66	48.96±9.52	63.67±8.13
TS1/22	250-303	95.77	96.94±0.79	95.07	93.56±4.79
TS2/14	250-303	94.47±2.34	96.24±1.70	2.95±9.87	8.55±0.66
25-3-1	250-303	90.49	92.01±0.36	3.71	2.53±4.10
CBRLFA-1/1	I及びβプロペラ	92.52±1.68	94.69±5.22	9.03	2.85±4.90
S6F1	β-プロペラ	ND	6.19	ND	9.70
TS2/4	β-プロペラ	ND	6.99	ND	2.82
	β2サブユニット				
TS1/18	I様ドメイン	ND	98.48	ND	5.90
YFC51	I様ドメイン	ND	98.43	ND	0.08
CLBLFA-1/1	I様ドメイン	ND	94.63	ND	6.69
May.017	I様ドメイン	ND	97.76	ND	2.98
6.5E	I様ドメイン	ND	98.36	ND	5.79
CBRLFA-1/7	C末端領域	ND	5.04	ND	5.77

## 【0192】

野生型LFA-1及びLFA-1変異型K287C/K294Cを、293T細胞表面上で一過的に発現させるか、又は、K562トランスフェクタントで安定に発現させた。このトランスフェクタントの固定化ICAM-1への結合を、図示した抗体の存在下で調べた。野生型LFA-1を発現するK562トラ

ンスフェクタントの結合については、細胞を、10 µg/mlの活性化mAb CBRLFA-1/2と一緒に30分間、プレインキュベートした。図示のデータは、少なくとも二つの独立した実験の%阻害±SDである。%阻害は、図示のmAbの存在時に結合した細胞の%/非結合性mAbX63の存在時に結合した細胞の%×100、であると定義しておく。いくつかの抗体では、実験を一回のみ行った。しかし、各実験において、各抗体は三重反復試験し、三重試験試料の標準偏差は5%未満であった。NDは決定できずを表す。

#### 【0193】

まとめると、これらの結果は、I-ドメイン抗体の一部と、2保存ドメインに対する抗体は、LFA-1のICAM-1への結合を直接的には遮断しないこと、そして、高親和性の開いた変異型K287C/K294Cは、高親和性の開いた状態でコンホメーション上固定されていると思われ、従って、間接的な機序でリガンド結合を遮断するような抗体は、変異型K287C/K294CのICAM-1への結合を遮断しないであろうこと、を示唆している。

10

#### 【0194】

本発明の高親和性の開いたI-ドメインは、LFA-1の直接的/競合的な阻害と、間接的/非競合的な阻害との間を区別するのに利用できる。例えば、LFA-1阻害剤であるロバスタチンは、I-ドメインに、シートとC末端ヘリックスが形成する疎水性のポケットで結合する(Kallen, J et al. (1999) J Mol Biol 292:1-9)という、間接的な機序でLFA-1を阻害する。従って、高親和性I-ドメイン(K287C/K294C)のリガンド結合を阻害する上でのロバスタチンの阻害能を評価した。DMSOに溶解させた50mMのロバスタチンを検定緩衝液中に希釈した。BCECF-AMで標識した細胞(10<sup>6</sup>/ml)を、ロバスタチン(0乃至50 µM)と一緒に37°Cで15分間プレインキュベートした後、ICAM-1でコートした96ウェルプレートに移して、さらに37°Cで30分間、活性化モノクローナル抗体(CBR LFA1/2)又はMnCl<sub>2</sub>の存在下又は不在下でインキュベートした。Ca<sup>2+</sup>及びMg<sup>2+</sup>を含有するウシ胎児血清(L15/FBS)を添加したL15培地を、抗体CBR LFA1/2で活性化させた野生型L15細胞に用い、そして20 mM HEPES pH7.4、140 mM NaCl、1mM MnCl<sub>2</sub>、2 mg/ml グルコース、1% BSA を、Mn<sup>2+</sup>による活性化に用いた。

20

#### 【0195】

図6に示すように、ロバスタチンは、野生型LFA-1を発現しており、かつMn<sup>2+</sup>又は抗体(CBR LFA1/2)で刺激を受けた細胞へのICAM-1の結合は阻害するが、高親和性の開いたK287C/K294C変異型(HA/aLb2)へのリガンド結合には干渉しない。

30

#### 【0196】

実施例4 分離型の野生型及び変異型LFA-1 I-ドメインの発現及び機能

推定上の高親和性及び低親和性変異型の機能をさらに調べるために、野生型I-ドメインと、変異型K287C/K294C及びL289C/K294CのI-ドメインの残基V130からA338までを、K562細胞の表面上で、PDGF受容体の膜貫通ドメインに発現させた。

#### 【0197】

分離型の、細胞表面発現型Iドメインを構築するために、シグナルペプチドと、それに続くLの反復配列IIの5'末端側から6個のアミノ酸とをコードするDNA配列を、Iドメインを含有する残基V130-A338をコードする配列に連結した。HindIII及びSalI部位をこの断片のそれぞれ5'末端及び3'末端のすぐ隣に導入した。このHindIII-SalI断片を、インフレームで、c-myc tag及びPDGF受容体(PDGFR)膜貫通ドメインの5'側にベクタpDisplay™(インビトロジェン社製)でサブクローンし、さらに、pcDNA3.1/Hygroに、HindIII及びNotIを用いてサブクローンした。DNAの増幅はすべて、Pfu DNAポリメラーゼ(ストラタジーン社製)を用いて行い、最終的なコンストラクトはDNA配列決定で確認した。

40

#### 【0198】

I-ドメインを表面上に発現する安定なK562トランスフェクタントを作製するために、IドメインとPDGFR膜貫通ドメインとをコードする配列を含有する20 µgのSspI-直線化pcDNA3.1/Hygro(+)を用いて、K562細胞を上述のようにエレクトロポレーションでトランスフェクトした。100 µg/mlのヒグロマイシンBに対する耐性でトランスフェクタントを選択し、

50

さらに細胞ソーティング及び限界希釈法でサブクローンした。同様なレベルの表面野生型及び変異型I-ドメインPDGFRを発現していたクローンを、機能研究に用いるべく、選び出した。10%FBS及び100 µg/mlヒグロマイシン B を添加したRPMI 培地1640中に安定な細胞株を維持した。分離型のI-ドメインの細胞表面発現を、フローサイトメトリにより、I-ドメインに対する抗体TS1/22を用いて調べた(図7)。各トランスフェクタントからクローンを2つ選び出し、固定化ICAM-1に対する結合についてテストしたところ、同様な結果がこれら二つのクローンのそれぞれについて得られた(図8A)。インタクト野生型LFA-1を発現していたトランスフェクタントはICAM-1に対して低い基礎結合を見せた。しかし、分離型の野生型I-ドメイン及び変異型L289C/K294C I-ドメインを発現した細胞は、ICAM-1に結合しなかった。このことは、分離型の野生型I-ドメインのみでは、リガンドとの強力かつ安定な相互作用を媒介するには充分でないことを示唆している(Knorr, R and Dustin, ML (1997) J Exp Med 186:719-730)。対照的に、変異型K287C/K294C I-ドメインを発現した細胞は、ICAM-1に対して強い結合を示した。

#### 【0199】

変異型K287C/K294Cの構成的リガンド結合活性が、導入されたC287及びC294間のジスルフィド結合の形成によるものだとすれば、還元剤でこのジスルフィド結合を破壊すれば、この変異型のリガンド結合能を破壊できるはずである。よって、 $Mg^{2+}$ 及び $Ca^{2+}$ を含有するL15/FBSに還元剤DTT (10mM)を加えたものでトランスフェクタントを処理して、ICAM-1に対するトランスフェクタントの結合能を評価した。図8Aに示すように、細胞表面に発現した変異型K287C/K294C I-ドメインのICAM-1への結合は、DTT処理で破壊された。対照的に、インタクト野生型LFA-1の結合はDTTにより増加し、同様の結果はインタクト  $\alpha$ IIb  $\beta$ 3インテグリンでも観察された。DTT処理はおそらく、インテグリンを不活性なコンホメーションに拘束している、インタクト分子中のジスルフィド結合を破壊するのであろう。しかしながら、DTT処理では、分離型の野生型I-ドメインの結合にも、又は、変異型L289C/K294C I-ドメインの結合にも、影響を与えなかった。このI-ドメイン構造に見られるようなジスルフィド結合は、LFA-1 I-ドメインには他にないため、これらのデータは、導入されたCys287及びCys294が、高親和状態にI-ドメインを拘束するジスルフィド架橋を形成したことを、強く示唆するものである。

#### 【0200】

さらに、二価陽イオンが、K562トランスフェクタントの表面上に発現した分離型のI-ドメインのリガンド結合に及ぼす作用についても、テストした。結合反応は、1 mM  $Mn^{2+}$ 、1 mM  $Mg^{2+}$ 、又は1 mM EDTAを添加したHEPES/NaCl/グルコース(20 mM HEPES、pH 7.5、140 mM NaCl、2mg/ml グルコース)中で行わせた。図8Bに示すように、K287C/K294C I-ドメインのICAM-1への結合は、EDTA処理により結合が破壊されたように、二価陽イオン依存であった。インタクト野生型LFA-1とは対照的に、 $Mn^{2+}$ 又は $Mg^{2+}$ は、分離型の野生型I-ドメインのリガンド結合も、又は、変異型L289C/K294C I-ドメインのリガンド結合も、活性化しなかった。

#### 【0201】

I-ドメイン抗体が、分離型のK287C/K294C I-ドメインのリガンド結合に及ぼす作用も調べた。インタクトLFA-1を発現しているトランスフェクタントを活性化抗体CBRLFA-1/2と一緒にプレインキュベートし、この細胞のICAM-1への結合を、I-ドメイン抗体TS1/22、TS2/6、TS1/11、TS1/12、CBRLFA-1/9、CBRLFA-1/1、25.3.1、TS2/14か、又は非結合性抗体X63の存在下で、図示のように行わせた。モノクローナル抗体TS1/22、TS2/6、TS1/11、TS1/12及びCBRLFA-1/9は、分離型のK287C/K294C I-ドメインのICAM-1への結合を阻害したが、抗体25-3-1、TS214及びCBRLFA-1/1はしなかった(図8C)。CBRLFA-1/1を除き、抗体はすべて、変異型K287C/K294C I-ドメインや野生型I-ドメインに、フローサイトメトリで調べたところ、結合した。CBRLFA-1/1の変異型I-ドメインへの結合は、野生型I-ドメインの80%まで減少していた。これらの結果は、インタクトLFA-1 K287C/K294C 変異型で観察されたもの(表2及び3)と一致し、分離型のK287C/K294C I-ドメインが、インタクト分子と同じような構造上の一体性を留めていることを示唆するものである。

## 【0202】

実施例5 可溶性I-ドメイン変異型によるLFA-1機能のインビトロ及び*in vivo*での阻害

ジスルフィド結合(K287C/K294C)で開いたコンホメーションに安定させた可溶性のL1-ドメイン変異型をE. coliで作製した。

## 【0203】

簡単に説明すると、開いたコンホメーション(K287C/K294C)で安定させた組換え変異型L1-ドメインか、又は、アミノ酸残基G128からY307までの組換え野生型L1-ドメインを、pET11b(ノバジェン社製)内にクローンし、1 mM IPTGで4時間誘導したE. coliで発現させた。封入体を6MグアニジンHCL中に可溶化させることで、封入体からこれら組換えタンパク質を精製し、0.1 mM Cu<sup>2+</sup>/フェナントロリンの存在下で希釈してリフォールディングを行わせて、ジスルフィド結合の形成を促した。硫安沈殿法でタンパク質を濃縮し、透析し、モノQイオン交換カラムで精製した。ジスルフィド結合が形成されていない物質を取り除くために、遊離スルフヒドリルを、活性化ピオチンに反応させ、ストレプトアビジンカラムを通した。次にこれら組換えタンパク質をゲル濾過で精製し、セントリプレップで濃縮した。BIAcore™解析には、組換えICAM-1、ICAM-2及びICAM-3 FcキメラをBIAcore™ センサチップ上に、アミン共役法で固定した。組換えL1-ドメインを流し入れ、BIAcore™検定を、1mMのMgCl<sub>2</sub>又は2mMのEDTAを添加したTris緩衝生理食塩水で、流速を10 µl/分にし、25で行った。

## 【0204】

BIAcore™解析で評価したところ、精製済みの開いたI-ドメインは、そのリガンドICAM-1、-2、及び-3に対し、1mMのMgCl<sub>2</sub>の存在下で高い親和性を示した。他方、可溶性の野生型Iドメインの結合は、検出不能であった(図9、パネルA、C及びE;表4)。開いたI-ドメインとリガンドとの相互作用は二価陽イオン依存的であり、2mMのEDTAの存在下では失われたことから、この相互作用はMIDASに依存することが示された。野生型I-ドメインはリガンドと何ら相互作用を示さなかったため、その開いたI-ドメインにより、LFA-1とそのリガンドとの結合動態を詳細に解析できた。結合動態を解析するために、様々な濃度の開いたI-ドメインを、リガンド結合についてテストした(図9、パネルB、D及びF)。動態解析の結果、内皮細胞上への主要なリガンドであるICAM-1について、会合速度が高く(1.28 x 10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>)、解離速度が中間(0.0230 s<sup>-1</sup>)であることが示された(表4)。ICAM-1のKDはナノモルの範囲であり、ICAM-1が最も高い親和性を示し、次いでICAM-2及びICAM-3であった。開いたI-ドメインはまた、マウスICAM-1に対してもナノモル範囲の親和性を示した。

## 【0205】

## 【表4】

表4. ICAMSに結合する開いたI-ドメインの動態

リガンド	$k_{on} (M^{-1}s^{-1})$	$k_{off} (s^{-1})$	$K_D (nM^{-1})$
ICAM-1	1.28 x 10 <sup>5</sup>	0.0230	180
ICAM-2	0.23 x 10 <sup>5</sup>	0.0118	513
ICAM-3	0.19 x 10 <sup>5</sup>	0.0749	3942

## 【0206】

$k_{on}$ 、 $k_{off}$ 、及び $K_D$ は、BIAエバリュエーション™ソフトウェアを用いて1:1の相互作用モデルに基づいて計算した。

## 【0207】

別の研究で、組換え体である可溶性の高親和性L1ドメインの、そのリガンドICAM-1に

対する親和性を測定したところ、BIAcoreによる評価では200nMというKdを示す。このように、分離型の L1ドメインの高親和性コンホーマは、最も活性化した L2ヘテロ二量体と同じくらい、活性なのである。

【0208】

可溶性の開いたI-ドメインが、LFA-1依存的接着を阻害する活性をテストした。ある研究では、野生型LFA-1を安定に発現しているK562細胞をBCECFで蛍光標識し、この細胞表面上のLFA-1を、FCSを添加したL15培地中に入れた活性化モノクローナル抗体CBRLFA-1/2で活性化させた。次にこの細胞を、I-ドメインの存在下又は不在下で、ICAM-1でコートしたプラスチック製96ウェルプレート内でインキュベートした。37℃で40分間インキュベートした後、結合しなかった細胞をマイクロプレート・オートワッシャーで洗い落とした。各ウェル中で、総投入細胞の蛍光含有量と、結合した細胞を、フルオレセント・コンセン  
トレーション・アナライザで定量した。結合した細胞は、試料ウェル一つ当たりの総投入細胞のパーセントで表した。野生型I-ドメインとは対照的に、開いたI-ドメイン変異型は、固定化ICAM-1へのLFA-1発現細胞の接着を強く阻害した(図10A)。

10

【0209】

別の研究では、マウスLFA-1と、マウスICAM-1を含むそのリガンドとの両方を発現すると共に、PMAで活性化したときにLFA-1依存的同型凝集を示すマウスTリンパ腫細胞株EL-4を用いた。細胞を、96ウェルプレートで、50ng/mlのPMAと、様々な量の可溶性I-ドメインとの存在下でインキュベートした。37℃で2時間、5% CO<sub>2</sub>でインキュベートした後、凝集の程度を、以下のように顕微鏡下で採点した：0は、本質的にどの細胞も凝集しな  
かったことを示した；1は、細胞の10%未満が凝集したことを示した；2は、50%未満の凝集を示した；3は、細胞の最高100%が小型であり、緩やかな凝集体となったことを示した；4は、細胞のほぼ100%がより大きな凝集体となったことを示した；そして5は、細胞のほぼ100%が大変大型の密な凝集体になったことを示した。図10Bに示すように、可溶性の開いたI-ドメインも、マウスT細胞株EL-4のPMA誘導性LFA-1依存的同型凝集を阻害した。

20

【0210】

さらに、末梢リンパ節(LN)の微小循環を生体内顕微鏡法で観察することにより、開いたI-ドメイン変異型によるLFA-1機能の *in vivo*での阻害能をテストした。簡単に説明すると、T-GFPマウスのLN細胞懸濁液を少量(20乃至50 μl)、大腿動脈カテーテルを通じて逆行注射し、ビデオトリガー式セノン・アーク・ストロボスコープから蛍光落射照射により、腸骨下部LNを観察した。I-ドメインがない状態でのコントロールT<sup>GFP</sup>細胞挙動を記録した後、マウスにI-ドメイン(10 μg/体重1g)を動脈内注射して予備処置してから、5分後にT<sup>GFP</sup>細胞を注射した。すべての場面をビデオテープに記録し、オフライン解析を行った。回転する細胞量、対、細静脈に進入したT<sup>GFP</sup>細胞の総数のパーセンテージとして、回転画分を計算した。付着している(接着が強固な)画分は、細静脈中で回転するT<sup>GFP</sup>細胞の数のうちで、20秒を越えて強固に接着したままのT<sup>GFP</sup>細胞のパーセンテージとして、決定した。結果を準定量的に以下のように採点した - :0%、± :0-5%、+ :5-20%、++ :20-40%、+++ :40-60%、++++ :60-80%、+++++ :80-100%。

30

【0211】

下の表5に示すように、野生型I-ドメインでなく、開いたI-ドメインを注射すると、高内皮細静脈へのTリンパ球の強固な接着が効果的に遮断され、この遮断はLFA-1依存的であった。L-セレクチン及びPNAdが媒介するリンパ球の回転は損なわれなかったことから、開いたI-ドメインの阻害作用はLFA-1特異的であることが分かる。

40

【0212】

【表5】

表5. In vivoにおいて、末端リンパ節内のリンパ球の高内皮細静脈への強固な接着が開いたI-ドメインによって阻害され、野生型I-ドメインでは阻害されなかった

I-ドメイン	画分		
	回転	強接着	移動
なし	+++	++	±
野生型	+++	++	±
開	++++	±	-

10

## 【0213】

L変異型I-ドメインのICAM-1への結合の動態

L I-ドメインのICAM-1との相互作用の動態をさらに調査するために、組換え可溶性 L I-ドメインをE. coli内で発現させ、リフォールディングさせ、精製した。下の表6に示すように、E284C/E301Cの親和性はK287C/K294Cにほぼ等しい。L161C/F299C、K160C/F299C、及びL161C/T300Cの親和性は、野生型よりも有意に高いが、高親和性の開いた L I-ドメインである K287C/K294Cの20乃至30分の1である。L161C/F299C、K160C/F299C、及びL161C/T300Cを中親和性 L I-ドメインと呼ぶ。

20

## 【0214】

## 【表6】

表6. αLI-ドメインとICAM-1との相互作用の動態

αLI-ドメイン	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD (μM)
開いた状態に固定			
K287C/K294C	1.28 X 10 <sup>5</sup>	0.0230	0.180
E284C/E301C	1.28 X 10 <sup>5</sup>	0.0459	0.360
L161C/F299C	1.36 X 10 <sup>5</sup>	0.513	3.76
K160C/F299C	1.53 X 10 <sup>5</sup>	0.67	4.39
L161C/T300C	1.35 X 10 <sup>5</sup>	0.65	4.8
WT	2.22 X 10 <sup>3</sup>	3.00	1350
閉じた状態に固定			
L289C/K294C	2.11 X 10 <sup>3</sup>	2.84	1760

30

40

## 【0215】

組換え可溶性 L I-ドメインをE. coli内で発現させ、リフォールディングさせ、精製した。I-ドメインのICAM-1への結合の動態はBIAcore™装置を用いて測定した。動態はBIAエバリュエーション™ソフトウェアを用いて解析した。KDはスカッチャード・プロットにより、定常期のデータを用いて計算した。Koffは、1:1結合モデルを用い、解離相の曲線適合で得た。KonはKoff/KDで計算した。

## 【0216】

実施例6 Mac-1システイン置換変異型の構築及び活性

同様のアプローチを用いて、ジスルフィド結合をI-ドメインに導入することにより、開いた高親和性のコンホメーションのMac-1をデザインした。Mac-1システイン置換変異型のデ

50

ザインは実施例 1 で説明した。

【 0 2 1 7 】

【 表 7 】

表 7. 開いたまたは閉じたコンホメーションでの変異残基間の C $\alpha$  及び C $\beta$

変異型	ido (開いたコンホメーション)		jlm (閉じたコンホメーション)	
	C $\alpha$	C $\beta$	C $\alpha$	C $\beta$
<u>開いた状態に固定</u>				
Q163C/Q309C	8.37	6.36	9.11	7.16
Q298C/N301C	5.31	4.21	9.05	10.91
D294C/T307C	9.21	8.67	16.01	17.52
D294C/Q311C	9.02	7.08	9.79	10.02
F297C/A304C	6.31	3.78	11.18	10.17
<u>閉じた状態に固定</u>				
Q163C/R313C	13.8	13.33	7.36	5.15

10

20

【 0 2 1 8 】

野生型残基同士の間距離を、開いたコンホメーション (1ido) 又は閉じた (コンホメーション (1jlm)) で、Look<sup>TM</sup>ソフトウェアで測定した。

【 0 2 1 9 】

ジスルフィド結合を形成する可能性のある対のシステインを、M 2のI-ドメインに導入すると、CBRM1/5活性化依存的エピトープの発現及びリガンド結合にどのような影響が出るかを評価するために、野生型又は変異型 Mサブユニット及び 2サブユニットをコードするプラスミドを293T細胞及びK562細胞に共トランスフェクトした。ヘテロ二量体の形成は、2サブユニットと結合して初めて Mサブユニットの推定 -プロペラドメイン中のエピトープを認識するようになるモノクローナル抗体CBRM1/32を用いて確認し、さらに抗体CBRM1/5を用いてインテグリン活性化を検出した。

30

【 0 2 2 0 】

Q163C/Q309C の対を変異させると良好な結果が得られた (図 1 1 B、図 1 2 B 及び C)。この変異型は、推定上のジスルフィド結合を、I-ドメインの低部前側近傍の、最後のヘリックスの下側 3分の1にある残基と、最初のヘリックスとの間に導入しており、6.36オングストローム離れたC $\alpha$ カーボンを1ido構造に有する。対照的に、D294C/T307C 及び D294C/N311C置換のC $\alpha$ カーボンは、それぞれ8.67オングストローム及び7.08オングストローム離れている。Q298C/N301C 及びF297C/A304C 置換のC $\alpha$ カーボンは、理想的な範囲内にあるが、これらの置換は、最後のストランドとヘリックスとの間のループにより近いため、リガンド結合部位を歪めるなどの望ましくない影響があるに違いない。

40

【 0 2 2 1 】

一過的にトランスフェクトされた293T細胞内でインタクト二量体内に発現させた場合、このQ163C/Q309C 変異型は、CBRM1/32抗体で測定したときに野生型の半分しか、発現されないが、CBRM1/5 活性化依存的エピトープ、対、CBRM1/32 発現、の比は、著しく高い (図 1 1 A)。加えて、Mac-1 Q163C/Q309C 変異型を発現している293T細胞の、プラスチック上にコートしたiC3bへの接着は、室温でL15/FBS培地内で検定したところ、その発現が低いにもかかわらず、野生型よりも高かった (図 1 1 B)。

50

## 【0222】

代わりに、分離型のMac-1変異型I-ドメインを、PDGF受容体の人工シグナル配列及び膜貫通ドメインと一緒に、細胞表面上に発現させた。接着はL15/FBS/MnCl<sub>2</sub>中で37℃で検定した。分離型の野生型I-ドメインは、iC3bへの結合を全く見せなかったが、他方、コンピュータで再デザインした疎水性のコア、ido1r及びido2rを持つ、前述の変異型は活性を有していた(図11C)(Shimaoka, M et al. (2000) Nature Structural Biology 7:674-678)。Q163C/Q309C変異型I-ドメインは、強力な特異的リガンド結合を示したが、この結合は、阻害性のI-ドメインモノクローナル抗体CBRM1/5で完全に遮断された(図12C)。

## 【0223】

更なる研究では、開いたI-ドメイン変異型Q163C/Q309C及びD294C/Q311CをK562細胞で安定に発現させ、同じレベルの受容体を発現しているクローンを選び出した。固定化iC3bに対する接着検定を、L15/FBSで、37℃で行った。293T細胞とは対照的に、野生型Mac-1はこれらの細胞ではリガンド結合についてほとんど基礎活性を持たない(図12A及び12B)。Q163C/Q309C及びD294C/Q311Cの両者とも、インタクトM<sub>2</sub>ヘテロ二量体で発現させたとき、野生型に比べてCBRM1/5活性化依存のエピトープ発現が増加し、またリガンド結合も増加していた(図12A及び12B)。さらに、分離型の開いたI-ドメイン変異型を細胞表面上に発現していたK562細胞は、野生型に比べ、iC3bに対して強い特異的結合を示した(図12C)。

## 【0224】

開いたI-ドメイン変異型のリガンド結合活性の上昇が、ジスルフィド結合の形成により誘導されることを確認するために、還元剤DTTの影響をテストした。変異型I-ドメインを含有するM<sub>2</sub>トランスフェクタントの、プラスチック上に固定したiC3bへの結合を、DTTの存在下及び非存在下で調べた。下の表8に要約するように、固定された開いたM<sub>1</sub>-ドメイン、(Q163C/Q309C)及び(D294C/Q311c)は、活性化がない時には活性であり、これらの活性は、DTTによるジスルフィド還元により部分的に低下した。対照的に、固定された閉じたM<sub>1</sub>-ドメインQ163C/R313Cは不活性であり、活性化に対して耐性であるが、DTTによるジスルフィド還元後には活性化可能となる。

## 【0225】

図12Cに示すようにDTT処理により、分離型の固定された開いたI-ドメインのリガンド結合はなくなった。対照的に、DTTにより、インタクト野生型M<sub>2</sub>の結合は増した(図2B)ことから、この実験で用いたDTTは毒性でなく、開いたI-ドメイン変異型のリガンド結合が失われたことは、DTTの非特異的な作用が原因ではないことが示唆された。まとめると、これらのデータは、システインの導入により、ジスルフィド架橋が形成され、Mac-1 I-ドメインが開いたもしくは閉じたコンホメーションに固定されることを示すものである。

## 【0226】

## 【表8】

10

20

30

表8. 変異型I-ドメインを有する $\alpha$ M $\beta$ 2トランスフェクタントの接着アッセイのまとめ

変異型	- DTT		+ DTT	
	-活性化	+活性化	-活性化	+活性化
野生型	±	++++	++	++++
<u>開いた状態に固定</u>				
Q163C/Q309C	++++	++++	++	++++
Q298C/N301C	±	+	NT	NT
D294C/T307C	±	+	NT	NT
D294C/Q311C	++++	++++	++	++++
F297C/A304C	±	++	NT	NT
<u>閉じた状態に固定</u>				
Q163C/R313C	±	±	++	+++

10

## 【0227】

変異型I-ドメインを含有する M 2トランスフェクタントの、プラスチック上に固定されたiC3bへの結合をテストした。結果は以下のように準定量的に採点した：±：活性化した野生型トランスフェクタントの結合の0-5%、+：5-25%、++25-50%、+++：50-75%、++++：75-100%。

20

NT：テストせず

DTT：DTT処理によるジスルフィド還元

+活性化：活性化mAB CBR LFA-1/2による活性化

## 【0228】

同等物

当業者であれば、ごく慣例的な実験を用いれば、ここに記載した本発明の具体的な実施例の同等物を数多く認識され、又は確認できることであろう。このような同等物は以下の請求の範囲の包含するところと意図されている。

30

## 【0229】

【配列表】

## SEQUENCE LISTING

(110) The Center for Blood Research, Inc.

Timothy Springer

Motomu Shimaoka

Chafen Lu

(120) MODIFIED POLYPEPTIDES STABILIZED IN A  
DESIRED CONFORMATION AND METHODS FOR PRODUCING SAME

(130) CBN-002CPPC

(150) US 60/229,700

(151) 2000-09-01

(160) 4

(170) FastSEQ for Windows Version 4.0

(210) 1

(211) 5133

(212) DNA

(213) Homo sapiens

(400) 1

cctctttcac cctgictagg ttgccagcaa atcccacggg cctcctgacg ctgccccctgg 60  
 ggccacaggt cctctgagig ctggaaggat gaaggattcc tgcatactg tgatggccat 120  
 ggccgtgctg tctgggttct tttctctgc gccggcctcg agctacaacc tggacgtgctg 180  
 gggcgcgcgg agcttctccc caccgcgcgc cgggaggcac ttggatacc gcgtcctgca 240  
 ggtcggaaac ggggtcatcg tgggagctcc aggggagggg aacagcacag gaagcctcta 300  
 tcagtgccag tggggcacag gacactgctt gccagtcacc ctgagagggt ccaactatac 360  
 ctccaagtac ttgggaatga ccttggcaac agaccccaca gatggaagca ttttggcctg 420  
 tgaccctggg ctgtctgaa cgtgtgacca gaacacctat ctgagtgccc tgtgttacct 480  
 ctccgccag aatctgcagg gtcccatgct gcagggggcg cctggttttc aggaatgtat 540  
 caagggaac gtagacctgg tatttctggt tgatggttcg atgagcttgc agccagatga 600  
 atttcagaaa attctggact tcatgaagga tgtaigaag aaactcagca acattcgtta 660

10

20

ccagtttgc tctgttcagt ttccacaag ctacaaaaca gaatttgatt tctcagatta 720  
 tgttaaatgg aaggaccctg atgctctgct gaagcatgia aagcacatgt tgcgtgtgac 780  
 caataccttt ggtgccatca attatgtcgc gacagaggig ttccgggagg agctgggggc 840  
 ccggccagat gccaccaaag tgcattatcat catcacggat ggggaggcca ctgacagtgg 900  
 caacatcgat gcggccaaag acatcatccg ctacatcatc gggattggaa agcattttca 960  
 gaccaaggag agtcaggaga cctccacaa atttgcatca aaaccgcga gcgagtttgt 1020  
 gaaaattctg gacacatttg agaagctgaa agatctattc actgagctgc agaagaagat 1080  
 ctatgtcatt gagggcacia gcaaacagga cctgacttcc ttcaacatgg agctgtcctc 1140  
 cagcggcatc agtgcagacc tcagcagggg ccatgcagtc ggggggcag taggagccaa 1200  
 ggcattggct gggggctttc ttgacctgaa ggcagacctg caggatgaca catttattgg 1260  
 gaatgaacca ttgacaccag aagtgagagc aggcattttg ggttacaccg tgacctggct 1320  
 gccctcccgg caaaagactt cgttgcctggc ctccggagcc cctcgatacc agcacatggg 1380  
 ccgagtgctg ctgttccaag agccacaggg cggaggacac tggagccagg tccagacaat 1440  
 ccatgggacc cagattggct ctattttcgg tggggagctg tgtggcgtcg acgtggacca 1500  
 agatggggag acagagctgc tgcctattgg tgccccactg ttctatgggg agcagagagg 1560  
 aggcggggig tttatctacc agagaagaca gtgggggttt gaagaagtct cagagctgca 1620  
 gggggacccc ggttaccac tcggcggtt tggagaagcc atcactgctc tgacagacat 1680  
 caacggcgat gggctggttag acgtggctgt gggggccctc ctggaggagc agggggctgt 1740  
 gtacatcttc aatgggaggc acggggggct tagtccccag ccaagtcagc ggatagaagg 1800  
 gaccaagig ctctcaggaa ttcatgggtt tggacgtcc atccatgggg tgaaggacct 1860  
 tgaaggggat gcttggcag atgtggctgt gggggctgag agccagatga tctgtctgag 1920  
 ctcccggccc gttgtggata tggcaccct gatgtccttc tctccagctg agatcccagt 1980  
 gcatgaagig gagtgcctct atcaaccag taacaagatg aaagaaggag ttaatatcac 2040  
 aatctgtttc cagatcaagt ctctctacc ccagttccaa ggccgcttgg ttgccaatct 2100  
 cacttacact ctgcagctgg atggccaccg gaccagaaga cgggggttgt tcccaggagg 2160  
 gagacatgaa ctcagaagga atatagctgt caccaccagc atgtcatgca ctgacttctc 2220  
 atttcattc ccggtatgtg ttcaagacct catctcccc atcaatgttt ccttgaattt 2280  
 ctctctttgg gaggaggaag ggcaccag gaccaaaagg gcgcaggcca aggacatacc 2340  
 gcccatctg agaccctccc tgcactcgga aacctgggag atcccttttg agaagaactg 2400

10

20

tggggaggac aagaagtgtg aggcaaactt gagagtgtcc ttctctcctg caagatccag 2460  
 agcccigcgt ctaactgctt tigccagcct ctcgtggag ctgagcctga gtaacttgga 2520  
 agaagatgct tactgggtcc agctggacct gcacttcccc cgggactct ccttccgaa 2580  
 ggtggagatg ctgaagcccc atagccagat accgttgagc tgcgaggagc ttccitgaaga 2640  
 gtccaggctt cgtccagggt cattatcttg caatgtgagc tctcccatct tcaaagcagg 2700  
 ccactcgggt gctctgcaga tgatgtttaa tacactggta aacagctcct ggggggactc 2760  
 ggttgaattg cagccaatg tgacctgtaa caatgaggac tcagacctcc tggaggacaa 2820  
 ctgagccact accatcatcc ccattctgta ccccatcaac atcctcatcc aggaccaaga 2880  
 agactccaca ctctatgtca gtttaccccc caaaggcccc aagatccacc aagtcaagca 2940  
 catgtaccag gtgaggatcc agccttccat ccagcaccac aacataccca ccctggaggc 3000  
 tgtggttggg gtgccacagc ctcccagcga ggggcccata acacaccagt ggagcgtgca 3060  
 gatggagcct cccgtgccct gccactatga ggatctggag aggcctccgg atgcagctga 3120  
 gccctgtctc cccggagccc tgttccgctg ccctgtgtgc ttcaggcagg agatcctctg 3180  
 ccaagigatc gggactctgg agctgggtgg agagatcgag gcccttcca tgttcagcct 3240  
 ctgcagctcc ctctccatct ccttcaacag cagcaagcat ttccacctct atggcagcaa 3300  
 cgccctccctg gcccagggtg tcatgaaggt tgacgtgggt tatgagaagc agatgtctta 3360  
 cctctacgtg ctgagcggca tggggggct gctgctgctg ctgctcattt tcatagtct 3420  
 gtacaagggt ggtttcttca aacggaacct gaaggagaag atggaggctg gcagagggtg 3480  
 cccgaatgga atccctgcag aagactctga gcagctggca tctgggcaag aggcctggga 3540  
 tcccggctgc ctgaagcccc tccatgagaa ggactctgag agtgggtggg gcaaggactg 3600  
 agtccaggcc tgtgagggtc agagtgccea gaactggact caggatgcc caggccactc 3660  
 tgcctctgcc tgcattctgc cgtgtgccct cgggcgagtc actgcctctc cctggccctc 3720  
 agtttcccta tctgaaacat ggaactcatt cctgaaatgc tctttgag gctcataggg 3780  
 aagacctgct gagggaccag ccaagagggt tgcaaaagt agggctgtc attaccagac 3840  
 ggttcaccag cctctcttgg ttcttctctt ggaagagaat gcttgatcta aatgtggaga 3900  
 aactgiagtc tcaggacctg gggatgtct ggccctcacc cctgccttgg gatgtccaca 3960  
 gatgcctcca cccccagaa cctgtccttg cacactcccc tgcactggag tccagtctct 4020  
 tctgtcggca gaaagcaaat gtgacctgtg tcactacgtg actgtggcac acgccttgtt 4080  
 ctggcctaaa gaccaaatic ctggcatgc ctccagcac cctgcaaaat gagaccctcg 4140

10

20

tggccttccc cagcctcttc tagagccgtg atgacctccct gtigaagctc tggtagacacc 4200  
 agcctttctc ccaggccagg ctccttcccg tcttctgca ttcaccaga cagctccctc 4260  
 tgcctgaacc ttccatctcg cccaccctc ctctctgac cagcagatcc cagctcacgt 4320  
 cacacacttg gtgggtect cacatcttc acattccac caccctgcac tactccctca 4380  
 aagcacacgt catgtttctt catccggcag cctggatgtt ttttccctgt ttaatgattg 4440  
 acgtacttag cagctatctc tcagtgaact gtgagggtaa aggtatact tgtcttgttc 4500  
 accttgggat gacgccgat gatatgtcag ggcgtgggac atctagtagg tcttgacat 4560  
 aatttcactg aattaatgac agagccagtg ggaagataca gaaaagagg gccggggctg 4620  
 ggccgggtgg ttacagcctg taatcccagc actttgggag gcccaaggagg gttgatcacc 4680  
 tgaggcagg agtttagagg cagcctggcg aaacccaac tctactaaaa atacaaaac 4740  
 caggcgtgtt ggcacacacc tgtagtcca gctactcagg aggttaggtt aggagaattg 4800  
 ctigaaccig ggaggaggag gtgacagtga gcccaagatt cgccatgca ctccagcctg 4860  
 ggcaacacag cgagactccg tctcaaggaa aaaataaaaa taaaagcgg gcacgggccc 4920  
 ggacatccc acccttggag gctgtcttct caggctctgc cctgcctag ctccacacc 4980  
 tctcccagga cccatcacgc ctgtgcagt gccccacag aaagactgag ctcaagggtg 5040  
 gaaccacgtc tgctaacttg gagccccagt gcccaagcaca gtgacctgat gtatttatcc 5100  
 aataaatgig aaattctgtc caaaaaaaaa aaa 5133

10

<210> 2

<211> 1170

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 2

Met Lys Asp Ser Cys Ile Thr Val Met Ala Met Ala Leu Leu Ser Gly  
 1 5 10 15  
 Phe Phe Phe Phe Ala Pro Ala Ser Ser Tyr Asn Leu Asp Val Arg Gly  
 20 25 30  
 Ala Arg Ser Phe Ser Pro Pro Arg Ala Gly Arg His Phe Gly Tyr Arg  
 35 40 45  
 Val Leu Gln Val Gly Asn Gly Val Ile Val Gly Ala Pro Gly Glu Gly



His Phe Gln Thr Lys Glu Ser Gln Glu Thr Leu His Lys Phe Ala Ser  
 290 295 300  
 Lys Pro Ala Ser Glu Phe Val Lys Ile Leu Asp Thr Phe Glu Lys Leu  
 305 310 315 320  
 Lys Asp Leu Phe Thr Glu Leu Gln Lys Lys Ile Tyr Val Ile Glu Gly  
 325 330 335  
 Thr Ser Lys Gln Asp Leu Thr Ser Phe Asn Met Glu Leu Ser Ser Ser  
 340 345 350  
 Gly Ile Ser Ala Asp Leu Ser Arg Gly His Ala Val Val Gly Ala Val  
 355 360 365  
 Gly Ala Lys Asp Trp Ala Gly Gly Phe Leu Asp Leu Lys Ala Asp Leu  
 370 375 380  
 Gln Asp Asp Thr Phe Ile Gly Asn Glu Pro Leu Thr Pro Glu Val Arg  
 385 390 395 400  
 Ala Gly Tyr Leu Gly Tyr Thr Val Thr Trp Leu Pro Ser Arg Gln Lys  
 405 410 415  
 Thr Ser Leu Leu Ala Ser Gly Ala Pro Arg Tyr Gln His Met Gly Arg  
 420 425 430  
 Val Leu Leu Phe Gln Glu Pro Gln Gly Gly Gly His Trp Ser Gln Val  
 435 440 445  
 Gln Thr Ile His Gly Thr Gln Ile Gly Ser Tyr Phe Gly Gly Glu Leu  
 450 455 460  
 Cys Gly Val Asp Val Asp Gln Asp Gly Glu Thr Glu Leu Leu Leu Ile  
 465 470 475 480  
 Gly Ala Pro Leu Phe Tyr Gly Glu Gln Arg Gly Gly Arg Val Phe Ile  
 485 490 495  
 Tyr Gln Arg Arg Gln Leu Gly Phe Glu Glu Val Ser Glu Leu Gln Gly  
 500 505 510  
 Asp Pro Gly Tyr Pro Leu Gly Arg Phe Gly Glu Ala Ile Thr Ala Leu

10

20



Ile Leu Arg Pro Ser Leu His Ser Glu Thr Trp Glu Ile Pro Phe Glu  
 755 760 765  
 Lys Asn Cys Gly Glu Asp Lys Lys Cys Glu Ala Asn Leu Arg Val Ser  
 770 775 780  
 Phe Ser Pro Ala Arg Ser Arg Ala Leu Arg Leu Thr Ala Phe Ala Ser  
 785 790 795 800  
 Leu Ser Val Glu Leu Ser Leu Ser Asn Leu Glu Glu Asp Ala Tyr Trp  
 805 810 815  
 Val Gln Leu Asp Leu His Phe Pro Pro Gly Leu Ser Phe Arg Lys Val  
 820 825 830  
 Glu Met Leu Lys Pro His Ser Gln Ile Pro Val Ser Cys Glu Glu Leu  
 835 840 845  
 Pro Glu Glu Ser Arg Leu Leu Ser Arg Ala Leu Ser Cys Asn Val Ser  
 850 855 860  
 Ser Pro Ile Phe Lys Ala Gly His Ser Val Ala Leu Gln Met Met Phe  
 865 870 875 880  
 Asn Thr Leu Val Asn Ser Ser Trp Gly Asp Ser Val Glu Leu His Ala  
 885 890 895  
 Asn Val Thr Cys Asn Asn Glu Asp Ser Asp Leu Leu Glu Asp Asn Ser  
 900 905 910  
 Ala Thr Thr Ile Ile Pro Ile Leu Tyr Pro Ile Asn Ile Leu Ile Gln  
 915 920 925  
 Asp Gln Glu Asp Ser Thr Leu Tyr Val Ser Phe Thr Pro Lys Gly Pro  
 930 935 940  
 Lys Ile His Gln Val Lys His Met Tyr Gln Val Arg Ile Gln Pro Ser  
 945 950 955 960  
 Ile His Asp His Asn Ile Pro Thr Leu Glu Ala Val Val Gly Val Pro  
 965 970 975  
 Gln Pro Pro Ser Glu Gly Pro Ile Thr His Gln Trp Ser Val Gln Met

10

20

980			985			990										
Glu	Pro	Pro	Val	Pro	Cys	His	Tyr	Glu	Asp	Leu	Glu	Arg	Leu	Pro	Asp	
	995						1000						1005			
Ala	Ala	Glu	Pro	Cys	Leu	Pro	Gly	Ala	Leu	Phe	Arg	Cys	Pro	Val	Val	
	1010						1015						1020			
Phe	Arg	Gln	Glu	Ile	Leu	Val	Gln	Val	Ile	Gly	Thr	Leu	Glu	Leu	Val	
	1025				1030					1035				1040		
Gly	Glu	Ile	Glu	Ala	Ser	Ser	Met	Phe	Ser	Leu	Cys	Ser	Ser	Leu	Ser	
				1045						1050				1055		
Ile	Ser	Phe	Asn	Ser	Ser	Lys	His	Phe	His	Leu	Tyr	Gly	Ser	Asn	Ala	
			1060					1065						1070		10
Ser	Leu	Ala	Gln	Val	Val	Met	Lys	Val	Asp	Val	Val	Tyr	Glu	Lys	Gln	
		1075					1080							1085		
Met	Leu	Tyr	Leu	Tyr	Val	Leu	Ser	Gly	Ile	Gly	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu	
	1090						1095							1100		
Leu	Leu	Ile	Phe	Ile	Val	Leu	Tyr	Lys	Val	Gly	Phe	Phe	Lys	Arg	Asn	
	1105				1110					1115				1120		
Leu	Lys	Glu	Lys	Met	Glu	Ala	Gly	Arg	Gly	Val	Pro	Asn	Gly	Ile	Pro	
				1125						1130				1135		
Ala	Glu	Asp	Ser	Glu	Gln	Leu	Ala	Ser	Gly	Gln	Glu	Ala	Gly	Asp	Pro	
		1140						1145						1150		20
Gly	Cys	Leu	Lys	Pro	Leu	His	Glu	Lys	Asp	Ser	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	
		1155						1160						1165		
Lys	Asp															
	1170															

<210> 3

<211> 4740

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

gaattccgig gticcctcagi ggigccctgca accccctgggt cacctccttc caggttcttg 60  
 ctccctccag ccatggctct cagagtcctt ctgttaacag ccttgacctt atgtcatggg 120  
 ttcaacttgg acacigaaaa cgcaatgacc ttccaagaga acgcaagggg cticgggcag 180  
 agcgttggcc agcttcaggg atccagggig gtggttggag cccccagga gatagtggct 240  
 gccaaccaaa ggggcagcct ctaccagtgc gactacagca caggctcatg cgagcccatc 300  
 cgccctgcagg tccccgtgga ggccgtgaac atgtccctgg gctgtccct ggcagccacc 360  
 accagcccc ctacagctgtc ggccctgtggt cccaccgtgc accagacttg cagtgagaac 420  
 acgtatgtga aagggtctct ctccctgttt ggatccaacc tacggcagca gccccagaag 480  
 ttcccagagg cctccgagg gigtctcaa gaggatagtg acattgcctt ctgatitgat 540  
 ggctctggta gcatcatccc acatgacttt cggcggatga aggagtittg ctcaactgtg 600  
 atggagcaat taaaaaagtc caaaaccttg ttctctttga tgcagtactic tgaagaattc 660  
 cggattcact ttacctcaa agagtccag aacaacctta acccaagatc actggigaag 720  
 ccaataacgc agctgcttgg gcggacacac acggccacgg gcatccgaa agtggtagca 780  
 gagctgttia acatcaccaa cggagcccga aagaatgcct ttaagatcct agttgtcatc 840  
 acggatggag aaaagittgg cgateccttg ggataigagg atgtcatccc tgaggcagac 900  
 agagagggag tcaatcgta cgtcatggg ggggagatg ccttccgag tgagaaatcc 960  
 cgccaagagc tfaatccat cgateccaag ccgcctctg atcacgtgtt ccaggatgat 1020  
 aactitgagg ctctgaagac cattcagaac cagcttcggg agaagatcti tgcgatcgag 1080  
 ggtactcaga caggaagtag cagctcctti gagcatgaga tgtctcagga aggcctcagc 1140  
 gctgccatca cctctaatgg ccccttgcig agcacgttgg ggagctatga ctggcctgtt 1200  
 ggagctttc tatatacatc aaaggagaaa agcacctca tcaaatgac cagagtgat 1260  
 tcagacatga atgatctta ctgggttat gctgccgcca tcatcttac gaaccgggtg 1320  
 caaagcctgg ttctgggggc acctcgatat cagcacatcg gccctgtagc gatgttcagg 1380  
 cagaacactg gcatgtggga gtccaacgtt aatgtcaagg gcaccagat cggcgcttac 1440  
 ttccgggctt cctctgtct cgtggacgtg gacagcaacg gcagcaccga cctggctctc 1500  
 atcggggccc cccattacta cgagcagacc cgagggggcc aggtgtccgt gtgcccttgg 1560  
 cccagggggc agagggtctg gggcaggtg gatgtgttc tctacgggga gcagggcaa 1620

10

20

cccitggggcc gccttggggc agccctaaca gtgctggggg acgtaaatgg ggacaagctg 1680  
 acggacgtgg ccatitggggc cccaggagag gaggacaacc ggggtgctgt ttacctgttt 1740  
 cacggaacct caggatctgg catcagcccc tcccatagcc agcggatagc aggtccaag 1800  
 ctctctccca ggctccagta ttttggtcag tcactgagtg ggggccagga cctcacaatg 1860  
 gatggactgg tagacctgac tgiaggagcc caggggcacg tgcctgctgt caggctccag 1920  
 ccagtactga gactcaaggc aatcatggag ttcaatcca gggaaatggc aaggaaatgta 1980  
 tttagtgta atgactcaggt ggtgaaaggc aaggaaagcc gagaggtcag agctcgcctc 2040  
 catgtccaga agagcacacg ggatcggcta agagaaggac agatccagag tgttggact 2100  
 tatgacctgg ctctggactc cggccgcca cattcccgcg ccgtcttcaa tgagacaaag 2160  
 aacagcacac gcagacagac acaggctctg gggctgacct agacttgtga gacctgaaa 2220  
 ctacagtgtc gcaatgcat cgaggacca gigagccca tigtgctgcg cctgaacttc 2280  
 tctctgggtg gaacccatt gctctcttc gggaaacctc gggcagtgct gggggaggat 2340  
 gctcagagac tcttcacagc ctgttttccc ttgagaaga atgtggcaa tgacaacatc 2400  
 tgccaggatg acctcagcat caccttcagi ttcatgagcc tggactgctt cgtggigggt 2460  
 gggccccggg agttcaactg gacagtgact gtgagaaatg atggtagga ctctacagg 2520  
 acacaggta ccttcttctt cccgctgac ctgtctacc ggaagggtgc cacactccag 2580  
 aaccagcgt cacagcagtc ctggcgctg gcttgtagt ctgctctc caccgaagtg 2640  
 ctgggggcti tgaagagcac cagctgcagc ataaaccacc ccacttccc gaaaaactca 2700  
 gaggtcacct tfaatatcac gttttagtga gactctaagg ctcccttgg aaacaaactg 2760  
 ctctcaagg ccaatgtgac cagtgagaac aacatgcca gaaccaaaa aaccgaattc 2820  
 caactggagc tgccggtgaa atatgtgtc tacatgggtg tcaccagcca tgggtctcc 2880  
 actaataatc tcaacttca ggcctcagag aataccagtc gggctatgca gcatcaatat 2940  
 caggctagca acctggggca gaggagctc cccatcagcc tgggtgtctt ggtgccgtc 3000  
 cggctgaacc agactgtcat atgggaccgc ccccaggta ccttctccga gaacctctc 3060  
 agtacgtgcc acaccaagga gcgcttgccc tctcactccg acttctggc tgagcttcgg 3120  
 aaggcccccg tggtagactg ctccatcgt gctgcccaga gaatccagtg tgacatccc 3180  
 ttcttggca tccaggaaga atcaatgt accctcaaag gcaacctctc gtttactgg 3240  
 tacatcaaga cctcgataa ccacctctg atcgtgagca cagctgagat ctgtttaa 3300  
 gattccgtgt tcacctgtt gccgggacag gggcggttgg tgaggctcca gaccgagacc 3360

10

20

aaagtgagc cgttcgaggt ccccaacccc ctgccgctca tcgtgggcag ctctgtcggg 3420  
ggacigctgc tcttggccct catcaccgcc gcgcgtgaca agctcggctt ctcaagcgg 3480  
caatacaagg acatgatgag tgaagggggt cccccggggg ccgaaccca gtagcggctc 3540  
cttcccgaca gagctgcctc tcggtgcca gcaggactct gccagacca cacgtagccc 3600  
ccaggctgct ggacacgtcg gacagcgaag tatccccgac aggacgggct tgggcttcca 3660  
tttgtgtgtg tgcaagtgtg taigtgcgtg tgtgcgagtg tgtgcaagtg tctgtgtgca 3720  
agtgtgtgca cgtgtgcgtg tgcgtgcatg tgcactcgca gcgccatgtg tgagtgtgtg 3780  
caagtatgtg agtgtgtcca gttgtgtgtc gttgttccat gttgtgtcag tgtgtgcatg 3840  
tgtgcgagtg tgtgcatgtg tgtgtcagg ggcgtgtggct cacgtgtgtg actcagagtg 3900  
tctctggcgt gtgggtagggt gacggcagcg tagcctctcc ggcagaaggg aactgccttg 3960  
gctcccttgt gcgtgggtaa gccgcgtcgt ggttttctc cgggagaggg gacgggtcaat 4020  
cctgtgggtg aagagagagg gaaacacagc agcatctctc cactgaaaga agtgggactt 4080  
cccgtgcct gcgagcctgc ggcctgctgg agcctgcgca gcttggatgg atactccatg 4140  
agaaaagccg tgggtggaac caggagcctc ctccacacca gcgctgatgc ccaataaaga 4200  
tgcccactga ggaatcatga agcttccctt ctggattcat ttattattc aatgtgactt 4260  
taatttttg gatggataag cctgtctatg gtacaaaaat cacaaggcat tcaagtgtac 4320  
agtgaaaagt ctcccttcc agatattcaa gtcacctct taaaggtagi caagattgtg 4380  
ttttgagggt tcttcagac agattccagg cgaatgtcaa gttgatgcac gttgtcacac 4440  
accacacaca tacacacaca caagctttt tacacaaatg gtagcatact ttatatggt 4500  
cigtatctig cttttttca ccaatattc tcagacatcg gttcatatta agacataaat 4560  
tacttttca ttttttata ccgctgata gtattccatt gttgtgagtg accataatgt 4620  
atttaaccag tcttcttttg atatactatt ttcactctt gtatttgcac ctgctgagtt 4680  
aataaatcaa atatatgtca aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa 4740

10

20

<210> 4

<211> 1152

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

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

10

20



Asp Val Asp Ser Asn Gly Ser Thr Asp Leu Val Leu Ile Gly Ala Pro  
 465                    470                    475                    480  
 His Tyr Tyr Glu Gln Thr Arg Gly Gly Gln Val Ser Val Cys Pro Leu  
                   485                    490                    495  
 Pro Arg Gly Arg Ala Arg Trp Gln Cys Asp Ala Val Leu Tyr Gly Glu  
                   500                    505                    510  
 Gln Gly Gln Pro Trp Gly Arg Phe Gly Ala Ala Leu Thr Val Leu Gly  
                   515                    520                    525  
 Asp Val Asn Gly Asp Lys Leu Thr Asp Val Ala Ile Gly Ala Pro Gly  
                   530                    535                    540  
 Glu Glu Asp Asn Arg Gly Ala Val Tyr Leu Phe His Gly Thr Ser Gly  
 545                    550                    555                    560  
 Ser Gly Ile Ser Pro Ser His Ser Gln Arg Ile Ala Gly Ser Lys Leu  
                   565                    570                    575  
 Ser Pro Arg Leu Gln Tyr Phe Gly Gln Ser Leu Ser Gly Gly Gln Asp  
                   580                    585                    590  
 Leu Thr Met Asp Gly Leu Val Asp Leu Thr Val Gly Ala Gln Gly His  
                   595                    600                    605  
 Val Leu Leu Leu Arg Ser Gln Pro Val Leu Arg Val Lys Ala Ile Met  
                   610                    615                    620  
 Glu Phe Asn Pro Arg Glu Val Ala Arg Asn Val Phe Glu Cys Asn Asp  
 625                    630                    635                    640  
 Gln Val Val Lys Gly Lys Glu Ala Gly Glu Val Arg Val Cys Leu His  
                   645                    650                    655  
 Val Gln Lys Ser Thr Arg Asp Arg Leu Arg Glu Gly Gln Ile Gln Ser  
                   660                    665                    670  
 Val Val Thr Tyr Asp Leu Ala Leu Asp Ser Gly Arg Pro His Ser Arg  
                   675                    680                    685  
 Ala Val Phe Asn Glu Thr Lys Asn Ser Thr Arg Arg Gln Thr Gln Val

10

20

690                      695                      700  
 Leu Gly Leu Thr Gln Thr Cys Glu Thr Leu Lys Leu Gln Leu Pro Asn  
 705                      710                      715                      720  
 Cys Ile Glu Asp Pro Val Ser Pro Ile Val Leu Arg Leu Asn Phe Ser  
                          725                      730                      735  
 Leu Val Gly Thr Pro Leu Ser Ala Phe Gly Asn Leu Arg Pro Val Leu  
                          740                      745                      750  
 Ala Glu Asp Ala Gln Arg Leu Phe Thr Ala Leu Phe Pro Phe Glu Lys  
                          755                      760                      765  
 Asn Cys Gly Asn Asp Asn Ile Cys Gln Asp Asp Leu Ser Ile Thr Phe  
                          770                      775                      780  
 Ser Phe Met Ser Leu Asp Cys Leu Val Val Gly Gly Pro Arg Glu Phe  
 785                      790                      795                      800  
 Asn Val Thr Val Thr Val Arg Asn Asp Gly Glu Asp Ser Tyr Arg Thr  
                          805                      810                      815  
 Gln Val Thr Phe Phe Phe Pro Leu Asp Leu Ser Tyr Arg Lys Val Ser  
                          820                      825                      830  
 Thr Leu Gln Asn Gln Arg Ser Gln Arg Ser Trp Arg Leu Ala Cys Glu  
                          835                      840                      845  
 Ser Ala Ser Ser Thr Glu Val Ser Gly Ala Leu Lys Ser Thr Ser Cys  
                          850                      855                      860  
 Ser Ile Asn His Pro Ile Phe Pro Glu Asn Ser Glu Val Thr Phe Asn  
 865                      870                      875                      880  
 Ile Thr Phe Asp Val Asp Ser Lys Ala Ser Leu Gly Asn Lys Leu Leu  
                          885                      890                      895  
 Leu Lys Ala Asn Val Thr Ser Glu Asn Asn Met Pro Arg Thr Asn Lys  
                          900                      905                      910  
 Thr Glu Phe Gln Leu Glu Leu Pro Val Lys Tyr Ala Val Tyr Met Val  
                          915                      920                      925

10

20

Val Thr Ser His Gly Val Ser Thr Lys Tyr Leu Asn Phe Thr Ala Ser  
 930 935 940  
 Glu Asn Thr Ser Arg Val Met Gln His Gln Tyr Gln Val Ser Asn Leu  
 945 950 955 960  
 Gly Gln Arg Ser Leu Pro Ile Ser Leu Val Phe Leu Val Pro Val Arg  
 965 970 975  
 Leu Asn Gln Thr Val Ile Trp Asp Arg Pro Gln Val Thr Phe Ser Glu  
 980 985 990  
 Asn Leu Ser Ser Thr Cys His Thr Lys Glu Arg Leu Pro Ser His Ser  
 995 1000 1005  
 Asp Phe Leu Ala Glu Leu Arg Lys Ala Pro Val Val Asn Cys Ser Ile  
 1010 1015 1020  
 Ala Val Cys Gln Arg Ile Gln Cys Asp Ile Pro Phe Phe Gly Ile Gln  
 1025 1030 1035 1040  
 Glu Glu Phe Asn Ala Thr Leu Lys Gly Asn Leu Ser Phe Asp Trp Tyr  
 1045 1050 1055  
 Ile Lys Thr Ser His Asn His Leu Leu Ile Val Ser Thr Ala Glu Ile  
 1060 1065 1070  
 Leu Phe Asn Asp Ser Val Phe Thr Leu Leu Pro Gly Gln Gly Ala Phe  
 1075 1080 1085  
 Val Arg Ser Gln Thr Glu Thr Lys Val Glu Pro Phe Glu Val Pro Asn  
 1090 1095 1100  
 Pro Leu Pro Leu Ile Val Gly Ser Ser Val Gly Gly Leu Leu Leu Leu  
 1105 1110 1115 1120  
 Ala Leu Ile Thr Ala Ala Leu Tyr Lys Leu Gly Phe Phe Lys Arg Gln  
 1125 1130 1135  
 Tyr Lys Asp Met Met Ser Glu Gly Gly Pro Pro Gly Ala Glu Pro Gln  
 1140 1145 1150

10

20

### 【図面の簡単な説明】

30

【図1】 図1は、ジスルフィド結合を導入する変異を加えた、LFA-1 Iドメインの高親和性モデルの立体図である。このモデルは、推定上の高親和性Mac-1 Iドメイン構造の部分と、推定上の低親和性LFA-1 Iドメイン構造の部分とを、テンプレートとして用いて作製した。K287C及びK294Cの変異をモデルに含めた。C287及びC294の側鎖及びジスルフィド結合を黄色で示した。MIDASのMg<sup>2+</sup>イオンを金色の球で示す。ICAM-1及びICAM-2への結合に重要な残基の側鎖を、ローズ・ピンクの側鎖及び黄色の硫黄、赤色の酸素及び青色の窒素原子で示す。ICAM-1への種特異的な結合にとって重要である (Huang, C and Springer, TA (1995) J Biol Chem 270:19008-19016) か、又は、アラニンに変異させたときにICAM-1又はICAM-2への結合が少なくとも2倍になるという点で重要である (Edwards, CP et al., (1998) J Biol Chem 273:28937-28944)と定義されたこれらの残基は、M140、E146、T175、L205、E241、T243、S245、及びK263である。これらの残基はMg<sup>2+</sup>イオンを取り囲んでおり、ジスルフィドからは遠いことに留意されたい。RIBBONSで作製した (Carson, M (1997) Methods in Enzymology, RM Sweet and CW Carter eds., Academic Press pp. 493-505)。

40

【図2】 図2は、LFA-1 Iドメインの高親和性もしくは低親和性コンホーマに対して選択的な推定上のジスルフィド結合を示す。K287C/K294C変異 (パネルA、C) 及びL289C/K294C変異 (パネルB、D) を、高親和性 (パネルA、B) 及び低親和性 (パネルC、D) Iドメインコンホーマの両方でモデルを作製した。このモデルの残基 254位から305位までを示す。これら四つのモデルは、コンホメーション上のシフトに関与しない残基を用いて重ね合わされており、図面の作製には全く同じ方向で用いた。従って、パネルC及び

50

Dに比較したときの、パネルA及びBでの6ヘリックスの下向きの移動が明白である。

6及び6をつないでいるループのリモデリングに伴って、残基289位の側鎖の配向が逆転している(パネルDに比較したときのパネルB)。RIBBONSで作製した。

【図3】 図3は、293T-過性トランスフェクタント(パネルA)、及びK562安定トランスフェクタント(パネルB)上でのLFA-1システイン置換変異型の細胞表面発現を、フローサイトメトリ解析で、L/2複合体中のLに対するモノクローナル抗体TS2/4(塗りつぶしたヒストグラム)か、又は、非結合性の抗体X63(白抜きのヒストグラム)を用いて調べた図である。括弧内の数字は、K562安定トランスフェクタントのクローン数である。

【図4】 図4は、固定化ICAM-1へのLFA-1トランスフェクタントの結合を示す。パネルAは293T-過性トランスフェクタントであり、そしてパネルB及びCは、K562安定トランスフェクタントである。パネルA及びBでは、固定化ICAM-1へのトランスフェクタントの結合を、10µg/mlの活性化抗体CBRLFA-1/2の存在下又は非存在下(コントロール)で、Ca<sup>2+</sup>及びMg<sup>2+</sup>を含有するL15培地内で調べた。パネルCでは、結合検定を、図示のように二価陽イオン又はEDTAを添加したTBS、pH7.5内で行った。括弧内の数字は、K562安定トランスフェクタントのクローン数である。結果は、三重式試料の平均±SD、少なくとも三回の実験の代表である。

【図5】 図5は、野生型LFA-1、推定上の高親和性変異型K287C/K294C、又は変異型L289C/K294Cを発現するK562トランスフェクタントに対する可溶性ICAM-1-IgA融合タンパク質の結合を、フローサイトメトリ解析で評価したものである。ICAM-1-IgA結合の平均蛍光強度をヒストグラムの上部右隅に示す。括弧内の数字は、K562安定トランスフェクタントのクローン数である。結果は三回の実験の代表である。

【図6】 図6は、活性化した野生型及び高親和性(K287C/K294C)LFA-1を発現している細胞へのリガンド結合にロバスタチンが及ぼす阻害活性を示す。

【図7】 図7は、単離されたLFA-1 I-ドメインの細胞表面発現を示す。野生型 I-ドメイン並びに変異型K287C/K294C及びL289C/K294C I-ドメインを、PDGFR膜貫通ドメインにより、K562トランスフェクタント表面上に発現させた。細胞表面の該I-ドメインのレベルを、フローサイトメトリにより、該I-ドメインに対するモノクローナル抗体TS1/22を用いて調べた(塗りつぶしたヒストグラム)。コントロールのmAb X63の結合を白抜きのヒストグラムで示す。TS1/22結合の平均蛍光強度を、ヒストグラムの上部右隅に示した。各I-ドメイントランスフェクタントのうちの一つの個々のクローン(#1及び#2)の結果を示す。

【図8】 図8は、細胞表面に発現したLFA-1 I-ドメインのリガンド結合活性を示す。パネルAは、DTTの存在下又は不在下における、固定化ICAM-1へのK562トランスフェクタントの結合を示す。結合はDTTの存在下(白バー)又は不在下(黒バー)で行わせた。パネルBは、K562トランスフェクタントのICAM-1への結合に対する二価陽イオンの影響を示す。結合はMn<sup>2+</sup>(黒バー)、Mg<sup>2+</sup>(網掛けバー)はEDTAの存在下(白棒)で行わせた。パネルA及びBでは、野生型I-ドメイン又は変異型I-ドメインを発現しているトランスフェクタントの二つのクローン(#1及び#2)をテストした。パネルCは、LFA-1遮断抗体が、K287C/K294C I-ドメインのICAM-1への結合に及ぼす影響を示す。結果は三重試料の平均±SD、三回の実験の代表である。

【図9】 図9は、開いた(K287C/K294C)又は野生型I-ドメインと、リガンドICAM-1(パネルA及びB)、ICAM-2(パネルC及びD)及びICAM-3(パネルE及びF)との間の相互作用を記録したBIAcore™による表面プラスモン共鳴センソグラムを示す。

【図10】 図10は、開いた I-ドメインによるLFA-1依存的接着のインビトロでの阻害を示す。パネルAは、可溶性の野生型(塗りつぶした丸)又は開いた(K287C/K294C) I-ドメイン(白抜き丸)の存在下における、野生型LFA-1を発現しているK562安定トランスフェクタントの固定化ICAM-1への接着を示す。パネルBは、可溶性の野生型(塗りつぶした丸)又は開いた(K287C/K294C) I-ドメイン(白抜き丸)の存在下における、マウスE L-4 Tリンパ腫細胞株の同型凝集を示す。

10

20

30

40

50

【図 1 1】 図 1 1 は、一過的にトランスフェクトした293T細胞におけるMac-1システイン置換変異型の発現及びリガンド結合活性を示す。パネルAは、モノクローナル抗体CBRM1/32 (白バー)及び CBRM1/5 (黒バー) のインタクト Mac-1 I-ドメイン変異型への結合を示す。パネルBは、インタクトMac-1システイン置換変異型を発現している293T一過性トランスフェクタントの、プラスチック上に被膜されたiC3bへの接着を示す。パネルCは、単離型Mac-1変異型I-ドメインを発現している293T一過性トランスフェクタントの、iC3bリガンドへの、抗体CBRM1/5の存在下(黒バー)又は非存在下(白バー)での接着を示す。

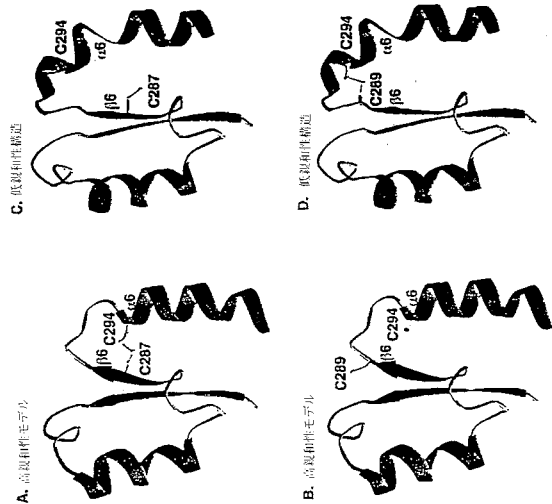
【図 1 2】 図 1 2 は、K562安定トランスフェクタントにおけるMac-1システイン置換変異型の発現及びリガンド結合活性を示す。パネルAは、モノクローナル抗体CBRM1/32及び CBRM1/5の、インタクトMac-1 I-ドメイン変異型への結合をフローサイトメトリで評価して示した代表的ヒストグラムである。平均蛍光強度を、ヒストグラムの上部右端に示す。パネルBは、インタクトMac-1システイン置換変異型を発現しているK562安定トランスフェクタントの、プラスチック上にコートされたiC3bへの接着を示す。パネルCは、単離型Mac-1 I-変異型I-ドメインを発現しているK562安定トランスフェクタントの、iC3bリガンドへの接着を示す。接着は、モノクローナル抗体 CBRM1/5の存在下(黒バー)もしくは非存在下(白バー)、又は10 mM DTTの存在下(灰色バー)で検定した。

10

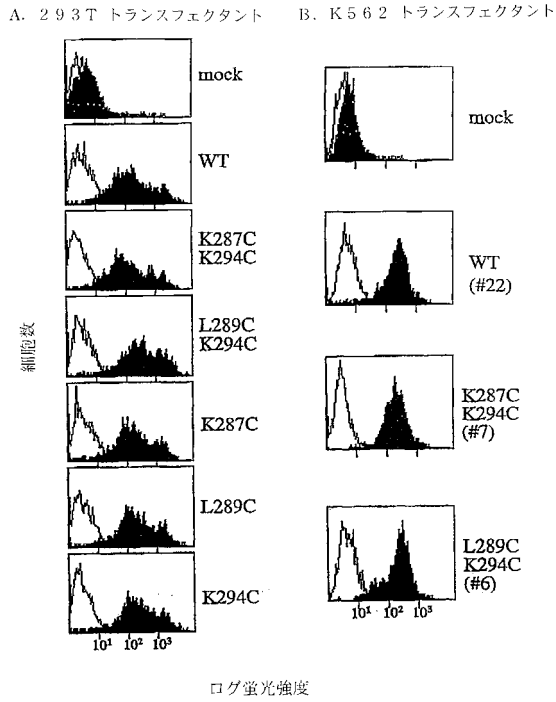
【図 1】



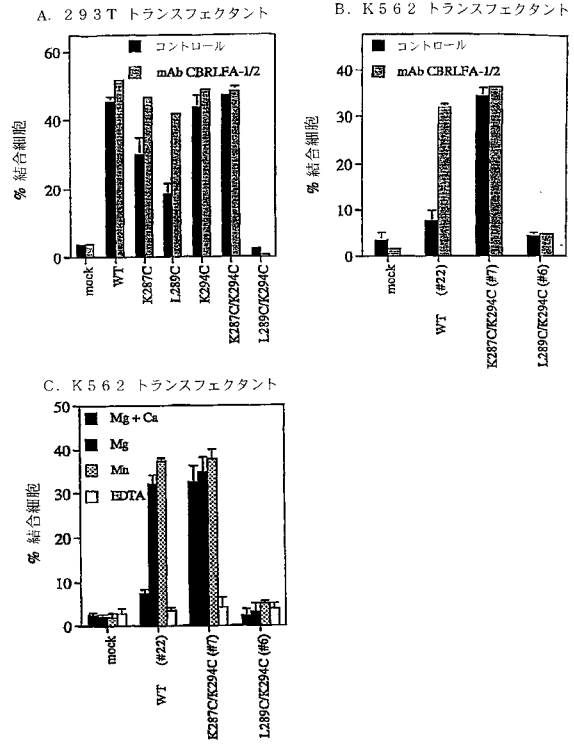
【図 2】



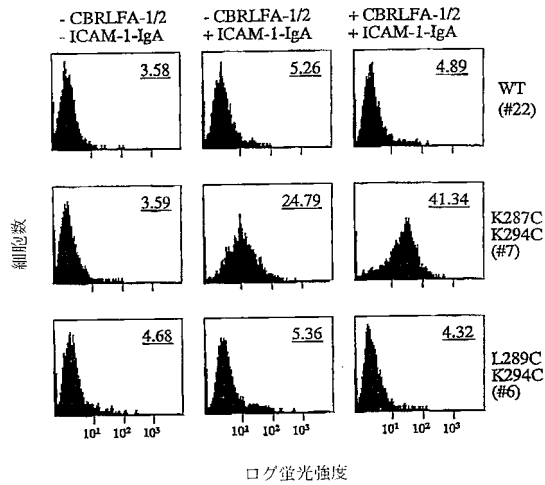
【 図 3 】



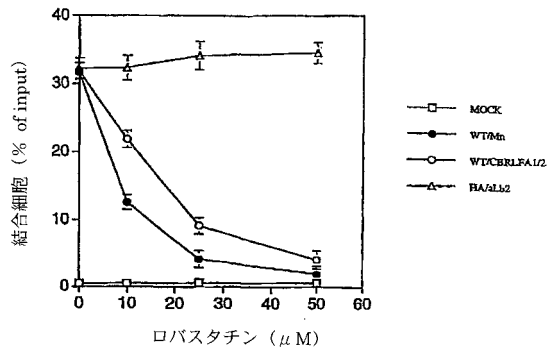
【 図 4 】



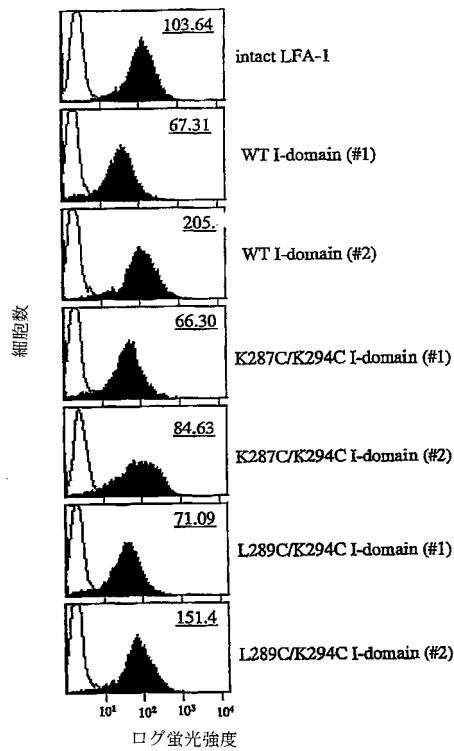
【 図 5 】



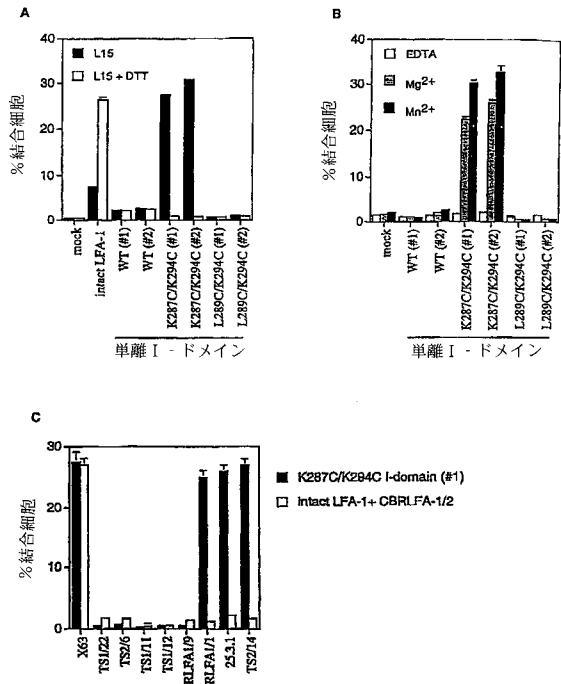
【 図 6 】



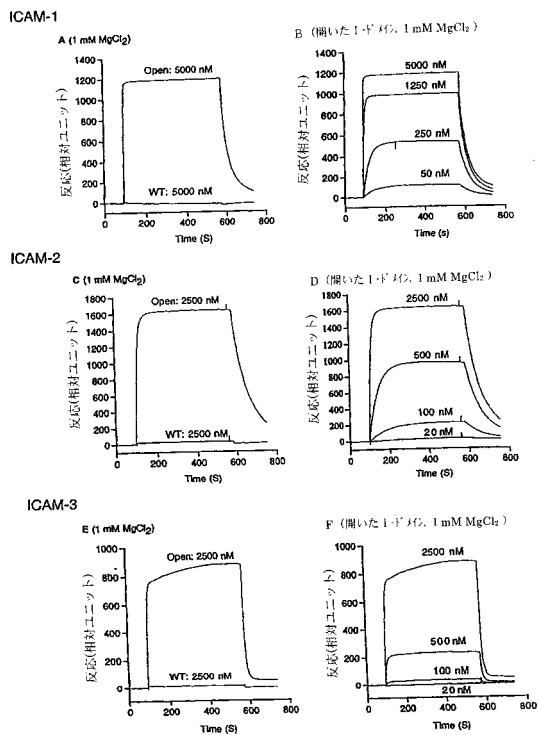
【 図 7 】



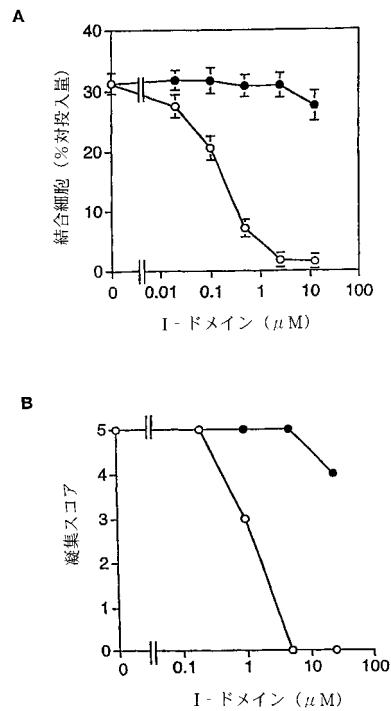
【 図 8 】



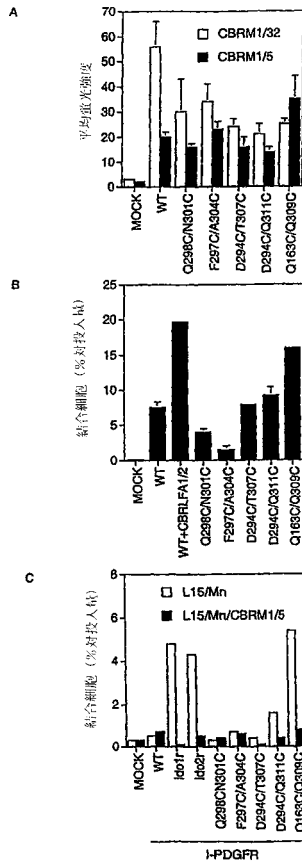
【 図 9 】



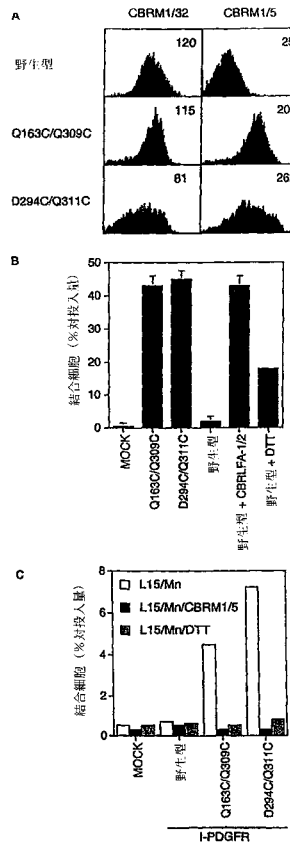
【 図 10 】



【 1 1 】



【 1 2 】



---

フロントページの続き

- (72)発明者 スプリンガー, ティモシー, エイ.  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02167 ニュートン ウッドマン ロード 36
- (72)発明者 シモアカ, モトム  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02446 ブルックライン ロングウッド アベニュー  
73
- (72)発明者 リュー, チャーフェン  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02167 ニュートン ウッドマン ロード 36

審査官 高山 敏充

- (56)参考文献 JOURNAL OF IMMUNOLOGY., 1995, Vol. 155, No. 2, pp. 854-866  
Protein Engineering, 1988, Vol. 2, No. 2, pp. 119-125  
SHIMAOKA M, NATURE STRUCTURAL BIOLOGY, 米国, 2000年 8月, V7N8, P674-678

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-15/90

PubMed

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

CAplus/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

专利名称(译)	用所需构象稳定的修饰多肽和产生所述多肽的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP5113314B2</a>	公开(公告)日	2013-01-09
申请号	JP2002522490	申请日	2001-08-31
[标]申请(专利权)人(译)	该中心血液研究油墨		
申请(专利权)人(译)	该中心血液研究油墨		
当前申请(专利权)人(译)	该中心血液研究油墨		
[标]发明人	スプリングーティモシーエイ シモアカモトム リユーチャーフェン		
发明人	スプリングー, ティモシー, エイ. シモアカ, モトム リユー, チャーフェン		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/705 A61K38/00 A61P29/00 A61K48/00 A01K67/027 A61K35/76 A61K39/00 A61K39/395 A61K45/00 A61P1/04 A61P9/00 A61P9/10 A61P11/00 A61P11/06 A61P13/12 A61P17/00 A61P17/02 A61P17/06 A61P19/02 A61P25/04 A61P37/02 C07K16/28 C12N15/12 G01N33/15 G01N33 /50 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	A61K38/00 A61P1/04 A61P11/00 A61P11/06 A61P13/12 A61P17/00 A61P17/02 A61P17/06 A61P19 /02 A61P25/04 A61P29/00 C07K14/70546 Y10S930/26		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/705 A61K37/02 A61P29/00 A61K48/00		
审查员(译)	高山俊光		
优先权	60/229700 2000-09-01 US		
其他公开文献	JP2004527217A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明提供了通过向多肽中引入至少一个二硫键来稳定所需构象的蛋白质的方法。使用计算机设计, 指定在哪个位置引入半胱氨酸残基, 二硫化物仅由一种蛋白质构象形成, 因此该蛋白质是否可以以某种构象固定。因此, 选择对所需蛋白质构象和小分子治疗特异的抗体。本发明还提供了用所需构象稳定的修饰的整联蛋白I-结构域多肽。此外, 本发明还提供了利用本发明的修饰的整联蛋白I-结构域的筛选试验和治疗方法。

変異型				変異体配列	
αM or αL	変異	#7シド	#30シド	WT	変異体
αL	K287C/K294C	K287	1022-1024	aaa	tgt
		K294	1043-1045	aag	tgt
	E284C/E301C	E284	1013-1015	gag	tgt
		E301	1064-1066	gag	tgt
	L161C/F299C	L161	644-646	ctc	tgt
		F299	1058-1060	ttc	tgt
	K160C/F299C	K160	641-643	aaa	tgt
		F299	1058-1060	ctc	tgt
	L161C/T300C	L161	644-646	ctc	tgt
		T300	1061-1063	act	tgt
	L289C/K294C	L289	1028-1030	ctg	tgt
		K294	1043-1045	aag	tgt
αM	Q163C/Q309C	Q163	607-609	caa	tgt
		Q309	1045-1047	cag	tgt
	D294C/Q311C	D294	1000-1002	gat	tgt
		Q311	1051-1053	cag	tgt
	Q163C/R313C	Q163	607-609	caa	tgt
		R313	1057-1059	cgg	tgt