



(12) Ausschließungspatent

(11) **DD 297 839 A5**

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1
Patentgesetz der DDR
vom 27. 10. 1983
in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) C 12 N 15/12
C 07 K 15/00
A 61 K 37/02
C 12 Q 1/68
G 01 N 33/574

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	DD C 12 N / 331 963 3	(22)	21.08.89	(44)	23.01.92
(31)	07/235,227 321,017	(32)	23.08.88 09.03.89	(33)	US

(71)	siehe (73)
(72)	Springer, Timothy, Dr.; Larson, Richard, Dr., US
(73)	DANA FARBER CANCER INSTITUTE, Boston, US
(74)	Herr Dr. Dieter Laudien, Carl-Orff-Straße 11, W - 6500 Mainz-Drais, DE

(54) **Alpha-Untereinheit des LFA-Leukozytadhäsionsrezeptors**

(55) Alpha-Untereinheit des Leukozythenadhäsionsrezeptors; LFA-1-Herstellung; Pharmazeutika

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung einer LFA-1-Alpha-Untereinheit oder deren funktionelles Derivat, im wesentlichen frei von natürlichen Kontaminanten, dadurch gekennzeichnet, daß ein geeigneter Wirtsorganismus mit einem Expressionsvektor, der als eine Kodiersequenz Replikon- und Kontrollsequenz für die Expression in Prokaryoten und Eukaryoten für das gewünschte Polypeptid an einer geeigneten Stelle enthält, transformiert wird, oder die LFA-1-Alpha-Untereinheit oder deren funktionelles Derivat chemisch synthetisiert wird, und das gewünschte Polypeptid aus den entstandenen Transformanten oder der Reaktionsmischung isoliert wird. Die LFA-1-Alpha-Untereinheit ist an dem Vorgang beteiligt, durch den die Zelle Entzündungsstellen erkennt und zu diesen wandert, sowie sich während der Entzündung an zellulären Substraten anfügt.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung einer LFA-1-Alpha-Untereinheit oder deren funktionelles Derivat, im wesentlichen frei von natürlichen Kontaminanten, **dadurch gekennzeichnet**, daß ein geeigneter Wirtsorganismus mit einem Expressionsvektor, der als eine Kodiersequenz Replikon- und Kontrollsequenz für die Expression in Prokaryoten und Eukaryoten für das gewünschte Polypeptid an einer geeigneten Stelle enthält, transformiert wird, oder die LFA-1-Alpha-Untereinheit oder deren funktionelles Derivat chemisch synthetisiert wird, und das gewünschte Polypeptid aus den entstandenen Transformanten oder der Reaktionsmischung isoliert wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die so hergestellte LFA-1-Alpha-Untereinheit außerdem in der Lage ist, sich an ein Molekül zu binden, das an der Oberfläche einer Zelle vorhanden ist.
3. Verfahren nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß das auf der Oberfläche der Zelle vorhandene Molekül ICAM-1 oder ein anderer natürlicher Ligand von LFA-1 ist.
4. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die so hergestellte LFA-1-Alpha-Untereinheit mit einer LFA-1-Beta-Untereinheit assoziieren kann, um ein LFA-1-Heterodimer zu bilden.
5. Verfahren nach Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß das LFA-1-Heterodimer in der Lage ist, sich an ICAM-1 oder einen anderen natürlichen Liganden von LFA-1 zu binden.
6. Verfahren nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Kodiersequenz für das gewünschte Polypeptid wenigstens eine Sequenz enthält, die aus der folgenden Gruppe ausgewählt wird:
 - a. P-P-R-A-G-R-H;
 - b. I-I-T-D-G-E-A;
 - c. D-W-A-G-G-F-L;
 - d. S-Q-V-Q-T-I-H;
 - e. R-H-G-G-L-S-P;
 - f. M-S-C-T-D-F-S;
 - g. R-L-L-S-R-A-L;
 - h. G-V-D-V-Q-D-G-E-I-E;
 - i. D-I-N-G-D-G-L-V-D-V;
 - j. V-K-D-L-E-G-D-G-L-A;
 - k. T-Y-L-S-G-L;
 - l. Y-I-I-G-I-G-K;
 - m. I-E-G-T-Q-V-L-S-Q und
 - n. P-S-I-H-N-I-P.
7. Verfahren nach Anspruch 2 zur Herstellung eines funktionellen Derivats einer LFA-1-Alpha-Untereinheit, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Kodiersequenz für ein Fragment der LFA-1-Alpha-Untereinheit kodiert.
8. Verfahren nach Anspruch 2 zur Herstellung eines funktionellen Derivats einer LFA-1-Alpha-Untereinheit, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Kodiersequenz für eine Variante der LFA-1-Alpha-Untereinheit kodiert.
9. Verfahren nach Anspruch 2 zur Herstellung eines funktionellen Derivats einer LFA-1-Alpha-Untereinheit, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Kodiersequenz für ein Analog der LFA-1-Alpha-Untereinheit kodiert.
10. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die so hergestellte LFA-1-Alpha-Untereinheit oder das funktionelle Derivat davon in ein chemisches funktionelles Derivat umgesetzt wird.
11. Verfahren zur Herstellung einer DNA, das in der Lage ist, entweder die LFA-1-Alpha-Untereinheit oder eines ihrer funktionellen Derivate zu exprimieren, **dadurch gekennzeichnet**, daß ein geeigneter Vektor mit einer oder mehreren geeigneten Restriktionsendonucleasen digeriert und die gewünschte DNA isoliert wird.
12. Verfahren nach Anspruch 11, **dadurch gekennzeichnet**, daß das DNA für eine LFA-1-Alpha-Untereinheit oder ihren funktionellen Derivat kodiert, das wenigstens eine peptide Sequenz enthält, die aus der folgenden Gruppe ausgewählt wird.:

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

13. Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von Entzündungen, die aus einer Reaktion des spezifischen Abwehrsystems bei Säugetieren resultieren, oder von Metastasen einer hämatopoietischen Tumorzelle, wobei diese Zelle zur Wanderung ein funktionelles Glied der LFA-1-Familie braucht, oder vom Wachstum einer der LFA-1-Alpha-Untereinheit expressierenden Tumorzelle, **dadurch gekennzeichnet**, daß eine wirksame Menge eines Polypeptids nach Anspruch 1 bis 10 in eine oder mehrere Füllstoffe eingearbeitet wird.
14. Anwendung eines Polypeptids nach Anspruch 1 bis 10, **dadurch gekennzeichnet**, daß es zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung eingesetzt wird.
15. Kit zur Bestimmung des Vorhandenseins und der Lage einer Entzündung, die aus einer Reaktion des spezifischen Abwehrsystems bei Säugetieren resultiert oder das Vorhandensein und die Lage einer Tumorzelle, die ICAM-1 oder einen anderen natürlichen Ligand von LFA-1 exprimiert, **dadurch gekennzeichnet**, daß es eine nachweisbar markierte LFA-1-Alpha-Untereinheit oder deren Derivat enthält, welches in der Lage ist, eine Zelle zu identifizieren, die ICAM-1 oder einen anderen natürlichen Liganden von LFA-1 exprimiert.
16. Kit zur Bestimmung des Vorhandenseins und der Lage einer Entzündung, die aus einer Reaktion des spezifischen Abwehrsystems bei einem Säugetier resultiert, **dadurch gekennzeichnet**, daß es ein Nukleinsäuremolekül enthält, das zur Bindung an ein Molekül in der Lage ist, welches aus der Gruppe ausgewählt wird, die aus einer mRNA-Folge eines Gens für die LFA-1-Alpha-Untereinheit besteht, wobei die Bindung in der Lage ist, eine Zelle zu identifizieren, die ICAM-1 oder einen anderen natürlichen Liganden von LFA-1 exprimiert.

Hierzu 7 Seiten Zeichnungen

Anwendungsgebiet der Erfindung

Vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Herstellung des Leukozytadhäsionsrezeptors LFA-1. Die Erfindung betrifft außerdem die Klonierung von DNA-Folgen, welche die Alpha-Untereinheit dieses Moleküls kodieren. Die Erfindung wurde teilweise mit Unterstützung durch die Regierung verwirklicht. Die Regierung hat an dieser Erfindung bestimmte Rechte.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Das Immunsystem ist für den Schutz von Tieren vor Fremdinvasoren, wie Bakterien, Viren usw., verantwortlich. Eine ausgezeichnete Übersicht über das Abwehrsystem wird von Eisen, H. W. gegeben (in: Microbiology [Mikrobiologie], 3. Aufl., Harper & Row, Philadelphia, PA [1980], S. 290 bis 295 und 381 bis 418). Die Fähigkeit des Immunsystems, ein Tier vor Fremdinvasoren zu schützen, hängt in hohem Maße vom Vorhandensein und der Funktion von Blutzellen, die als Leukozyten bekannt sind, ab. Es wurde festgestellt, daß die Fähigkeit der Leukozyten, diesen Schutz zu gewähren, das Haften dieser Zellen an zellulären und extrazellulären Substraten verlangt.

Beispielsweise müssen Leukozyten in der Lage sein, sich an Endothelzellen zu binden, so daß sie aus dem Blutkreislauf zu Stellen mit einer beginnenden Entzündung wandern können. Außerdem müssen sie sich an antigenpräsentierende Zellen binden, so daß eine normale Immunreaktion erfolgen kann. Sie müssen auch in der Lage sein, sich an geeignete Zielzellen zu binden, so daß die Lyse von viral infizierten (oder Tumor-) Zellen erfolgen kann. Außerdem müssen Leukozyten in der Lage sein, sich an verschiedene aktivierte Proteine zu binden (beispielsweise iC3b – die aktivierte Form der dritten Komponente des

Komplements), so daß sie wirksam in der Phagozytose sind und mikrobielle und Zelltrümmer beseitigen können. Also ist die Leukozytenadhäsion eine Voraussetzung für ein normal funktionierendes Wirtsabwehrsystem. Die Unterdrückung dieses Abwehrsystems ist in solchen Fällen wie Transplantationen wünschenswert, da der Wirt das transplantierte Gewebe als fremd „ansieht“ und eine Immunreaktion auf dieses Gewebe einleitet. Die Leukozytenadhäsion ist somit auch an der Abstoßung von transplantiertem Gewebe und Organen beteiligt. So kann also das Verständnis der Leukozytenadhäsion in die Lage versetzen, entweder die Fähigkeit eines Tieres zu verstärken, Infektionen zu bekämpfen, oder die Fähigkeit eines Tieres unterdrücken, transplantiertes Gewebe abzustoßen.

In jüngster Zeit wurden unter Anwendung der Hybridomtechnik Leukozytoberflächenmoleküle identifiziert, die an der Vermittlung der Leukozytenadhäsion beteiligt sind. Kurz gesagt, es wurden monoklonale Antikörper, welche gegen menschliche T-Zellen (Davignon, D. u. a., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 4535-4549 [1981]) und Mäusemilzzellen (Springer, T. u. a., *Eur. J. Immunol.* 9: 301-306 [1979]) gerichtet sind, identifiziert, die sich an Leukozytenoberflächen gebunden haben und die oben beschriebenen bindungsbezogenen Funktionen verhindern (Springer T. u. a., *Fed. Proc.* 44: 2660-2663 [1985]). Die Moleküle, die von diesen Antikörpern erkannt wurden, bilden einen Satz von Leukozytenadhäsionsrezeptoren, die als „lymphozytunktionsbezogene Antigen-1-Familie“ (oder die „LFA-1-Familie“) der Adhäsionsrezeptormoleküle bekannt ist. Die LFA-1-Familie der Adhäsionsrezeptormoleküle enthält drei stark miteinander verwandte Zelloberflächenglykoproteine. Es wurde festgestellt, daß diese Glykoproteine die Zell-Zell-Wechselwirkungen bei Entzündungen vermitteln. Die Glykoproteine wurden als „LFA-1“ (lymphozytunktionsbezogenes Antigen-1), „Mac-1“ und „p 150,95“ bezeichnet. Während LFA-1 auf den Oberflächen der meisten Leukozyten gefunden wird (Springer, T. A. u. a., *Immunol. Rev.* 68: 111-135 [1982]), werden Mac-1 und p 150,95 vorwiegend auf Makrophagen, Granulozyten und anderen großen granulären Lymphozyten gefunden (Springer, T. A., u. a., *Immunol. Rev.* 68: 111-135 [1982]; Keizer, G., u. a., *Eur. J. Immunol.* 15: 1142-1147 [1985]).

Die LFA-1-Glykoproteinfamilie setzt sich aus Heterodimeren zusammen, die jeweils eine Alpha-Untereinheit enthalten, welche nichtkovalent einer Beta-Untereinheit zugeordnet ist. Es wurde festgestellt, daß sich die Alpha-Untereinheiten der Familie voneinander unterscheiden, und sie werden mit CD 11 a, CD 11 b bzw. CD 11 c bezeichnet. Die glykosylierten Alpha-Untereinheiten haben angenäherte Molekulargewichte von 180, 170 bzw. 150kd. Dagegen wurde festgestellt, daß die Beta-Untereinheit der LFA-1-Familie von Adhäsionsrezeptoren identisch ist und ein Molekulargewicht von 95kd hat (Sanchez-Madrid, F. u. a., *J. Exp. Med.* 158: 1785-1803 [1983]; Keizer, G. D. u. a., *Eur. J. Immunol.* 15: 1142 bis 1147 [1985]; Springer, T., *Fed. Proc.* 44: 2660-2663 [1985]; Sanchez-Madrid, F. u. a., *J. Exper. Med.* 158: 587-602 [1983]).

Obwohl die Alpha-Untereinheiten der Glykoproteine nicht die umfassende Homologie der Beta-Untereinheiten aufweisen, hat eine eingehende Analyse der Alpha-Untereinheiten von Glykoproteinen gezeigt, daß zwischen ihnen wesentliche Ähnlichkeiten bestehen. Eine Übersicht über die Ähnlichkeiten zwischen Alpha- und Beta-Untereinheiten der Adhäsionsmolekül-Glykoproteinfamilie wird von Sanchez-Madrid, F. u. a. (*J. Exper. Med.* 158: 586-602 [1983]; *J. Exper. Med.* 158: 1785 bis 1803 [1983]; Miller, L. J. u. a. *J. Immunol.* 138: 2381 bis 2383 [1987]) gegeben.

Die Bedeutung der LFA-1-Familie der Rezeptoren wurde zuerst in Studien erkannt, welche die Fähigkeit von monoklonalen Antikörpern (die in der Lage waren, sich an die spezifischen Alpha-Untereinheiten oder an die gemeinsame Beta-Untereinheit zu binden) zeigten, adhäsionsabhängige Leukozytunktionen zu unterbinden (Sanchez-Madrid, F. u. a., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 7489-7493 [1982]; Beller, D. I. u. a., *J. Exper. Med.* 158: 1000-1009 [1982]).

In jüngster Zeit wurde eine Gruppe von Personen identifiziert, die nicht in der Lage sind, normale Mengen eines beliebigen Gliedes der LFA-1-Adhäsionsproteinfamilie auf ihren Leukozytelloberflächen zu exprimieren. Diese Krankheit wurde als „Leukozytadhäsionsdefizienz“ oder „LAD“ bezeichnet und ist durch chronische und wiederkehrende Infektionen sowie durch andere klinische Symptome gekennzeichnet (Anderson, D. C. u. a., *Fed. Proc.* 44: 2671-2677 [1985]; Anderson, D. C. u. a., *J. Infect. Dis.* 152: 668 bis 689 [1985]). Leukozyten von LAD-Patienten weisen In-vitro-Defekte auf, die denen sehr ähnlich waren, die beobachtet wurden, wenn Leukozyten normaler Personen durch Antikörper bekämpft wurden, die für Glieder der LFA-1-Familie spezifisch sind. Es wurde festgestellt, daß LAD-Patienten nicht in der Lage sind, eine normale Immunreaktion hervorzubringen. Es wurde festgestellt, daß dieses Versagen auf eine Unfähigkeit der Leukozyten von LAD-Patienten zurückzuführen ist, an zellulären und extrazellulären Substraten zu haften (Anderson, D. C., u. a., *Fed. Proc.* 44: 2671-2677 [1985]; Anderson, D. C. u. a., *J. Infect. Dis.* 152: 668 bis 689 [1985]). Diese Untersuchungen zeigen, daß entzündliche Reaktionen abgeschwächt werden, wenn Leukozyten nicht in der Lage sind, auf Grund des Fehlens von funktionellen Adhäsionsmolekülen an ihrer Zelloberfläche in normaler Weise zu haften.

Zusammenfassend kann also gesagt werden, daß die Fähigkeit von Leukozyten, die Gesundheit und Lebensfähigkeit eines Tieres zu erhalten, verlangt, daß diese in der Lage sind, an anderen Zellen (beispielsweise Endothelzellen) und Proteinen (beispielsweise iC3b) zu haften. Es wurde festgestellt, daß dieses Haften Kontakte bedingt, die spezifische Rezeptormoleküle beinhalten, welche an der Leukozytenoberfläche von Leukozyten vorhanden sind. Es wurde festgestellt, daß diese Zelloberflächenrezeptormoleküle stark miteinander verwandt sind. Menschen, deren Leukozyten diese Zelloberflächenrezeptormoleküle fehlen, weisen chronische und wiederholt auftretende Infektionen sowie andere klinische Symptome auf.

Da die Leukozytenadhäsion in den Vorgang einbezogen ist, durch den Fremdgewebe identifiziert und abgestoßen wird, ist das Verständnis dieses Vorgangs von entscheidendem Wert auf den Gebieten der Organtransplantation, der Gewebeverpflanzung, der Allergie und Onkologie.

Ziel der Erfindung

Durch das erfindungsgemäße Verfahren wird die pharmazeutisch wertvolle Alpha-Untereinheit des Leukozytenadhäsionsrezeptors LFA-1 zur Verfügung gestellt.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, pharmazeutisch wertvolle Zelloberflächenrezeptormoleküle aufzufinden und Verfahren zu deren Herstellung zur Verfügung zu stellen.

Erfindungsgemäß wird ein Verfahren zur Herstellung der Alpha-Untereinheit des LFA-1-Rezeptormoleküls durch Anwendung der Rekombinant-DNA-Technik zur Verfügung gestellt.

Das erfindungsgemäße Verfahren betrifft insbesondere die Klonierung und Expression der Alpha-Untereinheit des LFA-1-Rezeptormoleküls.

Im einzelnen bezieht sich die Erfindung auf ein Verfahren zur Herstellung einer LFA-1-Alpha-Untereinheit oder deren funktionellen Derivates, die im wesentlichen frei von natürlichen Kontaminanten sind.

Die Erfindung bezieht sich außerdem auf die Herstellung der oben genannten LFA-1-Alpha-Untereinheit oder deren funktionellen Derivates, die zusätzlich in der Lage sind, ein auf der Oberfläche einer Zelle vorhandenes Molekül (wie ICAM-1 oder die LFA-1-Beta-Untereinheit) zu binden.

Die Erfindung schließt auch das oben genannte LFA-1-Alpha-Untereinheitsmolekül ein, wobei das Molekül wenigstens ein Polypeptid enthält, das aus der folgenden Gruppe ausgewählt wurde:

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

Die Erfindung schließt auch ein rekombinantes DNA-Molekül ein, das in der Lage ist, entweder die LFA-1-Alpha-Untereinheit oder deren funktionelles Derivat zu exprimieren.

Die Erfindung betrifft auch eine Methode zur Gewinnung der LFA-1-Alpha-Untereinheit in einer im wesentlichen reinen Form, welche besteht aus den Schritten:

- Löslichmachung der LFA-1-Alpha-Untereinheit aus den Membranen von Zellen, welche die LFA-1-Alpha-Untereinheit exprimieren, um ein löslich gemachtes LFA-1-Alpha-Untereinheit-Präparat zu erhalten;
- Einführung der löslich gemachten LFA-1-Alpha-Untereinheit-Präparation in eine Affinitätsmatrix, wobei die Matrix immobilisierten Antikörper enthält, der die LFA-1-Alpha-Untereinheit binden kann;
- Ermöglichung der Bindung der LFA-1-Alpha-Untereinheit an den Antikörper der Affinitätsmatrix;
- Entfernung von jeder Verbindung, die nicht in der Lage ist, sich an den Antikörper zu binden, aus der Matrix und
- Gewinnung der LFA-1-Alpha-Untereinheit in einer im wesentlichen reinen Form durch Eluieren der LFA-1-Alpha-Untereinheit aus der Matrix.

Die Erfindung sieht auch eine Methode vor zur Behandlung von Entzündungen, die aus einer Reaktion des spezifischen Abwehrsystems (wie verzögerte Hypersensitivität; Abstoßung von Gewebeverpflanzungen; Abstoßung von Organtransplantaten, Autoimmunkrankheiten wie Lupus erythematosus, Autoimmunthyroiditis, experimentelle allergische Enzephalomyelitis (EAE), multiple Sklerose, einige Formen von Diabetes, Reynaud-Syndrom, rheumatoide Arthritis usw.) bei einem Säugetier resultieren, welche darin besteht, einem Subjekt, das eine solche Behandlung braucht, eine ausreichende Menge eines entzündungshemmenden Mittels zu verabreichen, um die Entzündung zu unterdrücken; wobei das entzündungshemmende Mittel aus der folgenden Gruppe ausgewählt wird: LFA-1-Alpha-Untereinheit und funktionelles Derivat der LFA-1-Alpha-Untereinheit.

Die Erfindung schließt außerdem die oben genannte Methode ein, die zusätzliche die Mitverabreichung eines Mittels vorsieht, die aus der folgenden Gruppe ausgewählt wird: LFA-1-Beta-Untereinheit und ein funktionelles Derivat der LFA-1-Beta-Untereinheit.

Die Erfindung bezieht sich auch auf eine Methode zur Unterdrückung der Metastase einer hämatopoietischen Tumorzelle, die ein funktionelles Glied der LFA-1-Familie zum Wandern braucht, wobei die Methode darin besteht, einem Patienten, der eine solche Behandlung braucht, eine ausreichende Menge eines entzündungshemmenden Mittels zu verabreichen, um die Metastase zu unterdrücken, wobei das entzündungshemmende Mittel aus der folgenden Gruppe ausgewählt wird: LFA-1-Alpha-Untereinheit und funktionelles Derivat der LFA-1-Alpha-Untereinheit.

Die Erfindung bezieht sich auf eine Methode zur Unterdrückung des Wachstums einer die LFA-1-Alpha-Untereinheit exprimierenden Tumorzelle, welche darin besteht, einem Patienten, der eine solche Behandlung braucht, eine ausreichende Menge eines Toxins zur Unterdrückung des Wachstums zu verabreichen, wobei das Toxin aus der Gruppe ausgewählt wird, die aus einer toxin-abgeleiteten LFA-1-Alpha-Untereinheit und einem toxin-abgeleiteten funktionellen Derivat eines Gliedes des LFA-1-Alpha-Untereinheit besteht.

Die Erfindung bezieht sich auch auf eine Methode zur Diagnostizierung des Vorhandenseins und der Lage einer Entzündung, die aus der Reaktion des spezifischen Abwehrsystems bei Säugern resultiert, bei denen eine Entzündung vermutet wird, welche darin besteht:

- der Person eine Zusammensetzung zu verabreichen, welche eine nachweisbar markierte LFA-1-Alpha-Untereinheit enthält, die eine Zelle identifizieren kann, welche ICAM-1 oder einen anderen natürlichen Liganden von LFA-1 exprimiert, und
- die LFA-1-Alpha-Untereinheit festzustellen.

Die Erfindung bezieht sich auch auf eine Methode zur Diagnostizierung des Vorhandenseins und der Lage einer Entzündung, die aus der Reaktion des spezifischen Abwehrsystems bei Säugern resultiert, bei denen eine Entzündung vermutet wird, welche darin besteht:

(a) eine Gewebeprobe der Person mit einer Zusammensetzung zu inkubieren, welche eine nachweisbar markierte LFA-1-Alpha-Untereinheit enthält, welche eine Zelle identifizieren kann, die ICAM-1 oder einen anderen natürlichen Liganden von LFA-1 exprimiert, und

(b) die LFA-1-Alpha-Untereinheit festzustellen.

Die Erfindung bezieht sich auch auf eine Methode zur Diagnostizierung des Vorhandenseins und der Lage einer Entzündung, die aus der Reaktion des spezifischen Abwehrsystems bei Säugern resultiert, bei denen eine Entzündung vermutet wird, welche darin besteht,

(a) eine Gewebeprobe der Person mit einer Zusammensetzung zu inkubieren, welche ein Nukleinsäuremolekül enthält, das sich an ein Molekül binden kann, welches aus der Gruppe ausgewählt wird, die besteht aus einer DNA-Folge der LFA-1-Alpha-Untereinheit und einer mRNA-Folge eines Gens für die LFA-1-Alpha-Untereinheit, wobei die Bindung in der Lage ist, eine Zelle zu identifizieren, welche ICAM-1 oder einen anderen natürlichen Liganden von LFA-1 exprimiert, und

(b) das Nukleinsäuremolekül festzustellen.

Die Erfindung bezieht sich auch auf eine Methode zur Diagnostizierung des Vorhandenseins und der Lage einer Entzündung, die aus der Reaktion des spezifischen Abwehrsystems bei einem Säuger resultiert, bei dem eine Entzündung vermutet wird, welche darin besteht:

(a) eine Gewebeprobe der Person mit einer Zusammensetzung zu inkubieren, welche eine nachweisbar markierte LFA-1-Alpha-Untereinheit enthält, die eine Zelle identifizieren kann, die ICAM-1 oder einen anderen natürlichen Liganden von LFA-1 exprimieren kann, und

(b) die LFA-1-Alpha-Untereinheit festzustellen.

Die Erfindung bezieht sich auch auf eine Methode zur Diagnostizierung des Vorhandenseins und der Lage einer Tumorzelle, welche ICAM-1 oder einen anderen natürlichen Liganden von LFA-1 exprimiert, bei einer Person, bei der das Vorhandensein einer solchen Zelle angenommen wird, welche darin besteht:

(a) der Person eine Zusammensetzung zu verabreichen, die einen nachweisbar markierten Bindungsliganden enthält, der zu einer Bindung an ICAM-1 oder den anderen natürlichen Liganden von LFA-1 in der Lage ist, wobei die Liganden aus der folgenden Gruppe ausgewählt werden: LFA-1-Alpha-Untereinheit und funktionelles Derivat der LFA-1-Alpha-Untereinheit, und

(b) den Bindungsliganden festzustellen.

Die Erfindung bezieht sich auch auf eine Methode zur Diagnostizierung des Vorhandenseins und der Lage einer Tumorzelle, welche ICAM-1 oder einen anderen natürlichen Liganden von LFA-1 exprimiert, in einer Person, bei der das Vorhandensein einer solchen Zelle angenommen wird, welche darin besteht:

(a) eine Gewebeprobe der Person bei Vorhandensein einer Zusammensetzung inkubieren, welche einen nachweisbar markierten Bindungsliganden enthält, der sich an ICAM-1 oder den anderen natürlichen Liganden von LFA-1 binden kann, wobei die Liganden aus der folgenden Gruppe ausgewählt werden: LFA-1-Alpha-Untereinheit und funktionelles Derivat der LFA-1-Alpha-Untereinheit, und

(b) den Bindungsliganden festzustellen, der an das in der Gewebeprobe vorhandene ICAM-1 gebunden ist.

Ausführungsbeispiele

Abb. 1: zeigt ein Profil der Umkehrphasen-Hochdruckflüssigkeitschromatografie-Trennung (Umkehrphasen-HPLC-Trennung) der LFA-1-Alpha-Untereinheit-Triptinpeptide. Die Eluierung wurde anhand der optischen Dichte bei 280 nm (unteres Profil) und 214 nm (oberes Profil) überwacht. Die durch einen Punkt gekennzeichneten Peptide wurden der Protein-Mikrosequenzierung unterzogen. Die Linie quer zum Profil gibt den Prozentsatz an Azetonitril an.

Abb. 2: zeigt die Restriktionskarte der LFA-1-Alpha-Untereinheit-CDNA-Klone. Restriktionsstellen sind *Bal I* (B1), *Bam HI* (B), *Bgl II* (Bg), *Cla I* (C), *Eco RI* (R), *Hinc II* (H), *Nru I* (N), *Pst I* (P), *Sca I* (Sc) und *Sma I* (S). Es werden Pfeile gezeigt, welche die Sequenzierungsstrategie angeben.

Abb. 3: zeigt das Nukleotid und die abgeleitete Aminosäurefolge der LFA-1-Alpha-Untereinheit. Die Folgen der Triptinpeptide und des Transmembranbereichs sind mit einer starken bzw. einer schaffierten Linie unterstrichen. Die vermutlichen Serinphosphorylationsstellen sind mit einem Kreis gekennzeichnet. Die Nukleotide im 3'-nichttranslatierten Bereich, die unterstrichen sind, entsprechen einer *Alu 1*-Folge.

Abb. 4: zeigt eine Ausrichtung oder Aufreihung der inneren Wiederholungen der LFA-1-Alpha-Untereinheit. Die Konsensus-Flankierungssequenz wird über den aufgereihten Wiederholungen gezeigt, während die Konsensus-divalente Bindungsstelle und die oben beschriebenen Bindungsstellen unten gezeigt werden. Ein Sternchen gibt an, daß mehr als ein Sauerstoff an der Kationbindung beteiligt ist.

Abb. 5: zeigt eine Aufreihung der menschlichen LFA-1-Alpha-Untereinheit mit anderen Gliedern der Integrin-Supergen-Familie und des N-Terminals der LFA-1-Alpha-Untereinheit von Mäusen. Die LFA-1 und wenigstens einem Integrin gemeinsamen Reste werden in einem Kästchen versehen. Der Abschnitt des Leukozyteninsets ist feststellbar. Die Grenzen der homologen Wiederholungen, welche die zweiwertigen Kationbindungsstellen enthalten, werden durch Dreiecke gekennzeichnet. Die Proteaseschneidestelle in den ECM-Rezeptor-Alpha-Untereinheiten wird durch Pfeile gekennzeichnet. Der Transmembranbereich ist unterstrichen.

Abb. 6: zeigt eine Aufreihung und einen Vergleich des L-Domänenbereichs der LFA-1-Alpha-Untereinheit mit den homologen Domänen im von-Willebrand-Faktor (vWF), Faktor B und CMP.

Abb. 7: zeigt eine schematische Darstellung der evolutionären Beziehungen von Domänen, die homolog zur L-Domäne sind.

I. Die Natur der Leukozytenadhäsionsproteine der LFA-1-Familie

Die drei Leukozytenadhäsionsproteine Mac-1, p 150,95 und LFA-1 unterscheiden sich in der Funktion und in der Expression auf Leukozytensubpopulationen. Mac-1 und p 150,95 werden auf Neutrophilen und Monozyten exprimiert (Springer, T. A. u. a., in „Biochemistry of Macrophages (Biochemie von Makrophagen)“ (CIBA Symposium 118); Pitman, London, S. 102–126 [1986]). Während der Differenzierung von Blutmonozyten in Gewebemakrophagen wird die Expression von p 150,95 stark erhöht und die Mac-1-Expression verringert (Schwartz, R. u. a., Blood 65: 974–983 [1985]; Hogg, N. u. a., Eur. J. Immunol. 16: 240–248 [1986]).

p150,95 wird auf verschiedenen Typen von aktivierten T- und B-Lymphozyten ebenfalls exprimiert, nicht aber wird es auf diesen Zellen in Blut exprimiert (Kaligaris-Cappio, F. u. a., *Blood* 66: 1035-1042 [1985]; Miller, L. J. u. a., *J. Immunol.* 137: 2891-2900 [1986]; Keizer, G. D. u. a., *J. Immunol.* 138: 3130-3136 [1987]).

Mac-1 und p150,95 werden in ein intrazelluläres, bläschenartiges Abteil in den zirkulierenden Neutrophilen und Monozyten exprimiert, welches durch Entzündungsmediatoren an die Zelloberfläche mobilisiert werden (Todd, R. F. u. a., *J. Clin. Invest.* 74: 1280-1290 [1984]; Springer, T. A. u. a., in: *Biochemistry of Macrophages (Biochemie von Makrophagen) (CIBA-Symposium 118)*, Pitman, London, S. 102 bis 126 [1986]; Lanier, L. L. u. a. *Eur. J. Immunol.* 15: 713 bis 718 [1985]; Yancey, K. B. u. a., *J. Immunol.* 135: 465-470 [1985]). Diese Mobilisierung steht in Korrelation mit einer erhöhten Haftfähigkeit (Anderson, D. C. u. a., *Ann. Rev. Med.* 38: 175-194 [1987]).

Monoklonale Antikörper zu Mac-1 oder p150,95 unterbinden die Neutrophilaggregation und Haftung an Endothelzellen, proteinüberzogenen Flächen, Bakterien, Protozoanparasiten und Pilzen (Harlan, J. M. u. a., *Blood* 66: 167-178 [1985]; Springer, T. A. u. a., in: *Biochemistry of Macrophages (Biochemie von Makrophagen) (CIBA-Symposium 118)*, Pitman, London, S. 102-126 [1986]; Dana, N. u. a., *J. Immunol.* 137: 3259 [1986]; Bullock, W. S. u. a., *J. Exper. Med.* 165: 195 bis 210 [1987]; Mosser, D. M. u. a., *J. Immunol.* 135: 2785 bis 2789 [1985]).

Mac-1 ist auch ein Rezeptor für die Komplementkomponente iC3b (Beller, D. I. u. a., *J. Exper. Med.* 156: 1000-1009 [1982]). Es wurde gezeigt, daß reinigungsmittellösliche Mac-1 und p150,95 in der Lage sind, sich an IC3b-Sepharose zu binden (Micklem, K. H. u. a., *Biochem. J.* 231: 233-236 [1985]).

LFA-1 ist an allen Leukozyten mit Ausnahme einer Untermenge von Makrophagen vorhanden. Monoklonale Antikörper-Blockierungsuntersuchungen haben gezeigt, daß LFA-1 bei der T-Lymphozytenvermittelten Abtötung, T-Helfer-Lymphozytenreaktionen, natürlichen Abtötung und antikörperabhängigen Abtötung wichtig ist (Springer, T. A. u. a., *Ann. Rev. Immunol.* 5: 223-252 [1987]). Die Adhäsion an der Zielzelle ist ein Schritt, der durch Antikörper gegen LFA-1 blockiert wird. Aus funktionellen Studien läßt sich vermuten, daß LFA-1 mit verschiedenen Liganden in Wechselwirkung steht, von denen einer ICAM-1 ist (Rothlein, R. u. a., *J. Immunol.* 137: 1270 bis 1274 [1986]).

Es wurde festgestellt, daß einige zytotoxische T-Lymphozytklone ähnliche Mengen von p150,95 und LFA-1 exprimieren. Monoklonale Antikörper zu diesen LFA-1- und p150,95-Alpha-Untereinheiten unterbinden das Abtöten durch diese CTL-Klone im ähnlichen Umfang und sind in ihrer hemmenden Wirkung additiv (Keizer, G. D. u. a., *J. Immunol.* 138: 3130-3136 [1987]). Außerdem wurde gezeigt, daß Antikörper zu p150,95-Alpha-Untereinheiten die Monozytenbindung an das Endothel unterbinden (Keizer, G. D. u. a., *Europ. J. Immunol.* 17: 1317-1322 [1987]).

II. Klonierung der LFA-1-Alpha-Untereinheit

Eine Vielzahl von Methoden kann angewendet werden, um das LFA-1-Alpha-Untereinheitsgen zu klonieren. Eine dieser Methoden beinhaltet die Analyse einer Schaukelvektorbibliothek von cDNA-Inserts (abgeleitet von einer die LFA-1-Alpha-Untereinheit exprimierenden Zelle) nach dem Vorhandensein eines Inserts, welches das Gen der LFA-1-Alpha-Untereinheit enthält. Eine solche Analyse kann durch Transfizieren von Zellen mit dem Vektor und anschließendes Überprüfen auf die Expression der LFA-1-Alpha-Untereinheit durchgeführt werden. Eine bevorzugte Methode zum Klonieren des Gens der LFA-1-Alpha-Untereinheit beinhaltet die Bestimmung der Aminosäurefolge eines LFA-1-Alpha-Untereinheitsmoleküls oder der Triptinpeptide des Moleküls. Zu diesem Zweck werden LFA-1-Alpha-Untereinheitsmoleküle vorzugsweise durch monoklonale Antikörper-Affinitätschromatografie von der Erzeugerzellen gereinigt und durch präparative Natriumdodezylsulfat-Polyakrylamid-Gelelektrophorese („SDS-PAGE“) und Elektroelution isoliert (Miller, L. J. u. a., *J. Immunol.* 138: 2381-2382 [1987], ein Beitrag, der hier als Verweis einbezogen wird). Die Alpha-Untereinheitsmoleküle werden mit Zyanogenbromid oder mit Proteasen wie Papain, Chymotrypsin oder Trypsin fragmentiert (Oike, J. u. a., *J. Biol. Chem.* 257: 9751-9758 [1982]; Liu, C. u. a., *Int. J. Pept. Protein Res.* 21: 209-215 [1983]). Vorzugsweise wird die Alpha-Untereinheit proteolytisch mit Trypsin verdaut. Die resultierenden Peptide werden durch Umkehrphasen-HPLC getrennt und einer Aminosäuresequenzierung unterzogen; dazu wird das Protein vorzugsweise durch automatisierte Sequenatoren analysiert. Obwohl es möglich ist, die vollständige Aminosäurefolge der LFA-1-Alpha-Untereinheit zu bestimmen, wird vorzugsweise nur die Sequenz der Peptidfragmente des Moleküls bestimmt. Eine bevorzugte Quelle für die LFA-1-Alpha-Untereinheit ist der Zellstamm SKW3.

Die Sequenz der Aminosäurereste in einem Peptid wird hier entweder unter Verwendung der allgemein verwendeten Dreibuchstaben-Bezeichnungen oder durch deren Einzelbuchstaben-Bezeichnung bezeichnet. Eine Aufstellung dieser Dreibuchstaben- und Einzelbuchstabenbezeichnungen wird in den Lehrbüchern, wie *Biochemistry (Biochemie)*, Lehninger, A., Orth Publishers, New York, NY (1970), gegeben. Wird eine solche Sequenz senkrecht aufgeführt, soll sich der Aminoterminalrest am Kopf der Aufstellung befinden, während der Karboxyterminalrest des Peptids unten in der Aufstellung angeordnet werden soll. Ebenso soll bei der waagerechten Aufstellung der Aminoterminalrest auf der linken Seite sein, während sich der Karboxyterminalrest am rechten Ende befinden soll.

Die Reste von Aminosäuren in einem Peptid können durch Bindestriche getrennt werden. Diese Gedanken- oder Bindestriche sollen nur die Darstellung der Folge erleichtern. Als rein illustratives Beispiel wird die folgende Aminosäurefolge gegeben:

-Gly-Ala-Ser-Phe-

sie gibt an, daß ein Ala-Rest an die Karboxygruppe von Gly gebunden ist und daß ein Ser-Rest mit der Karboxygruppe des Ala-Restes und mit der Aminogruppe eines Phe-Restes verbunden ist. Die Bezeichnung gibt weiter an, daß die Aminosäurefolge das Tetrapeptid Gly-Ala-Ser-Phe enthält. Die Bezeichnung beabsichtigt nicht, die Aminosäurefolge auf dieses eine Tetrapeptid zu begrenzen, sondern soll einschließen (1) das Tetrapeptid mit einer oder mehreren Aminosäuren, die entweder an dessen Amino- oder Karboxyende gebunden sind, (2) das Tetrapeptid mit einem oder mehreren Aminosäureresten, die sowohl an dessen Amino- als auch an dessen Karboxyende gebunden sind, (3) das Tetrapeptid ohne zusätzliche Aminosäurereste. Sobald ein oder mehrere geeignete Peptidfragmente sequenziert wurden, werden die DNA-Folgen untersucht, die sie codieren können. Da der genetische Code degeneriert ist, können mehr als ein Kodon zur Codierung einer bestimmten Aminosäure verwendet werden. (Watson, J. D., in: *Molecular Biology of the Gene [Molekularbiologie des Gens]*, 3. Aufl., W. A. Benjamin, Inc., Menlo Park, CA [1977], S. 356-357). Die Peptidfragmente werden analysiert, um Folgen von Aminosäuren zu identifizieren, die

durch Oligonukleotide mit dem niedrigsten Grad an Degeneration codiert sind. Das geschieht vorzugsweise durch Identifizierung von Folgen, die Aminosäuren enthalten, die nur durch einen einzigen Kodon codiert werden.

Obwohl gelegentlich eine Aminosäurefolge durch nur ein einziges Oligonukleotid codiert werden kann, kann die Aminosäurefolge häufig durch jeden einer Reihe ähnlicher Oligonukleotide codiert werden. Wichtig ist, daß zwar alle Glieder dieser Reihe Oligonukleotide enthalten, die das Peptidfragment codieren können und damit potentiell dieselbe Oligonukleotidsequenz wie das Gen enthalten, welches das Peptidfragment codieren kann, aber nur ein Glied des Satzes die Nukleotidfolge enthält, die mit der Nukleotidfolge des Gens identisch ist. Da dieses Glied in der Reihe oder dem Satz vorhanden ist und selbst bei Vorhandensein anderer Glieder der Reihe an die DNA hybridisieren kann, ist es möglich, den unfractionierten Satz von Oligonukleotiden auf dieselbe Art und Weise wie ein einzelnes Oligonukleotid zum Klonieren des Gens einzusetzen, welches das Peptid codiert.

Ein geeignetes Oligonukleotid oder eine Reihe von Oligonukleotiden, die in der Lage sind, ein Fragment des Gens der LFA-1-Alpha-Untereinheit zu codieren (oder komplementär zu diesem Oligonukleotiden oder Reihe von Oligonukleotiden ist), wird identifiziert (unter Anwendung des oben beschriebenen Verfahrens), synthetisiert und hybridisiert durch allgemein bekannte Methoden, anhand einer DNA oder vorzugsweise eines cDNA-Präparats, die von menschlichen Zellen abgeleitet wurden, die das LFA-1-Alpha-Untereinheits-Gen exprimieren können. Methoden der Nukleinsäurehybridisierung werden beschrieben von Maniatis, T. u. a. (In: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* [Molekulares Klonieren. Ein Laborhandbuch], Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY [1982]) und von Haymes, B. D. u. a., (In: *Nucleic Acid Hybridisation, A Practical Approach* [Nukleinsäurehybridisation, eine praktische Methode], IRL Press, Washington, DC [1985]), wobei diese Literaturangaben hier als Verweise herangezogen werden. Die Quelle für die verwendete DNA oder cDNA ist vorzugsweise auf LFA-1-Alpha-Untereinheitssequenzen angereichert worden. Diese Anreicherung ist am leichtesten möglich bei cDNA, die durch Extraktion von RNA aus Zellen gewonnen wurde, welche hohe Werte der LFA-1-Alpha-Untereinheit produzieren.

Methoden, wie die oben beschriebenen oder ähnliche, haben erfolgreich das Klonieren von Genen für menschliche Aldehyddehydrogenasen (Hsu, L. C. u. a., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 3771-3775 [1985]), Fibronektin (Suzuki, S. u. a., *Eur. Mol. Biol. Organ. J.* 4: 2519-2524 [1985]), des menschlichen Estrogen-Rezeptorgens (Walter, P. u. a., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 7889-7893 [1985]), des gewebeartigen Plasminogenaktivators (Pennica, D. u. a., *Nature* 301: 214 bis 221 [1983]), und menschlicher alkalischer Phosphatase-Plazental-Komplementär-DNA (Kam, W. u. a., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 8715-8719 [1985]) ermöglicht.

Unter Verwendung des genetischen Codes (Watson, J. D., in *Molecular Biology of the Gene* [Molekularbiologie des Gens], 3. Aufl., W. A. Benjamin, Inc., Menlo Park, CA [1977]) können ein oder mehrere Oligonukleotide identifiziert werden, die jeweils in der Lage wären, die Tryptinpeptide der LFA-1-Alpha-Untereinheit zu verschlüsseln. Die Wahrscheinlichkeit, daß ein bestimmtes Oligonukleotid faktisch die tatsächliche Codierungssequenz der tatsächlichen LFA-1-Alpha-Untereinheit darstellt, kann bestimmt werden durch Betrachtung von abnormalen Basenpaarungsbeziehungen und der Häufigkeit, mit der ein bestimmter Kodon tatsächlich genutzt wird (um eine bestimmte Aminosäure zu codieren) in eukaryotischen Zellen. Solche „Kodonnutzungsregeln“ werden von Lathe, R. u. a., *J. Molec. Biol.* 183: 1-12 (1985) beschrieben. Unter Anwendung der „Kodonnutzungsregeln“ von Lathe werden ein einzelnes Oligonukleotid oder eine Reihe von Oligonukleotiden, die eine theoretische „wahrscheinlichste“ Nukleotidfolge enthalten, welche die Tryptinpeptidsequenzen der LFA-1-Alpha-Untereinheit zu codieren in der Lage ist, identifiziert. Das Oligonukleotid oder die Reihe von Oligonukleotiden, welche die theoretisch „wahrscheinlichste“ Folge enthalten, die die Fragmente der LFA-1-Alpha-Untereinheit codieren können, wird zur Identifizierung der Sequenz eines komplementären Oligonukleotids oder Reihe von Oligonukleotiden verwendet, die in der Lage sind, an die „wahrscheinlichste“ Sequenz oder Reihe von Sequenzen zu hybridisieren. Ein Oligonukleotid, das eine solche komplementäre Sequenz enthält, kann als Sonde eingesetzt werden, um das Gen der LFA-1-Alpha-Untereinheit zu identifizieren und zu isolieren (Maniatis, T. u. a., *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* [Molekulares Klonieren, Ein Laborhandbuch], Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY [1982]).

Zusammenfassend kann also gesagt werden, daß die tatsächliche Identifizierung der Peptidsequenzen der LFA-1-Alpha-Untereinheit die Identifizierung einer theoretischen, „wahrscheinlichsten“ DNA-Folge oder einer Reihe solchen Folgen ermöglicht, die in der Lage sind, ein solches Peptid zu codieren. Durch Konstruktion eines Oligonukleotids, das komplementär zu dieser theoretischen Folge ist (oder durch Konstruktion einer Reihe von Oligonukleotiden, die komplementär zur Reihe der „wahrscheinlichsten“ Oligonukleotide ist), erhält man ein DNA-Molekül (oder eine Reihe von DNA-Molekülen), die als Sonde dienen können, um das Gen der LFA-1-Alpha-Untereinheit zu identifizieren und zu isolieren.

Es wurden einzelsträngige Oligonukleotidmoleküle, die komplementär zu den „wahrscheinlichsten“ Tryptinpeptidcodierungsfolgen der LFA-1-Alpha-Untereinheit sind, unter Anwendung von Verfahren synthetisiert, die Fachleuten allgemein bekannt sind (Belagaja, R. u. a., *J. Biol. Chem.* 254: 5765 bis 5780 [1979]; Maniatis, T. u. a., in *Molecular Mechanisms in the Control of Gene Expression* [Molekularmechanismen bei der Steuerung der Genexpression], Nierlich, D. P. u. a., Hsg., Acad. Press, NY [1976]; Wu, R. u. a., *Proc. Natl. Acad. Res. Molec. Biol.* 21: 101-141 [1978]; Khorana, R. G., *Science* 203: 614-625 [1979]). Außerdem kann die DNA-Synthese durch Anwendung von automatisierten Synthetisierungsgeräten durchgeführt werden.

Es ist möglich, das Gen der LFA-1-Alpha-Untereinheit aus eukaryotischen DNA-Präparaten zu klonieren, in denen dieses Gen vermutet wird. Um das Gen zu identifizieren und klonieren, welches das Protein der LFA-1-Alpha-Untereinheit codiert, wird eine DNA-Bibliothek oder vorzugsweise eine cDNA-Bibliothek auf ihre Fähigkeit screeniert, mit den oben beschriebenen Oligonukleotidsonden zu hybridisieren. Geeignete DNA-Präparate (beispielsweise menschliche genomische DNA) wird enzymatisch geschnitten oder zufällig geschert und in rekombinante Vektoren ligiert. Die Fähigkeit dieser rekombinanten Vektoren, an die oben beschriebenen Oligonukleotidsonden zu hybridisieren, wird dann gemessen. Verfahren für die Hybridisierung werden beispielsweise von Maniatis, T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* (Molekulares Klonieren. Ein Laborhandbuch), Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (1982), oder von Haymes, B. T. u. a., *Nucleic Acid Hybridization. A Practical Approach* (Nukleinsäurehybridisation. Eine praktische Methode), IRL Press, Oxford, England (1985), beschrieben. Die als für diese Hybridisierung fähig ermittelten Vektoren werden dann analysiert, um den Umfang und die Natur der in ihnen enthaltenen LFA-1-Alpha-Untereinheitssequenzen zu bestimmen. Ausgehend von rein statistischen Erwägungen, könnte ein Gen, wie das, welches das Molekül der LFA-1-Alpha-Untereinheit codiert, eindeutig identifiziert werden (über Hybridisations-Screening), wenn eine Oligonukleotidsonde mit nur 18 Nukleotiden eingesetzt wird.

Das klonierte Gen von LFA-1-Alpha-Untereinheit, das nach der oben beschriebenen Methode gewonnen wurde, kann operabel an einen Expressionsvektor gebunden werden und in prokaryotische oder eukaryotische Zellen eingeführt werden, um das Protein der LFA-1-Alpha-Untereinheit zu erzeugen. Techniken für diese Manipulationen werden von Maniatis, T. u. a., siehe oben, beschrieben und sind allgemein bekannt.

III. Die Expression der LFA-1-Alpha-Untereinheit

Vorliegende Erfindung leitet sich teilweise aus der Entdeckung der cDNA-Folge ab, welche die Alpha-Untereinheit des LFA-1-Moleküls codiert. Durch operables Binden dieser Sequenz (oder eines Fragments dieser Sequenz) an einen funktionellen Promotor, ist es möglich, die Expression der Alpha-Untereinheit von LFA-1 (oder eines funktionellen Derivats) in einer Zelle oder einem Organismus zu lenken.

Man sagt, daß ein Nukleinsäuremolekül, wie die DNA, ein Polypeptid „zu expressieren in der Lage ist“, wenn es Nukleotidfolgen enthält, die Transkriptions- und Translationsregulation sinformationen enthalten, und diese an Nukleotidfolgen, welche das Polypeptid codieren „operabel gebunden“ sind. Eine operable Bindung ist eine Bindung, bei der die regulatorischen DNA-Folgen und die DNA-Folge, die exprimiert werden soll, so verbunden sind, daß eine Expression des Gens möglich ist. Der präzise Charakter der regulatorischen Bereiche, die für die Genexpression erforderlich sind, kann von Organismus zu Organismus unterschiedlich sein, muß aber im allgemeinen einen Promotorbereich einschließen, der, bei Prokaryoten, sowohl den Promotor (der die Initiierung der RNA-Transkription lenkt) als auch die DNA-Folgen enthält, die bei der Transkription in die RNA die Initiierung der Proteinsynthese signalisieren. Regulatorische Bereiche in eukaryotischen Zellen schließen im allgemeinen einen Promotorbereich ein, der zur Lenkung der Initiierung der RNA-Synthese ausreichend ist.

Man sagt, daß zwei DNA-Folgen (wie der Promotorbereich mit seiner Folge und eine die LFA-1-Alpha-Untereinheit codierende Folge) operabel verbunden sind, wenn die Art der Bindung zwischen den beiden DNA-Folgen nicht (1) zur Einführung einer Phasenverschiebungsmutation führt, (2) die Fähigkeit der Promotorbereichsequenz beeinträchtigt, die Transkription der die LFA-1-Alpha-Untereinheit codierenden Sequenz zu lenken, oder (3) die Fähigkeit der die LFA-1-Alpha-Untereinheit codierenden Sequenz beeinträchtigt, durch die Sequenz des Promotorbereiches transkribiert zu werden. Folglich wäre ein Promotorbereich operabel mit einer DNA-Folge verbunden, wenn der Promotor in der Lage wäre, die Transkription dieser DNA-Folge zu bewirken. Vorliegende Erfindung schließt die Expression der LFA-1-Alpha-Untereinheit (oder deren funktionellen Derivats) in prokaryotischen oder eukaryotischen Zellen ein. Um die LFA-1-Alpha-Untereinheit (oder deren funktionelles Derivat) in einer prokaryotischen Zelle (wie beispielsweise *E. coli*, *B. subtilis*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* usw.) zu expressieren, ist es notwendig, die Codierungssequenz der LFA-1-Alpha-Untereinheit operabel an einen funktionellen prokaryotischen Promotor zu binden. Diese Promotoren können entweder konstitutiv oder vorzugsweise regulierbar (d. h., induzierbar oder derepressibel) sein. Zu den Beispielen für konstitutive Promotoren gehören der *Int*-Promotor des Bakteriophages λ , der *bla*-Promotor des β -Laktamase-Gens von pBR322 und der CAT-Promotor des Chloramphenikolazetyltransferase-Gens von pPR325 usw. Zu den Beispielen für induzierbare prokaryotische Promotoren gehören die rechten und linken Hauptpromotoren von Bakteriophag λ (P_L und P_R), die *trp*-, *recA*-, *lacZ*-, *lacI*- und *gal*-Promotoren von *E. coli*, die α -Amylase (Ulmanen, I. u. a. *J. Bacteriol.* 162: 176-182 [1985]) und die 6-28-spezifischen Promotoren von *B. subtilis* (Gilman, M. Z. u. a., *Gene* 32: 11-20 [1984]), die Promotoren der Bakteriophagen von *Bacillus* (Gryczan, T. J., in: *The Molecular Biology of the Bacilli* [Die Molekularbiologie der Bazillen], Academic Press, Inc., NY [1982]) und *Streptomyces*-Promotoren (Ward, J. M. u. a., *Mol. Gen. Genet.* 203: 468-478. Eine Übersicht über prokaryotische Promotoren geben Glick, B. R. (*J. Ind. Microbiol.* 1: 277-282 [1987]); Cenatiempo, Y. (*Biochimie* 68: 505-516 [1986]) und Gottesman, S. (*Ann. Rev. Genet.* 18: 415-442 [1984]).

Die richtige Expression in einer prokaryotischen Zelle verlangt das Vorhandensein einer Ribosombindungsstelle flussaufwärts der Gencodierungssequenz. Derartige Ribosombindungsstellen werden beispielsweise von Gold, L. u. a., *Ann. Rev. Microbiol.* 35: 365-404 (1981), aufgezeigt.

Wird die Expression in einer eukaryotischen Zelle, z. B. Hefe, gewünscht, ebenso in Pilzen, Zellen von Säugetieren oder Pflanzenzellen, dann muß ein Promotor eingesetzt werden, der in der Lage ist, die Transkription in einem solchen eukaryotischen Wirt zu lenken. Zu den bevorzugten eukaryotischen Promotoren gehören das Mäuse-Metathionin-I-Gen (Hamer, D. u. a., *J. Mol. Appl. Gen.* 1: 273-288 [1982]); das TK-Promotor des Herpes-Virus (McKnight, S., *Cell* 31: 355-365 [1982]); SV40-Vorpromotor (Benoist, C. u. a., *Nature* [London] 290: 304-310 [1981]; der Hefe-*gal4*-Gen-Promotor (Johnston, S. A. u. a., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 6971-6975 [1982]; Silver, P. A. u. a., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 5951-5955 [1984]).

Wie allgemein bekannt ist, wird die Translation von eukaryotischer mRNA an dem Kodon initiiert, der das erste Methionin codiert. Aus diesem Grund ist es vorteilhaft sicherzustellen, daß die Bindung zwischen einem eukaryotischen Promotor und einer DNA-Folge, welche die LFA-1-Alpha-Untereinheit (oder deren funktionelles Derivat) codiert, keine intervenierenden Kodone enthält, die ein Methionin (d. h. AUG) codieren können. Das Vorhandensein solcher Kodone führt entweder zu einer Bildung eines Fusionsproteins (wenn sich der AUG-Kodon in derselben Lesephase wie die LFA-1-codierende DNA-Folge befindet) oder zu einer Phasenverschiebungsmutation (wenn sich der AUG-Kodon nicht in derselben Lesephase wie die LFA-1-codierende Folge befindet).

Die DNA-Folge, welche das LFA-1-Protein (oder dessen funktionelles Derivat) codiert, wenn es operabel an einen funktionellen Promotor gebunden ist, wird vorzugsweise durch eine Vielzahl geeigneter Mittel, wie Transformation, Transfektion, Konjugation, Protoplastfusion, Elektroporation usw., in eine Rezipientenzelle eingeführt.

Die die LFA-1-Alpha-Untereinheit codierende Sequenz und ein operabel gebundenes Promotor können in eine Rezipientenzelle eingeführt werden als nichtreplizierendes DNA- (oder RNA-) Molekül, das entweder ein lineares Molekül oder, vorteilhafter, ein geschlossenes, kovalentes, rundes Molekül sein kann. Da solche Moleküle zur autonomen Replikation nicht in der Lage sind, kann die Expression des LFA-1-Alpha-Untereinheit-Polypeptids durch die transiente Expression des eingeführten Sequenz erfolgen. Als Alternative dazu kann eine permanente Expression durch die Integration des eingeführten Sequenz in das Wirtschromosom erfolgen.

Vorzugsweise wird die eingeführte Sequenz in ein Plasmid oder in einen Viralvektor eingeführt, die zur autonomen Replikation im aufnehmenden Wirt in der Lage sind. Zu diesem Zweck kann eine ganze Vielfalt von Vektoren verwendet werden. Zu den Faktoren, die bei der Auswahl eines bestimmten Plasmids oder Viralvektors von Bedeutung sind, gehören die Leichtigkeit, mit der die den Vektor enthaltenden Rezipientenzellen erkannt und aus den Rezipientenzellen ausgewählt werden können, die den

Vektor nicht enthalten; die Anzahl der Kopien des Vektors, die in einem bestimmten Wirt gewünscht werden, und die Frage, ob es wünschenswert ist, wenn der Vektor zwischen Wirtszellen unterschiedlicher Spezies „schaukeln“ kann. Zu den bevorzugten prokaryotischen Vektoren gehören Plasmide, wie die zur Replikation in *E. coli* geeigneten (wie beispielsweise pBR322, ColE1, pSC101, pACYC184, pVX). Solche Plasmide werden beispielsweise beschrieben von Maniatis, T. u. a., in: *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* (Molekulares Klonieren. Ein Laborhandbuch), Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (1982). *Bacillus*-Plasmide schließen pC194, pC221, pT127 usw. ein. Solche Plasmide werden von Gryczan, T. beschrieben (in: *The Molecular Biology of the Bacilli* [Die Molekularbiologie der Bazillen], Academic Press, NY (1982), S.307–329. Zu den geeigneten *Streptomyces*-Plasmiden gehören pIJ 101 (Kendall, K. J. u. a., *J. Bacteriol.* 169: 4177–4183 (1987)) und *Streptomyces*-Bakteriophage wie ϕ C31 (Chater, K. F. u. a., in: *Sixth International Symposium on Actinomyceteles Biology* [6. Internationales Symposium zur Aktinomyzetenbiologie], Akademiai Kiado, Budapest, Ungarn (1986), S.45–54). Eine Übersicht über *Pseudomonas*-Plasmide gibt John, J. F. u. a. (*Rev. Infect. Dis.* 8: 693–704 (1986)), ebenso wie Izaki, K. (*Jpn. J. Bacteriol.* 33: 729–742 (1978)).

Zu den bevorzugten eukaryotischen Plasmiden gehören BPV, Vakzinia, SV40, 2-Mikronkreis usw. oder deren Derivate. Diese Plasmide sind in Fachkreisen allgemein bekannt (Botstein, E. u. a., *Miami Wnter Symp.* 19: 265–274 (1982); Broach, J. R., in: *The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*: Life Cycle and Inheritance* [Molekularbiologie von Hefe-*Saccharomyces*: Lebenszyklus und Vererbung], Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, S.445–470 (1981); Broach, J. R., *Cell* 28: 203–204 (1982); Bollon, D. P. u. a., *J. Clin. Hematol. Oncol.* 10: 39–48 (1980); Maniatis, T. in: *Cell Biology: A Comprehensive Treatise*, Vol. 3. *Gene Expression* [Zellbiologie: Eine umfassende Abhandlung. Bd.3. Genexpression], Academic Press, NY, S.563–808 (1980)).

IV. Anwendung der LFA-1-Alpha-Untereinheit oder deren Fragmente

Vorliegende Erfindung vermittelt die Nukleinsäure- und Proteinfolgen der Alpha-Untereinheit des LFA-1-Rezeptormoleküls. Diese Entdeckung ermöglicht die Anwendung der Rekombinant-DNA-Technik zur Herstellung des LFA-1-Alpha-Untereinheitsmoleküls. Wie unten noch ausgeführt wird, bezieht sich ein Ausführungsbeispiel der vorliegenden Erfindung auf die Anwendung der Alpha-Untereinheit des LFA-1-Moleküls als solches, als entzündungshemmendes Mittel. Bei einem bevorzugten Ausführungsbeispiel wird die Alpha-Untereinheit des LFA-1-Moleküls in Verbindung mit dessen Beta-Untereinheit verwendet. Eine solche Verbindung oder Kombination kann durch eine Vielzahl von Methoden herbeigeführt werden.

Beispielsweise kann die Beta-Untereinheit von LFA-1-Molekül getrennt von der LFA-1-Alpha-Untereinheit produziert und die beiden Moleküle dann zusammengemischt werden. Günstiger ist es jedoch, die Alpha- und die Beta-Untereinheit von LFA-1 in derselben Wirtszelle zu produzieren, um deren Selbstmontage zu einem LFA-1-Heterodimerrezeptormolekül zu erleichtern. Die Beta-Untereinheit von LFA-1 (die für LFA-1 und Mac-1 gemeinsam ist) kann entweder durch chemische Synthese oder durch Rekombinante-DNA-Techniken produziert werden (Kishimoto, T. K., u. a., *Cell* 48: 681–690 (1987)). Die Klonierung der Beta-Untereinheit von LFA-1 wird außerdem in der hiermit im Zusammenhang stehenden US-PA, Reihen-Nr. 019 440, vom 26. Februar 1987 offengelegt, die hier als Referenz einbezogen wird.

Ein Aspekt der vorliegenden Erfindung bezieht sich auf die Entdeckung der Nukleinsäure- und Proteinsequenz der Alpha-Untereinheit des LFA-1-Rezeptormoleküls. Diese Entdeckung ermöglicht die Anwendung der Rekombinant-DNA-Technik zur Herstellung von funktionellen Derivaten der LFA-1-Alpha-Untereinheit, die als Antagonisten zur Zelladhäsion wirken können. Unter „Antagonist zur Zelladhäsion“ versteht man hier jedes Molekül, das in der Lage ist, den Prozeß der Zell-Zell- oder Zell-Substrat-Adhäsion zu unterbinden. Ob eine bestimmte Verbindung ein Antagonist ist, kann man durch eine Überprüfung der Leukozytenaggregation an Endothelzellen bestimmen. Geeignete Überprüfungsmethoden werden beispielsweise von Rothlien, R. u. a., *J. Exper. Med.* 163: 1132 bis 1149 (1986), beschrieben, wobei diese Quelle hier als Referenz einbezogen wird. Antagonisten der Leukozytenaggregation können als entzündungshemmende Mittel eingesetzt werden.

Unter einem „funktionellen Derivat“ der Alpha-Untereinheit von LFA-1 versteht man hier eine Verbindung, welche eine biologische Aktivität (funktionell oder strukturell) besitzt, die im wesentlichen der biologischen Aktivität der Alpha-Untereinheit von LFA-1 ähnlich ist. Zu den Beispielen für die biologische Aktivität gehören die Fähigkeit zur Bindung an ICAM-1, einen anderen natürlichen Liganden des LFA-1-Moleküls oder die Beta-Untereinheit der LFA-Familie der Glykoproteine. Eine solche Bindung würde adhäsionsverwandte Ereignisse unterbinden, wie die Lymphozytenbindung an Endothelzellen, antigenpräsentierenden Zellen oder Zielzellen. Man sagt, daß ein Molekül einem anderen Molekül „im wesentlichen ähnlich“ ist, wenn beide Moleküle im wesentlichen ähnliche Strukturen haben oder wenn beide Moleküle eine ähnliche biologische Aktivität besitzen. Die „funktionellen Derivate“ der Alpha-Untereinheit von LFA-1 schließen sowohl „Fragmente“ als auch „Varianten“ der LFA-1-Alpha-Untereinheit ein. Unter dem Begriff „Fragment der Alpha-Untereinheit von LFA-1“ versteht man jede Polypeptiduntermenge dieses Moleküls. Unter dem Begriff „Variante der Alpha-Untereinheit von LFA-1“ versteht man ein Molekül, das in der Struktur entweder dem ganzen Molekül oder einem Fragment davon im wesentlichen ähnlich ist, vorausgesetzt, daß die „Variante“ wenigstens eine biologische Aktivität hat, die einer Aktivität der Alpha-Untereinheit von LFA-1 entweder ähnlich ist oder eine Aktivität von LFA-1 unterbindet. Vorausgesetzt also, daß ein Molekül wenigstens eine biologische Aktivität besitzt, die entweder einer Aktivität von LFA-1 ähnlich ist oder eine solche Aktivität unterbindet, wird es als eine „Variante“ der Alpha-Untereinheit von LFA-1 betrachtet, wie dieser Begriff hier verwendet wird, selbst wenn eines der Moleküle eine oder mehrere Aminosäuren enthält, die in der anderen nicht vorhanden sind, oder wenn die Sequenzen der Aminosäurereste in den beiden Molekülen nicht identisch sind. So würde beispielsweise eine Verbindung, der eine oder mehrere Aminosäurereste, die in der Alpha-Untereinheit von LFA-1 gefunden werden (oder nicht gefunden werden) fehlen (oder die diese enthält), als eine Variante der Alpha-Untereinheit von LFA-1 betrachtet, wenn diese Verbindung eine biologische Aktivität besäße, die einer biologischen Aktivität der Alpha-Untereinheit von LFA-1 ähnlich wäre (oder diese unterbände). Der Begriff „biologische Aktivität“ soll „katalytische“ wie „strukturelle“ Aktivität usw. einschließen (d. h., die Fähigkeit, sich an ein anderes Molekül, wie ICAM-1, einen anderen natürlichen Liganden des LFA-1-Moleküls, die Beta-Untereinheit von LFA-1 oder einen Anti-Alpha-Untereinheit-LFA-1-Antikörper zu binden).

Vorliegende Erfindung betrifft eine Methode zur Herstellung von funktionellen Derivaten der Alpha-Untereinheit des LFA-1-Moleküls. Um solche Derivate zu erhalten, braucht man nur eine DNA-, RNA- oder (vorzugsweise) die cDNA-Folge zu

mutagenisieren, welche die LFA-1-Alpha-Untereinheit codiert. Die Mutagenese kann entweder zufällig oder stellenspezifisch sein. Außerdem kann die Mutagenese entweder spontan oder unter Verwendung von chemischen, radioaktiven oder rekombinanten Techniken induziert sein.

Der Rahmen der Erfindung soll außerdem funktionelle Derivate einschließen, denen bestimmte Aminosäurereste fehlen oder die geänderte Aminosäurereste enthalten, solange diese Derivate die Fähigkeit aufweisen, die Zellularadhäsion zu verstärken oder zu unterbinden.

Chemische Mutagene schließen ein Basenanalogue (wie beispielsweise 5-Bromourazil oder 2-Aminopurin); Deaminierungsmittel (wie beispielsweise salpetrige Säure, Hydroxylamin usw.); alkylierende Mittel (wie beispielsweise Methylmethansulfonat, Nitrosoguanidin usw.) oder interkalierende Mittel (wie beispielsweise Akridinorange, Ethidiumbromid, Psoralen usw.). Die strahlungsinduzierte Mutation kann bewirkt werden durch solche Mittel wie Ultraviolettlicht, Gammastrahlen, Röntgenstrahlen usw. Methoden zur Mutagenisierung von Nukleinsäuremolekülen werden gegeben von Miller, J. H. (in: *Experiments in Molecular Biology* [Experimente in der Molekularbiologie], Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY [1972]) und Silhavy, T. J. u. a. (in: *Experiments with Gene Fusions* [Experimente mit Genfusionen], Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY [1984]).

Die stellenspezifische Mutagenese kann angewendet werden, um spezifische Mutationen an gewünschten Stellen der Nukleinsäure, welche die LFA-1-Alpha-Untereinheit codiert, zu produzieren. Kurz gesagt, solche Verfahren schließen im allgemeinen die Synthese eines synthetischen Oligonukleotids mit einer gewünschten und definierten DNA-Folge ein. Methoden zur Synthetisierung solcher Oligonukleotide werden von Itakura, K. u. a. (Ann. Rev. Biochem. 53: 323-356 [1984]) beschrieben. Ein Nukleinsäuremolekül, welches das LFA-1-Alpha-Untereinheit-Protein oder dessen funktionelles Derivat codiert, wird im allgemeinen auf einen doppelsträngigen Vektor wie M13, ØX174 usw. subkloniert, dessen einzelne Stränge voneinander getrennt sein können. Dann wird ein einzelner Strang des Vektors bei Vorhandensein des synthetischen Oligonukleotids inkubiert. Da die DNA des Oligonukleotids steuerbar definiert ist, ist es möglich, ein Oligonukleotid zu konstruieren, welches zur Basenpaarung mit einem beliebigen Bereich der die LFA-1-Alpha-Untereinheit codierenden Nukleinsäure in der Lage ist. Sobald zwischen dem Oligonukleotid und dem einzelsträngigen Plasmid die Basenpaarung erfolgt ist, kann man das Oligonukleotid unter Verwendung von DNA-Polymerase erweitern, um ein doppelsträngiges DNA-Molekül zu schaffen, das dann durch DNA-Ligase verschlossen werden kann. Wenn dieses doppelsträngige DNA-Molekül in eine Zelle eingeführt wird, ergibt eine semikonservative DNA-Replikation die Produktion von Nachkommenmolekülen, bei denen die DNA-Folge des Oligonukleotidfragments in die Codierungsfolgen für die LFA-1-Alpha-Untereinheit einbezogen wurde.

Als Alternative dazu kann die LFA-1-Alpha-Untereinheit der vorliegenden Erfindung oder deren funktionelles Derivat hergestellt werden durch chemische synthetische Methoden unter Anwendung der allgemein bekannten Merrifield- oder anderer Techniken der Peptidsynthese. Als Alternative können solche Moleküle auch durch chemische Synthese von Nukleinsäuremolekülen (unter Anwendung beispielsweise der Phosphodiester-synthesemethoden) hergestellt werden, welche nach der Expression zu ihrer Produktion führen.

Wenn man so beispielsweise eine Punktmutation und eine exogene DNA-Folge in eine bestimmte Stelle der LFA-1-Codierungsfolge einführen oder eine Deletion von Nukleotiden, die normalerweise in einer solchen Folge vorhanden sind, vornehmen will, würde man ein Oligonukleotidfragment konstruieren, welches die Mutation oder Folge enthält (oder nicht enthält), und dann das oben beschriebene Verfahren anwenden. Um eine solche Mutation oder exogene DNA-Folge in einen bestimmten Bereich der die LFA-1-Alpha-Untereinheit codierenden Nukleinsäure einzuführen, müssen die Mutation oder die exogene DNA-Folge mit flankierenden DNA-Folgen umgeben werden, die komplementär zur DNA-Folge des Bereichs sind, dessen Mutagenese gewünscht wird (Jenkins, F. u. a., *Bioessays* 5: 244-247 [1986]; Doerfler, W., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 23: 919-931 [1984]; Kaina, B., *Biol. Zentralbl.* 99: 513-531 [1980]; Kunkel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 488-492 [1985]; Nisbet, I. T. u. a., *Gene Anal. Techn.* 2: 23-29 [1985]; Hines, J. C. u. a., *Gene* 11: 207-218 [1980]; Messing, J. u. a., *Nucl. Acid Res.* 9: 309 [1981]). Mutationen können auch durch Anwendung der Rekombinant-DNA-Technik erzeugt werden. Beispielsweise kann die Nukleotidfolge eines Nukleinsäuremoleküls, welches die LFA-1-Alpha-Untereinheit codiert, abgetastet werden, um Oligonukleotidstellen zu identifizieren, die durch Restriktionsendonukleasen erkennbar sind. Solche Endonukleasen können dann eingesetzt werden, um die Nukleinsäurefolge an einer erkannten Stelle spezifisch zu schneiden. Durch Anwendung einer Restriktionsendonuklease, welche zwei Positionen in der LFA-1-Codierungsfolge erkennt (und an diesen schneidet), ist es möglich, ein Fragment der die LFA-1-Alpha-Untereinheit codierenden Folge herauszuschneiden. Als Alternative ist es möglich, zu diesem Zweck zwei verschiedene Endonukleasen einzusetzen. Durch Inkubation der geschnittenen Moleküle bei Vorhandensein von DNA-Ligase ist es möglich, die die LFA-1-Alpha-Untereinheit codierenden Sequenzen wieder zu verschließen und eine einzelne Sequenz zu bilden (der das herausgeschnittene Fragment fehlt). Wenn in den die LFA-1-Alpha-Untereinheit codierenden Sequenzen keine geeigneten Erkennungsstellen für die Restriktionsnuklease vorhanden sind, können solche Stellen durch das oben beschriebene stellenspezifische Mutageneseverfahren in die Sequenzen eingeführt werden. Als Alternative dazu können Mutationen eingeführt werden durch Schneiden der die LFA-1-Alpha-Untereinheit codierenden Folge und „Anknabbern“ der freien Termini mit einer Exonuklease. Durch eine solche Behandlung ist es möglich, nicht nur Deletionen, sondern auch Phasenverschiebungen und andere Typen von Mutationen einzuführen. Mit dieser Technik ist es außerdem möglich, neuartige Restriktionsendonukleasestellen in die die LFA-1-Alpha-Untereinheit codierende Folge einzuführen. Methoden zur Anwendung von Restriktionsendonukleasen, DNA-Ligasen und Exonukleasen werden beispielsweise von Maniatis, T. u. a. beschrieben (in: *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* [Molekulares Klonieren. Ein Laborhandbuch], Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY [1982]).

Rekombinant-DNA-Methoden können auch angewendet werden, um Fusionsproteine herzustellen, die aus dem LFA-1-Alpha-Untereinheit-Protein (oder dessen funktionellem Derivat) und einem neuartigen Polypeptid zusammengesetzt sind. Dieses neuartige Polypeptid ist nicht auf ein bestimmtes Polypeptid begrenzt und kann entweder eine einzelne Aminosäure oder einen Satz oder eine Permutation von Aminosäuren aufweisen. Ein solches Fusionsmolekül kann hergestellt werden durch Ligation einer DNA-Folge, welche das neuartige Polypeptid codiert, an eine DNA-Folge, welche die LFA-1-Alpha-Untereinheit (oder deren funktionelles Derivat) codiert, wobei das auf eine Art und Weise geschieht, daß keine Phasenverschiebungsmutation eingeführt wird. Zu den Beispielen für bevorzugte Polypeptide, die an das LFA-1-Alpha-Untereinheitsgen (oder deren funktionelles Derivat) verschmolzen werden können, gehören eukaryotische oder prokaryotische Signalfolgen (Gilbert, W. u. a., *US-PS* 4411 994; Casadaban, M. u. a., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4530 bis 4533 [1979]) oder Polypeptide, welche die Stabilität, biologische

Halbwertszeit oder Potenz der LFA-1-Alpha-Untereinheit (oder deren funktionellen Derivats) erweitern (oder verringern). Eine ausgezeichnete Übersicht über die Methodologie der Gen-Fusionen wird gegeben von Silhavy, T. J., u. a. (in: *Experiments with Gene Fusions* (Experimente mit Gen-Fusionen), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY [1984]).

In Reaktion auf Immunisierung mit Fragmenten der LFA-1-Alpha-Untereinheit können Antikörper (insbesondere monoklonale Antikörper) ausgelöst werden. Diese Antikörper können dazu genutzt werden, die Bindung bestimmter Leukozyten an Endothelzellen, antigenpräsentierende Zellen oder Zielzellen zu verhindern, und sie können damit als entzündungshemmende Stoffe eingesetzt werden.

Unter Anwendung der oben beschriebenen Methoden können Fragmente der LFA-1-Alpha-Untereinheit hergestellt und überprüft werden, um festzustellen, ob sie Antagonisten der Zelladhäsion sind. Fragmente, die als Antagonisten der Zelladhäsion ermittelt wurden, können in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung als entzündungshemmende Mittel eingesetzt werden.

Vorliegende Erfindung leitet sich teilweise aus der Entdeckung ab, daß die Leukozyten-Substrat-Adhäsion und die Leukozyten-Endothelzellenhaftung aus Wechselwirkungen unter Beteiligung des LFA-1-Rezeptors resultieren. Da Zellularadhäsion notwendig ist, damit Leukozyten an Entzündungsstellen wandern und/oder verschiedene Effektorfunktionen, die zur Entzündung beitragen, ausüben können, dämpfen oder verhindern Mittel, welche diese Zellularadhäsion unterbinden, eine Entzündung. Das LFA-1-Rezeptormolekül ist auf der Oberfläche von Leukozytenzellen vorhanden. Die Adhäsion dieser Zellen an Monoschichten von Endothelzellen wird teilweise durch LFA-1 vermittelt.

Die Wechselwirkung von LFA-1-Molekülen mit ihren natürlichen Liganden (wie ICAM-1 usw.) ist für die Zellularadhäsion von zentraler Bedeutung. Durch den Vorgang der Adhäsion sind Lymphozyten in der Lage, ein Tier kontinuierlich auf das Vorhandensein von Fremdan antigenen zu überwachen. Obwohl diese Prozesse normalerweise wünschenswert sind, sind sie auch die Ursache für die Abstoßung von Organtransplantaten, Abstoßung von Gewebeverpflanzungen und vielen Autoimmunkrankheiten. Folglich wären alle Mittel, die Zellularadhäsion zu dämpfen oder zu unterbinden, bei Rezipienten von Organtransplantaten, Gewebeverpflanzungen oder Patienten mit Autoimmunkrankheiten äußerst wünschenswert.

Mittel, die diesen Wechselwirkungen entgegenwirken, sind sehr als entzündungshemmende Mittel bei Säugetieren geeignet. Signifikant ist, daß sich diese Mittel von den allgemeinen entzündungshemmenden Mitteln darin unterscheiden, daß sie die Adhäsion selektiv unterbinden können und keine anderen Nebenwirkungen wie Nephrotoxizität aufweisen, die bei herkömmlichen Mitteln vorhanden sind. Mittel, die zur Bindung an die Alpha-Untereinheit von LFA-1 oder an ICAM-1 oder an einen anderen natürlichen Liganden des LFA-1-Moleküls in der Lage sind, können folglich dazu genutzt werden, die Abstoßung von Organen oder Gewebe, die Verpflanzungs-Wirksamkeit (d. h., die Abstoßung von Wirtsgewebe, die durch eine Verpflanzung von Knochenmark oder anderem lymphozythaltigen oder -erzeugenden Gewebe verursacht wird) zu verhindern oder Autoimmunreaktionen zu modifizieren durch Beeinträchtigung der zellgebundenen LFA-1, ohne daß die Gefahr von Nebenwirkungen besteht (wie die Wechselwirkung mit den zellgebundenen Liganden usw.).

Wichtig ist, daß die Verwendung von Mitteln, die solche Moleküle zu erkennen in der Lage sind, es ermöglicht wird, Organtransplantationen selbst zwischen Patienten mit einer HLA-Fehlanspassung durchzuführen.

Mittel, welche die Fähigkeit des LFA-1-Rezeptormoleküls beeinträchtigen, sich an den natürlichen Bindungsliganden zu binden, können damit alle die oben beschriebenen LFA-1-abhängigen Funktionen beeinträchtigen. Folglich können diese Mittel als entzündungshemmende Mittel nach der vorliegenden Erfindung dienen. Zu diesen Mitteln gehören die LFA-1-Alpha-Untereinheit, LFA-1 (Alpha- und Beta-Untereinheiten) und Antikörper, die zur Bindung an die LFA-1-Alpha-Untereinheit oder Fragmente dieser Untereinheit in der Lage sind. Alle diese Mittel können in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung eingesetzt werden. Die entzündungshemmenden Mittel nach der vorliegenden Erfindung sind geeignet für die Behandlung von Entzündungen, die durch die Reaktion des spezifischen Abwehrsystems verursacht wurden.

Unter dem Begriff „spezifisches Abwehrsystem“ versteht man hier die Komponente des Immunsystems, die auf das Vorhandensein von spezifischen Antigenen reagiert. Zu diesen Zellen gehören Lymphozyten und Makrophagen. Man sagt, daß eine Entzündung aus einer Reaktion des spezifischen Abwehrsystems resultiert, wenn die Entzündung durch eine Reaktion des spezifischen Abwehrsystems verursacht, mediert oder assoziiert ist. Zu den Beispielen für eine Entzündung, die aus einer Reaktion des spezifischen Abwehrsystems resultiert, gehören die Reaktion auf Antigene wie Rubella-Virus, Autoimmunkrankheiten, durch T-Zellen vermittelte, verzögerte Hypersensitivität (wie beispielsweise bei Personen sichtbar, die im Mantoux-Test „positiv“ reagieren), Organ- oder Gewebeabstoßung, Verpflanzungs-Wirksamkeit (d. h., die Abstoßung von Wirtsgewebe, die durch eine Verpflanzung von Knochenmark oder anderem lymphozythaltigen oder -erzeugenden Gewebe verursacht wird) usw. Die Fähigkeit der LFA-1-Alpha-Untereinheit und deren funktioneller Derivate, diesen entzündlichen Reaktionen entgegenzuwirken, stellt die Grundlage für deren therapeutische Anwendung bei der Behandlung von chronischen entzündlichen Erkrankungen und Autoimmunkrankheiten wie Lupus erythematosus, Autoimmunthyroiditis, experimentelle allergische Enzephalomyelitis (EAE), multiple Sklerose, einige Formen von Diabetes, das Reynaud-Syndrom, rheumatoide Arthritis usw. dar.

Da LFA-1 auf Zellen exprimiert wird, die zur Bindung an Endothelgewebe in der Lage sind, stellt die Verabreichung der LFA-1-Alpha-Untereinheit oder von LFA-1 (Alpha- und Beta-Untereinheiten) an einen Patienten eine Maßnahme zur Bildlichmachung oder Visualisierung von Endothelgewebe dar. Außerdem vermittelt dieses Verfahren diagnostische Informationen zur Menge und Verteilung der Bindungsliganden des LFA-1-Rezeptormoleküls, die an dem visualisierten Gewebe vorhanden sind. Bei einer solchen Anwendung werden die LFA-1-Alpha-Untereinheiten (oder LFA-1-Alpha-Beta-Rezeptormoleküle) durch die Verwendung von Radioisotopen, Affinitätsmarkierungen (wie Biotin, Avidin usw.), Fluoreszenzmarkierungen, paramagnetische Atome usw. nachweisbar markiert. Die Antikörper (oder deren Fragmente) können durch die Verwendung von Radioisotopen, Enzymmarkierungen, Fluoreszenzmarkierungen, paramagnetischen Markierungen, Elektronendichtemarkierungen, Toxinmarkierungen usw. nachweisbar markiert werden. Zu den bevorzugten Toxinmarkierungen gehören Diphtherietoxin, Rizin und Cholera toxin. Die Verabreichung dieser markierten Moleküle an eine Person identifiziert die Entzündungsstellen. Derartige nachweisbare Markierungen können auch zur Überprüfung des Status des Immunsystems eines Patienten eingesetzt werden. Eine Übersicht über die Anwendung von Antikörpern bei der diagnostischen Sichtbarmachung geben Grossman, H. B., *Urol. Clin. North Amer.* 13: 465-474 (1986), Unger, E. C., u. a., *Invest. Radiol.* 20: 693-700 (1985) und Khaw, B. A., u. a., *Science* 209: 295-297 (1980).

Die Fähigkeit der Leukozyten, spontan zu Entzündungsstellen zu wandern, die ist von LFA-1 abhängig (Keizer, G. D., u. a., Eur. J. Immunol. 17: 1317–1322 [1987]). Diese Wanderung kann durch Verabreichung von LFA-1-Alpha-Untereinheiten von LFA-1 (Alpha- und Beta-Untereinheit) an einen Patienten unterbunden werden. Ebenso wurde festgestellt, daß die Fähigkeit von Leukozyten, an Endothelzellen zu haften, von LFA-1 abhängig ist. Jedes der entzündungshemmenden Mittel nach der vorliegenden Erfindung kann zur Unterbindung dieser Aktivitäten eingesetzt werden.

ICAMs (wie ICAM-1) werden von bestimmten Viren des Menschen erkannt (insbesondere Rhinoviren des Haupttyps), die sich an ICAM-1 binden. Diese Viren binden sich auf Grund dieses Erkennens an menschliche Zellen und übertragen damit die Vireninfektion. Ein zentraler Schritt in der Ätiologie von Virenerkrankungen ist daher die Wechselwirkung zwischen diesen zellulären Rezeptoren und dem Virus.

Mittel, welche die Fähigkeit eines Virus, sich an ein ICAM-Molekül zu binden, unterdrücken, mit dieser konkurrieren oder diese unterbinden, sind daher von Nutzen bei der Behandlung von Viren- (insbesondere von Rhinoviren-)infekten. Ein Gesichtspunkt der vorliegenden Erfindung betrifft daher die Fähigkeit der Alpha-Untereinheit von LFA-1 und deren funktionellen Derivaten, in Wechselwirkung mit ICAM-1 zu treten und dadurch entweder die Zell-Viren-Bindung und die Vireninfektion zu verhindern oder die Schwere oder Dauer einer solchen Infektion zu dämpfen oder zu verkürzen.

Von besonderem Interesse für die vorliegende Erfindung sind funktionelle Derivate der Alpha-Untereinheit von LFA-1, wie die solubilisierten Formen der Alpha-Untereinheit von LFA-1, Fragmente der Alpha-Untereinheit von LFA-1 usw. Diese Mittel werden an einen aufnehmenden Patienten vorzugsweise als Heterodimer vermittelt, das das Molekül in Assoziation mit einem Molekül der Beta-Untereinheit der CD-18-Familie enthält. Das oben beschriebene Ziel der Behandlung einer Vireninfektion kann mit einem einzigen Mittel oder mit einer Kombination von mehr als einem Mittel erreicht werden.

Zum Zwecke der Behandlung von Vireninfektionen ist (sind) das (die) Mittel nach der vorliegenden Erfindung einem rezipienten Patienten (beispielsweise durch intranasale Mittel) in einer Dosierung zu verabreichen, die ausreicht, damit das (die) Mittel die Fähigkeit eines Virus unterdrücken, mit dieser konkurrieren oder diese unterbinden kann (können), sich an ein ICAM-Molekül zu binden. Diese Dosierung dürfte im allgemeinen bei 0,01 pg/kg bis zu 1 mg/kg Körpergewicht des Patienten (für jedes einzelne Mittel) liegen, obwohl auch mit größeren oder kleineren Mengen gearbeitet werden kann.

Zum Zwecke der Behandlung eines Vireninfekt kann die Verabreichung dieses (r) Mittel(s) entweder „prophylaktisch“ oder „therapeutisch“ erfolgen. Bei der prophylaktischen Verabreichung wird das (werden die) Mittel vor dem Zeitpunkt der Infektion (d. h., vor, zum Zeitpunkt der oder kurz nach der Infektion), aber noch vor Auftreten von Symptomen der Vireninfektion gegeben. Die prophylaktische Verabreichung der (des) Mittel(s) dient der Verhinderung oder Abschwächung einer nachfolgenden Infektion. Bei der therapeutischen Verabreichung wird das (werden die) Mittel bei Beginn eines Symptoms der tatsächlichen Vireninfektion (oder kurze Zeit danach) (wie beispielsweise beim Auftreten einer viral induzierten Nasalkongestion usw. oder bei Feststellung des Virus in Körperflüssigkeit oder bei Feststellung von Antikörpern, die gegen das Virus gerichtet sind, im Serum des infizierten Patienten usw.). Die therapeutische Verabreichung des Mittels (der Mittel) dient dazu, jeden tatsächlichen Infekt zu dämpfen und damit seine Schwere oder Dauer zu verringern.

V. Verabreichung der LFA-1-Alpha-Untereinheit

Die therapeutischen Wirkungen der LFA-1-Alpha-Untereinheit können erreicht werden, wenn einem Patienten das LFA-1-Rezeptormolekül (Alpha- und Beta-Untereinheit). Das gesamte Molekül der LFA-1-Alpha-Untereinheit oder deren therapeutisch aktiven, funktionellen Derivate verabreicht werden. Diese Moleküle können entweder synthetisch oder durch Anwendung der Rekombinant-DNA-Technik oder von natürlichen Quellen gewonnen werden. Fragmente des LFA-1-Rezeptors oder von dessen Alpha-Untereinheit können außerdem durch Proteolyse gewonnen werden. Die therapeutischen Vorteile dieser Moleküle können durch Verwendung von funktionellen Derivaten verstärkt werden, die zusätzliche Aminosäurereste besitzen, die zur Verstärkung der Kopplung an den Träger oder zur Verstärkung der Aktivität hinzugefügt werden.

Die Moleküle nach der vorliegenden Erfindung werden als „im wesentlichen frei von natürlichen Kontaminanten“ bezeichnet, wenn Präparate, welche diese enthalten, im wesentlichen frei von Stoffen sind, mit denen diese Produkte normalerweise und natürlich vorkommen.

Bei der Behandlung eines Patienten mit den therapeutischen Molekülen der vorliegenden Erfindung wird die Dosierung des verabreichten Mittels stark in Abhängigkeit von solchen Faktoren variieren wie Alter, Gewicht, Körpergröße, Geschlecht, allgemeiner medizinischer Zustand, bisherige medizinische Behandlung usw. des Patienten. Im allgemeinen ist es wünschenswert, dem Rezipienten eine Dosierung der LFA-1-Alpha-Untereinheit (oder dessen funktionellen Derivats) zu verabreichen, die im Bereich von etwa 1 pg/kg bis zu 10 mg/kg (Körpergewicht des Patienten) liegt, obwohl auch niedrigere oder höhere Dosierungen verabreicht werden können.

Die Moleküle nach der vorliegenden Erfindung können den Patienten intravenös, intramuskulär, subkutan, enteral oder parenteral verabreicht werden. Die Verabreichung kann eine Dauerinfusion sein oder durch einzelne oder mehrfache Bolusse erfolgen.

Es ist vorgesehen, die entzündungshemmenden Mittel nach der Erfindung den rezipierenden Personen in einer ausreichenden Menge zur Unterdrückung der Entzündung zu verabreichen. Eine Menge wird als ausreichend zur Unterdrückung der Entzündung bezeichnet, wenn die Dosierung, Verabreichungsrouten usw. des Mittels ausreichend sind, um die Entzündung zu dämpfen oder zu verhindern. Die entzündungshemmenden Mittel der vorliegenden Erfindung können entweder vor Ausbruch der Entzündung (um so die erwartete Entzündung zu unterdrücken) oder nach Beginn der Entzündung verabreicht werden. Man bezeichnet eine Zusammensetzung als „pharmakologisch akzeptabel“, wenn ihre Verabreichung durch den rezipierenden Patienten toleriert werden kann. Ein solches Mittel wird in einer „therapeutisch wirksamen Menge“ verabreicht, wenn die verabreichte Menge physiologisch signifikant ist. Ein Mittel ist physiologisch signifikant, wenn sein Vorhandensein zu einer nachweisbaren Änderung in der Physiologie eines rezipierenden Patienten führt. Die Moleküle der vorliegenden Erfindung können nach den bekannten Methoden eingesetzt werden, um pharmazeutisch akzeptable Zusammensetzungen herzustellen, wobei diese Stoffe oder deren funktionelle Derivate in Mischung mit einem pharmazeutisch akzeptablen Trägervehikel kombiniert werden. Geeignete Vehikel und deren Formulierung, einschließlich der anderer menschlicher Proteine, z.B. Humanserumalbumin, werden beispielsweise in Remington's Pharmaceutical Sciences (16. Auflage), Osol, A., Hsg., Mack, Easton, PA (1980), beschrieben. Um eine pharmazeutisch wirksame Zusammensetzung herzustellen zu können, die für eine

wirksame Verabreichung geeignet ist, enthalten diese Zusammensetzungen eine therapeutisch wirksame Menge der LFA-1-Alpha-Untereinheit oder deren Fragmente oder funktionellen Derivate zusammen mit einer geeigneten Menge eines Trägervehikels.

Es können zusätzliche pharmazeutische Methoden angewendet werden, um die Dauer der Wirkung zu steuern, Präparate mit gesteuerter Freisetzung kann man erhalten durch die Verwendung von Polymeren, die mit der LFA-1-Alpha-Untereinheit oder deren Fragmenten oder funktionellen Derivaten einen Komplex bilden oder diese absorbieren. Die gesteuerte Abgabe kann erfolgen durch die Auswahl geeigneter Makromoleküle (beispielsweise Polyester, Polyaminosäuren, Polyvinyl, Pyrrolidon, Ethylenvinylazetat, Methylzellulose, Karboxymethylzellulose oder Protaminsulfat) und die Konzentration von Makromolekülen sowie durch die Methoden der Einbeziehung, um so die Freisetzung zu steuern. Eine andere mögliche Methode zur Steuerung der Dauer der Wirkung durch Präparate mit gesteuerter Freisetzung ist die Einbeziehung von Molekülen der LFA-1-Alpha-Untereinheit, deren Fragmenten oder deren funktionellen Derivaten in Teilchen eines polymeren Materials, wie Polyester, Polyaminosäuren, Hydrogele, Poly(Laktinsäure) oder Ethylenvinylazetatkopolymere. Als Alternative zur Einbeziehung dieser Mittel in polymere Teilchen ist es möglich, diese Moleküle in Mikrokapseln einzuschließen, die beispielsweise durch Koazervierungsmethoden oder durch Interfacialpolymerisation hergestellt werden, beispielsweise Hydroxymethylzellulose- oder Gelatinemikrokapseln und Poly(methylmethakrylat)mikrokapseln, oder in kolloidalen Drogenabgabesystemen, beispielsweise Liposomen, Albuminmikrokügelchen, Mikroemulsionen, Nanoteilchen und Nanokapseln in Makroemulsionen. Diese Techniken werden in Remington's Pharmaceutical Sciences (1980) beschrieben.

Nachdem die Erfindung allgemein beschrieben worden ist, soll sie nun durch Bezugnahme auf die folgenden Beispiele leichter verständlich gemacht werden, die dem Zwecke der Veranschaulichung dienen und die vorliegende Erfindung, wenn nichts anderes angegeben wird, in keiner Weise einschränken sollen.

Beispiel 1

Reinigung der LFA-1-Alpha-Untereinheit

LFA-1 wird auf den Oberflächen von SKW3-Leukozyten exprimiert. Das LFA-1-Alpha-Untereinheit-Molekül wurde aus SKW3-Zellen durch monoklonale Antikörper-Affinitätschromatographie nach der Methode von Miller, L.J., u. a. (J. Immunol. 137: 2891–2900 [1987]) gereinigt (diese Referenz wird hier einbezogen). Der monoklonale Antikörper, TS 1/22, der gegen die Alpha-Untereinheit von LFA-1 gerichtet ist, wurde gereinigt und (unter Verwendung von Zyanogenbromid) an CL-4B-Sephrose (Pharmacia) mit 2 mg MAB je ml Füllkörperschicht gekoppelt. SKW3-Zellen (42,2 g), die aus der MIT-Kulturkollektion bezogen wurden, wurden in 300 ml Lysepuffer aufgelöst (Kurzinger, K., u. a. J. Biol. Chem. 257: 12412 bis 12418 [1982]), und das Lysat wurde dann mit 16000× g für die Dauer von 2 Stunden rotiert. Anschließend wurde die obenaufschwimmende Schicht nacheinander durch eine Vorkolonne aus aktivierter und gelöschter CL-4B-Sephrose und durch eine TS 1/22-Sephrose-Kolonne geführt. Die TS 1/22-Kolonne wurde nacheinander gewaschen (Kurzinger, K., u. a., J. Biol. Chem. 257: 12412–12418 [1982]), und die LFA-1-Alpha-Untereinheit wurde mit 50 mM Triethylamin, 0,5 M NaCl, 0,1 % Triton X-100, 1 mM Jodazetamid, 10 Einheiten/ml Protein und 0,025 % Na₂S₂O₅, pH 11,5, eluiert und der pH-Wert sofort neutralisiert. Die die LFA-1-Alpha-Untereinheit enthaltenden Fraktionen wurden zusammengefaßt, lyophilisiert und in 5 Volumen Ethanol bei –20°C über Nacht ausgefällt. Gereinigtes Protein wurde reduziert und alkyliert (Law, S.K.A., u. a., EMBO J. 6: 915–919 [1987]) und einer präparativen SDS-Polyakrylamid-Gel-Elektrophorese unterzogen. Das Band, welches der LFA-1-Alpha-Untereinheit entspricht, wurde mit 1 M KCl sichtbar gemacht, herausgeschnitten und elektroeluiert (Folleggiaro, M.A., u. a., Clin. Immunol. Immunopath. 3: 324–333 [1975]). Die gereinigte Alpha-Untereinheit wurde lyophilisiert und in 4 Volumen Ethanol bei –20°C über Nacht ausgefällt. Das Pellet wurde wieder zur Suspension gebracht und mit 1 % Trypsin verdaut (Wong, W.W., u. a., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 7711–7715 [1985]). Die Tryptinfragmente wurden dann durch HPLC (Hochdruckflüssigkeitschromatographie) (Beckman) auf einer Umkehrphasen-Kolonne C4 (Vydac) isoliert. Die Peptide wurden auf einem Azetonitrilgradienten von 0 bis 60 % in 1 % Trifluoressigsäure eluiert. Mehrere Spitzen wurden isokratisch in einer Azetonitrilkonzentration rechromatographiert, die durch folgende Gleichung bestimmt wurde:

$$F = (0,9E) - 2$$

wobei F der Volumenprozensatz von Azetonitril unter isokratischen Bedingungen für ein Peptid ist, das während des linearen Gradienten bei E Prozent eluierte (Lathé, R., u. a., J. Molec. Biol. 183: 1–12 [1985]). Spitzen wurden in 1,5-ml-Polypropylenröhrchen aufgefangen und auf weniger als 50 µl konzentriert. Acht Spitzen wurden einer Mikrosequenzierung unterzogen. Die Folge eines Peptids, L 64, wurde dazu verwendet, ein einzelnes Oligonukleotid nach den Vorschlägen von Lathé, R., u. a. (J. Molec. Biol. 183: 1–12 [1985]) zu synthetisieren:

5'–GGGATGTTGTGGTCATGGATGGTGGGCTCAAT–3'

Zusammenfassend, LFA-1 wurde zunächst aus SKW3 isoliert, einem T-Lymphoma-Zellstamm, Lysat durch Monoklonalantikörper-Affinitätschromatographie unter Verwendung eines gegen die Alpha-Untereinheit gerichteten Antikörpers. SDS-PAGE-Fractionen wiesen die Alpha- und Beta-Untereinheiten auf. Die Alpha-Einheit wurde durch präparative SDS-PAGE weiter gereinigt, und die gereinigte Alpha-Untereinheit wurde mit Trypsin verdaut, und die Peptide wurden durch Umkehrphasen-HPLC isoliert. Die Peptidfolge von neun Spitzen wurde durch Mikrosequenzierung bestimmt (Abb. 1). Die Peptidfolge, die die niedrigste Kodonredundanz aufwies, wurde zum Spezifizieren einer einzelnen Oligonukleotidfolge verwendet, die die gebräuchlichsten menschlichen Kodone nutzte (Lathé, R., u. a., J. Molec. Biol. 183: 1–12 [1985]). Die Folgen der Tryptinpeptide der LFA-1-Alpha-Untereinheit werden in der Tabelle I gezeigt.

Tabelle I

Folgen von Tryptinpeptiden der LFA-1-Alpha-Untereinheit

Reste	Aminosäurefolge
95-107	X X D Q (N) T Y L S G L (E) Y L F
199-210	H M L L L T N T F G A I
254-260	Y I I G I G K
405-413	V L L F Q E X Q G
494-503	G E A I T A L T X I
541-554	I E G T Q V L S G I Q X F G
564-576	X (L) E (G) D (V/G) L A D V A V G A E
803-817	K V E M L K P H S E E I X V S (T)
929-946	<u>I (E/Q) P S I H N I P X L E A V X '.</u>

Klammern geben Zweideutigkeiten in der Folge an. Die unterstrichenen Reste wurden verwendet, um eine Oligonukleotidsonde zu erzeugen.

Beispiel 2

cDNA-Klonierung

Rekombinanten (5×10^5) von einer λ gt-10-Bibliothek, die nach cDNA-Inserts von mehr als 2 kb ausgewählt und von PMA-induzierten HL-60 Zellen produziert wurde (PMA-Phorbolmyristinsäure) (Corbi, A., u. a., *EMBO J.* 6: 4023-4028 [1987]), wurden mit einer Dichte von 50000 Rekombinanten je 150 mm Platte plattiert. Die Bibliothek wurde amplifiziert (Woo, S. L. C., *Met. Enzymol.* 69: 389-395 [1979]), und es wurden Nitrozellulosefilter nach den Richtlinien von Benton und Davis verarbeitet (Benton, W. D., u. a., *Science* 196: 180-182 [1977]). Die Filter wurden in $6 \times$ SSC (0,6 M NaCl, 0,06 M Natriumzitat), 0,05% Kaliumphosphat und Natriumpyrophosphat, 0,5% SDS, $6 \times$ Denhardt-Reagens und 100 μ g/ml Lachssperma-DNA bei 42°C über Nacht vorhybridisiert. Die einzelne Oligonukleotidsequenz (oben gezeigte Sequenz) wurde mit γ - ^{32} P-ATP unter Verwendung von Polynukleotidkinase markiert. Die Filter wurden über Nacht in einem Vorhybridisationspuffer hybridisiert und dann nacheinander in $6 \times$ SSC, 0,05% Natriumpyrophosphat für 15 min bei 50°C gewaschen. Filter wurden auf vorbelichteten XAR-5-Film zwischen 6 und 20 Stunden exponiert. Phage, die auf Duplikatfiltern Signale ergaben, wurden „plaque“-gereinigt, und ihre cDNA-Inserts wurden durch Elektrophorese auf Agarosegelen klassiert.

Die 32mer-Oligonukleotidsonde wurde zum Isolieren von zwanzig Klonen aus einer größenselektierten λ gt-10-cDNA-Bibliothek verwendet, die aus PMA-stimulierten Myeloidzellen konstruiert wurde (Corbi, A., u. a., *EMBO J.* 6: 4023-4028 [1987]). Es wurde bereits gezeigt, daß diese Zellen die LFA-1-Alpha-Untereinheit synthetisieren (Miller, L. J., u. a., *J. Immunol.* 139: 842-847 [1987]). Es wurde die Insert-Größe bestimmt, und der längste Klon, λ 5L5, wurde restriktionskartiert (Abb. 2). Dieser Klon enthielt die Nukleotidfolge, die der Oligonukleotidsonde entspricht (85% Identität zur Sonde der „besten Schätzung“). Die Nukleotidsonde codierte auch das Tryptinpeptid, das durch Mikrosequenzierung bestimmt wurde (16 von 16 Resten), welches die Oligonukleotid beinhaltete und über dieses hinausging. Dieser Klon codierte jedoch nicht das vollständige Protein, da nicht alle die Tryptinpeptidfolgen in offenen Leserahmen vorhanden waren. Das 5'-1,0 kb-EcoRI-Fragment von λ 5L5 wurde zum Rescreening von weiteren 5×10^5 Rekombinanten verwendet. Es wurden zusätzliche 14 Klone identifiziert, und der Klon λ 3R1 hatte in den überlappenden Bereichen eine identische Restriktionskarte und enthielt zusätzlich ein 1,0 kb-5'-Fragment. Die Nukleotidfolge dieses zusätzlichen Fragments wurde bestimmt (Abb. 2).

Beispiel 3

Restriktionskartierung und Nukleotidsequenzierung

Restriktionskarten von ausgewählten Klonen wurden durch doppelte und partielle Verdauungen bestimmt (Maniatis, T., u. a., in: *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* (Molekulares Klonieren. Ein Laborhandbuch), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY [1982]). Restriktionsfragmente wurden entweder in M13mp18 oder M13mp19 subkloniert (Messing, J., *Met. Enzymol.* 101: 20-78 [1983]) oder in pGEM-3Z, -4Z oder -7Z (Promega). Deletionen der Fragmente in pGEM werden unter Verwendung von Exonuklease III oder S1 vorgenommen (Henikoff, S. *Gene*, 28: 351-359 [1984]). Die Sequenzierung erfolgte nach der Dideoxyterminationsmethode (Sanger F., u. a., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467 [1977]). Die Codierungssequenz der 5'- und 3'-nichttranslatierten Bereiche wurden zu 100%, 83,1% bzw. 33,7% in beiden Orientierungen bestimmt.

Die überlappenden Klone von cDNA enthalten 5139 Nukleotide (Abb. 3). Vorhanden sind ein offenes Leseraster von 3510 Nukleotiden, ein 5'-nichttranslatierter Bereich von 94 Nukleotiden und ein 3'-nichttranslatierter Bereich von 1535 Nukleotiden, der eine Polyadenylierungsstelle 15 Nukleotide vor dem Poly(A⁺)-Schwanz enthält. Innerhalb des 3'-nichttranslatierten Bereiches gibt es eine typische Alu1-Wiederholung, die aus zwei tandemverwandten Sequenzen besteht, die jeweils durch ein A-reiches Segment beendet werden (Hardman, N., *Biochem. J.* 234: 1-11 [1986]). Die Alu-Sequenz ist 304 Nukleotide lang und ist zu 78,8% mit der normalen Sequenz der Alu-Familie identisch.

Beispiel 4

Southern- und Northern-Transfer

Der Southern-Transfer wurde nach der Beschreibung von Corbi, A., u. a. (*J. Exper. Med.* 167: 1597-1607 [1988]) durchgeführt. Auf einem 1,0%igen Formaldehydgel wurden 20 μ g je ml der Zellulargesamt-RNA, die entweder von SKW3-, U937-IB4- oder EJ-Zellen isoliert wurden, elektrophoretisiert und auf Nitrozellulose übertragen (in: *Current Protocols in Molecular Biology* (Laufende Protokolle zur Molekularbiologie), Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York). Die Nylonmembran (Zeta-Sonde [Biorad]) wurde vorhybridisiert und in $2 \times$ SSC, $1 \times$ Denhardt-Reagenzlösung, 0,1% SDS und 10 μ g/ml Hering-Sperma-DNA hybridisiert. Eine 1,8 kb-EcoRI-Sonde vom 5'-Ende des cDNA-Klons, λ 3R1, wurde durch Einzelstrangbruchtranslatierung markiert und als Sonde verwendet.

Die Northern-Transfer-Analyse zeigte eine Botschaft von 5,5 kb in SKW3-, U937- und IB4-Zellen, während in EJ-Zellen kein Signal entdeckt wurde. Die Zellverteilungen stimmen gut mit der Größe des cDNA-Klons und der Zelloberflächenexpression von LFA-1 überein. Die Southern-Transfer-Analyse unter Verwendung des 1,2 kb-5'-EcoRI-BamHI-Fragmentes von Klon λ 2L2 hybridisierte zu zwei Fragmenten von 10 und 8 kb (Corbi, A., u. a., *J. Exper. Med.* **167**: 1597 bis 1607 [1988]). Ein genomisches Klon, das aus einer Cosmid-Bibliothek isoliert wurde, besitzt zwei Fragmente von identischer Länge. Diese Fragmente sind aneinander angrenzend und demonstrieren, das LFA-1 ein Einzelkopie-Gen ist.

Beispiel 5

Rechneranalyse

Bei den Homologiesuchen und der Ausrichtung der Sequenzen wurden anfangs das Microgenie-DNA-Programm (Beckman), FASTP (Wilbur and Sigmund) auf den NBRF- und NEW-Datenbasen (National Biomedical Research Foundation, Washington, DC) und FASTP mit der SWISS-PROT-Datenbase (Bionet) eingesetzt. Diese Ausrichtungen wurden dann unter Verwendung von ALIGN (NBRF) (5585) und GENALIGN (Bionet) optimiert.

Die Hydrophobizität wurde unter Anwendung des Microgenie-DNA-Programms sowie von PER-PLOT (5792) (University of Wisconsin Genetics Computer Group) bestimmt. Die Hydrophobizitätsanalyse der Aminosäurefolge zeigte, daß die LFA-1-Alpha-Untereinheit ein typisches Transmembranprotein mit einer Hydrophobizitätssignalsequenz, einem extrazellulären Bereich, einem einzelnen hydrophoben Transmembranbereich und einem kurzen zytoplasmischen Schwanz ist. Der N-Terminalrest von menschlicher LFA-1 wurde durch Homologie zum N-Terminal von Mäuse-LFA-1 identifiziert (Abb. 5). Menschliche LFA-1 hat eine Identität von 55% mit Mäuse-LFA-1 über den ersten 20 Aminosäuren. Ein klassisches Signalpeptid mit einer Konsensussequenz (Ala-X-Ser/Pro) für die Schneidepeptidase geht der N-Terminalsequenz voraus. Es gibt drei vermutliche stromaufwärts gelegene Transkriptionsinitiationsstellen (ATG) im Raster. Bevorzugt wird im allgemeinen die Nutzung der ersten Initiationsstelle in der Nukleotidposition 89 (Kozak, M., *Nucl. Acid Res.* **12**: 857–872 [1984]), sie ergibt eine aus fünfundzwanzig Resten bestehende Signalsequenz mit mehreren polaren Gruppen in der Nähe der N-Terminalreste, wie das typisch bei Signalsequenzen festgestellt wird (von Heijne, G., *J. Molec. Biol.* **173**: 243–251 [1984]). Alle 117 Aminosäuren, die durch Mikrosequenzierung von Tryptinpeptiden bestimmt wurden, wurden im translatierten offenen Leseraster gefunden, was die Authentizität der cDNA-Klone bestätigt. Zusammengefasst, demonstrieren diese Ergebnisse, daß die LFA-1-Alpha-Untereinheit eine N-Terminal-29+-Aminosäuresignalsequenz, eine extrazelluläre Domäne von 1063 Resten, eine Transmembrandomäne von 29 Aminosäuren und einen zytoplasmischen C-Terminal-Schwanz von 53 Aminosäuren.

Sieben Wiederholungen von 49–63 Aminosäuren liegen innerhalb der extrazellulären Domäne. Der Grad der inneren Identität und statistischen Signifikanz zwischen diesen inneren Wiederholungen ist zwischen den drei letzten Wiederholung am größten, 24–33% bei $p < 10^{-2}$ bis $< 10^{-6}$. Der Mittelbereich dieser drei letztgenannten Wiederholungen weist Homologie mit mehreren divalenten Kationbindungsstellen auf (Abb. 4). Da frühere Untersuchungen gezeigt haben, daß Mg^{2+} durchgehend oder bei niedrigerer Konzentration in Verbindung mit Ca^{2+} für die funktionelle Integrität des Proteins notwendig ist (Rothlein, R., u. a., *J. Exper. Med.* **163**: 1132 bis 1149 [1986]), läßt die Homologie der drei Tandemwiederholungen mit divalenten Kationbindungsstellen vermuten, daß LFA-1 divalente Kationen bindet. Die Wiederholungen I–IV haben die divalente Konsensus-Kationbindungsstelle nicht, haben aber erhaltene Flankierungsbereiche. Diese strukturellen Ähnlichkeiten eröffnen die Möglichkeit, das sich diese Wiederholungen bei einem Duplikationsereignis ergeben haben. Das reife Protein hat $M_r = 126,193$, und zwölf N-verbundene Glykosylationsstellen (Asn-X-Thr/Ser) befinden sich in der extrazellulären Domäne. Vorangegangene Untersuchungen haben gezeigt, daß wenigstens fünf dieser Zellen glykosyliert werden und Oligosaccharide mit $M_r = 5000$ bis 10000 Dalton haben, was typisch für die komplexen, N-verbundenen Kohlehydrat ist (Dahms, N. M., u. a., *J. Immunol.* **134**: 3978–3986 [1985]). Folglich würde die Verwendung von 5 bis 10 dieser Glykosylationsstellen ein Molekulargewicht vorhersagen, das mit dem durch SDS-PAGE bestimmten Molekulargewicht übereinstimmt.

Die Bestimmung des N-Terminals von Mäuse-LFA-1 (Girma, J.-P., u. a., *Blood* **70**: 605–611 [1987]) und die Primärstruktur der gemeinsamen Beta-Untereinheit von LFA-1/Mac-1/p 150,95 haben die Vermutung nahegelegt, daß die LFA-1-Alpha-Untereinheit ein Glied der Integrin-Familie ist. Die LFA-1-Alpha-Untereinheit hat eine überraschende Homologie (35% Identität) zu den Alpha-Untereinheiten von p 150,95 und Mac-1 und im geringeren Umfang zu den Alpha-Untereinheiten der ECM-Rezeptoren (25% Identität). Andererseits sind FNR, VNR und Ib zu 40% identisch miteinander. Außerdem enthalten die Leukozytintegrine auch ein Insert von annähernd 200 Aminosäuren in der Nähe des N-Terminalbereichs des Proteins, das in den drei sequenzierten ECM-Rezeptoren nicht vorhanden ist (Abb. 5). Außerdem fehlt der Bereich, in dem bei VNR, FNR und gpIIb/IIIa eine Proteaseschneidestelle auftritt, sowohl bei LFA-1 als auch in den Alpha-Untereinheiten von p 150,95 und Mac-1 und korreliert mit dem Fehlen der proteolytischen Verarbeitung der Alpha-Untereinheiten der LFA-1-Familie. Insgesamt definierten diese strukturellen Merkmale zwei Unterfamilien der Alpha-Untereinheitsintegrine, die Leukozytintegrine und die ECM-Integrine. Alle Alpha-Untereinheiten der Integrin-Familie haben wie LFA-1 ähnliche Wiederholungen, welche vermutliche divalente Kationbindungsstellen enthalten (Corbi, A., u. a., *EMBO J.* **6**: 4023–4028 [1987]; Poncz, M., u. a., *J. Biol. Chem.* **262**: 8476–8482 [1987]; Suzuki, S., u. a., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 8614–8618 [1986]; Argaves, W. S., u. a., *J. Cell Biol.* **105**: 1183–1190 [1987]; Ruoslahti, E., u. a., *Science* **238**: 491–497 [1987]). Jedoch nur drei der Wiederholungen in LFA-1 und p 150 enthalten mutmaßliche Metallbindungsstellen, während in den ECM-Rezeptoren alle vier Wiederholungen Metallbindungsstellen enthalten. Die mutmaßlichen divalenten Kationbindungsstellen von LFA-1 und den anderen Integrinen sind den vorher beschriebenen divalenten Kationbindungsstellen der integralen Membranproteine verwandt, aber nicht mit diesen identisch. Es gibt verschiedene Typen von divalenten Kationbindungsstellen. Der erste Satz solcher Stellen hat eine alternierende D-X-D(N)-X-D(N)-Struktur. Diese Stellen findet man unter anderem in Troponin C, Parvalbumin (5256) und Galaktosebindungsprotein. Diese Stellen bilden eine EF-Schleifenstruktur und haben 6–7 Chelationsstellen. Die mutmaßlichen Bindungsstellen auf LFA-1 und den anderen Integrinen haben auch eine D-X-D(N)-X-D(N)-Primärstruktur, wobei zwischen den chelatierenden Resten eine Reihe von G-Resten erhalten ist. Der Rest in der Z-Position wird jedoch durch einen hydrophoben Rest ersetzt. Außerdem scheint die Alpha-Spirale vor und hinter der Calciumbindungsstelle bei den Integrinstellen zu fehlen (Corbi, A., u. a., *EMBO J.* **6**: 4023–4028 [1987]). Die Signifikanz dieser Änderung ist unbekannt, kann aber teilweise die Ursache für die Präferenz dieser Stellen für Mg^{2+} sein.

Eine Suche der NBRF- und Swiss-Protein-Datenbanken zeigte, daß dieser der LFA-1-Familie spezifische Bereich, der als „L“-Domäne bezeichnet wird, signifikante Homologie mit der A1-Domäne des menschlichen vWF, des menschlichen Komplementfaktors B und des Kückenkollagenmatrixproteins hat. Diese Ähnlichkeiten erstrecken sich über die gesamte Länge der L-Domäne. Da vWF drei A-Domänenwiederholungen (A1, A2, A3) (5790) hat, ist die Domäne im Komplementfaktor B einer ähnlichen Domäne in der Komplementkomponente 2 (C2) (5789) analog, und CMP hat 2 Wiederholungen (5778), wobei die LFA-1-L-Domäne unter Anwendung des ALIGN-Programms mit allen diesen Domänen verglichen wurde. Mit Ausnahme von C2 waren alle diese Anordnungen statistisch signifikant (Abb. 6).

Diese Ähnlichkeiten implizieren eine mögliche funktionelle Domäne für LFA-1. Zuerst bindet sich die A1-Domäne von vWF an Glykoprotein Ib und Heparin (5646), während die Domänen A1 und A3 beide an der Bindung an Collagen beteiligt sind. Zweitens wird die homologe Domäne im Faktor B auf der C-Terminalseite der Spaltungsstelle loziert, an der Faktor B zu Faktor Bb geschnitten wird, und auf der N-Terminalseite der Serinprotease (Mole, J. E., u. a., *J. Biol. Chem.* 259: 3407–3412 [1984]; Bently, D. R., *Biochem. J.* 239: 339 bis 345 [1986]). Diese Domäne befindet sich daher in dem Bereich, von dem eine Wechselwirkung mit dem Liganden, C3b, erwartet wird. Die Struktur des Collagenmatrixproteins ist teilweise bestimmt worden und hat zwei Wiederholungen, die durch eine dem Epidermalwachstumsfaktor gleiche Sequenz voneinander getrennt sind (Argaves, W. S., u. a., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 464–468 [1987]). CMP tritt sowohl mit Collagen (Argaves, W. S., u. a., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 464–468 [1987]) als auch mit Cartilagproteoglykan in Wechselwirkung (Abb. 7) (Paulsoon, M., u. a., *Collagen Rel. Res.* 4: 219–229 [1984]).

LFA-1, Mac-1 und p 150,95 wurden kürzlich zu Chromosom 16p 11 lokalisiert (Corbi, A., u. a., *J. Exper. Med.* 167: 1597–1607 [1988]). Die strukturelle Ähnlichkeit und die Nähe der Gene, welche die Leukozyt-Integrin-Alpha-Untereinheiten codieren, lassen vermuten, daß sich ein primordiales Gen duplizierte und zur Herausbildung von wenigstens zwei Verzweigungen der Integrin-Alpha-Untereinheiten führten, den Leukozytintegrinen und den ECM-Integrinen. In das primordiale Gen der Leukozytintegrin-Alpha-Untereinheit wurde eine Domäne von 180 Aminosäuren eingefügt, und dann duplizierte sich das Gen und führte zur Herausbildung von LFA-1, Mac-1 und p 150,95. Die Ähnlichkeit dieser Domänen mit der L-Domäne der LFA-1-Familie läßt vermuten, daß diese L-Domäne eine funktionelle Domäne ist. Außerdem implizieren diese Homologien, daß eine primordiale Domäne in mehrere Proteine eingefügt wurde und dann unterschiedliche Erkennungsfaktoren in der Hämostase, Komplementaktivierung und der Immunreaktion entwickelte.

Diese strukturellen Unterschiede zwischen den beiden Gruppen von Alpha-Untereinheitsintegrinen stehen in Korrelation mit dem Unterschied in der Erkennungsstelle der Funktionsdomänen, da RGD-enthaltende Peptide die Bindung von FNR und gp11b/IIIa an die entsprechenden Liganden blockieren (Ruoslahti, E., u. a., *Science* 238: 491–497 [1987]), während ein RGDS-Peptid die Wechselwirkung von LFA-1 mit ICAM-1 nicht unterbindet. Im Gegensatz zu den Liganden der ECM-Integrine hat ICAM-1 selbst keine RGD-Peptidsequenz und ist ein Glied der Immunoglobulinen-Superfamilie. Sowohl aus den strukturellen wie auch aus den funktionellen Daten läßt sich die Vermutung ableiten, daß die Integrin-Superfamilie in zwei Unterfamilien von Alpha-Untereinheiten unterteilt werden kann. Diese β_2 -zugeordneten strukturellen und funktionellen Eigenschaften der Alpha-Untereinheiten müssen jedoch nicht einzigartig für die Unterfamilie sein, da auch verschiedene andere Integrin-Alpha-Untereinheiten strukturelle Eigenschaften haben können, die denen der LFA-1-Familie ähnlich sind, wie beispielsweise das Fehlen einer proteolytischen Schneidestelle (Charo, I. F., u. a., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 8351–8355 [1986]).

Die Aufklärung der Struktur der LFA-1-Alpha-Untereinheit zeigte neuartige Entwicklungsbeziehungen zwischen den Integrin-Alpha-Untereinheiten auf und ließ eine mögliche funktionelle Domäne vermuten, und sie zeigte, daß die LFA-1-Alpha-Untereinheit zur Integrin-Superfamilie gehört, aber eine zusätzliche Domäne enthält. Diese L-Domäne und homologe Domänen stellen eine Protein-„Domänen“-Familie dar, die von funktioneller Bedeutung ist. Da die Erkennungsstelle von LFA-1 nicht RGD ist, kann die L-Domäne von funktioneller Signifikanz in der LFA-1-Alpha-Untereinheit sowie den anderen Leukozyt-Integrinen, Mac-1 und p 150,95 sein. Da LFA-1 jedoch an einer großen Zahl von Leukozytfunktionen beteiligt ist und mehr als einen Liganden haben kann (Rothlein, R., u. a., *J. Immunol.* 137: 1270–1274 [1986]), ist es möglich, daß in der LFA-1-Alpha-Untereinheit mehr als eine funktionelle Domäne existieren. Interessant ist es auch, die Wechselwirkungen zu analysieren, die der zytoplasmische Schwanz mit dem Zytoskelett eingeht, und welche Rolle diese Wechselwirkung bei der Signalisierung spielt. Die Verfügbarkeit von cDNA-Klonen für die Alpha- und Beta-Untereinheiten erlauben es, diese Struktur-Funktionsbeziehungen zu untersuchen. Die Erfindung wurde in Verbindung mit speziellen Ausführungsbeispielen beschrieben, es ist jedoch selbstverständlich, daß weitere Modifikationen möglich sind, und diese Patentanmeldung solle alle Variationen, Anwendungen oder Anpassungen der Erfindung einschließen, welche im allgemeinen den Prinzipien der Erfindung folgen, einschließlich der Abweichungen von der vorliegenden Offenlegungsschrift, die zur bekannten oder üblichen Praxis auf dem Fachgebiet gehören, auf das sich die Erfindung bezieht und wie sie auf die wesentlichen Merkmale angewendet werden können, die der Rahmen der angefügten Patentansprüche einschließt.

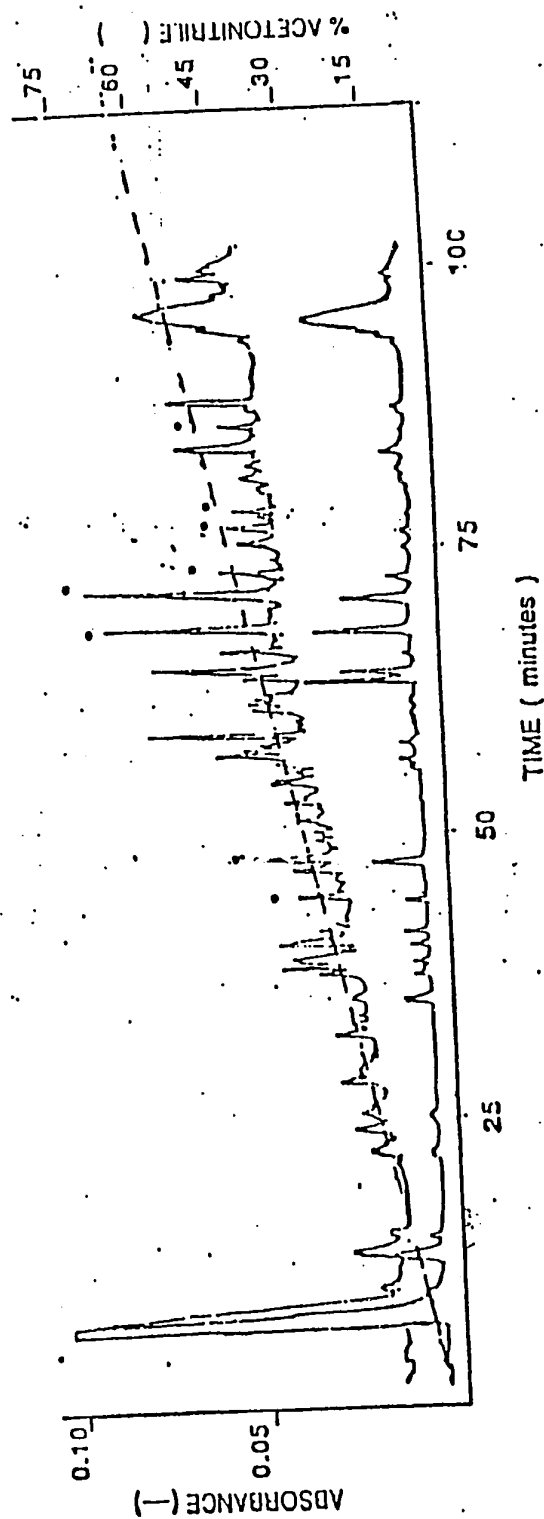


Figure 1

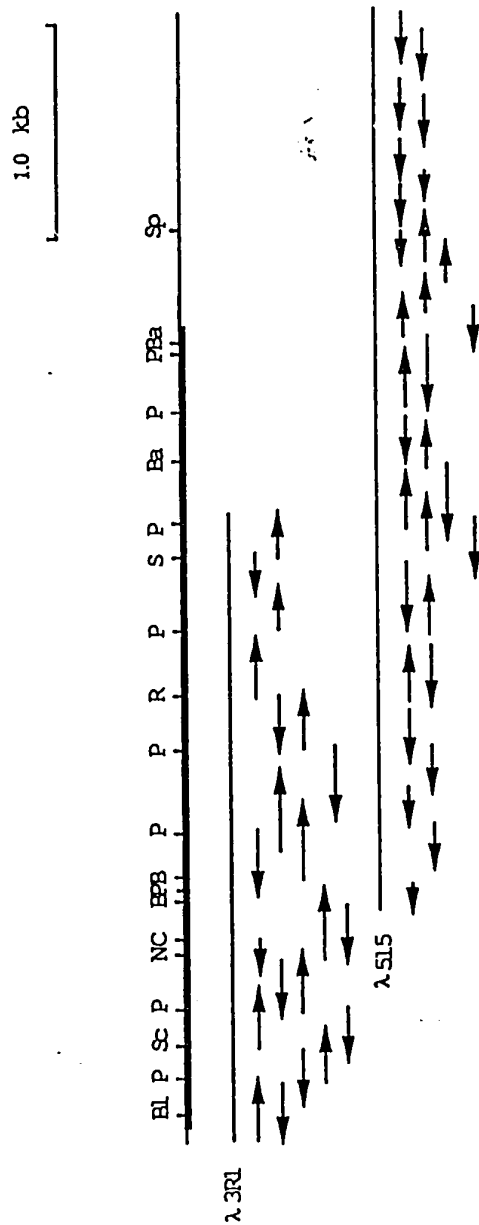


Figure 2

Flanking consensus sequence (LFA-1): YFGYS^L-----LAVGAP^V
 Flanking consensus sequence (Integrins): SYFG-SV-----LVVGAP

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

divalent cation binding site consensus D-DGDG-I-D--E
 divalent cation coordination sites +X +Y +Z -Y -X -Z
 divalent cation binding sites
 Parvalbumin CD 51 DEDKSGFIEEDE
 EF 90 DSDGDGKIGVDE
 Troponin C 27 DADGGGDISVKE
 63 DEDGSGTIDFEE
 103 DRNADGYIDPEE
 139 DKNNDGRIIDFDE
 Galactose Binding 134 DLNKDGGQIQ-IE*
 Protein

Figure 4

Flanking consensus sequence (LFA-1): Y P G Y S _L V ----- L A V G A P
 Flanking consensus sequence (Integrins): S Y F G - S V ----- L V V G A P

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

divalent cation binding site consensus D - D G D_N G - I D - - E

divalent cation coordination sites +X +Y +Z -Y -X -Z

divalent cation binding sites

Parvalbumin	CD	51	DEDKSGFIEEDE
	EF	90	DSGDGKIGVDE
Troponin C		27	DADGGDISVKE
		63	DEDSGTIDFEE
		103	DRNADGYIDPEE
		139	DKNNDGRIDFDE
Galactose Binding Protein		134	DLNKDGGQIQ-IE*

Figure 4


```

LFA1 110 VLVFLDGGSSSTQFDETKILCFHKDVT--KSLGNTSYQFAVQFSSSYKTEFFDSYV
MAC1 113 SDIAFLDGGSSSTIPHCFRRMKEEFSTVMEQLKMSKT--DSELQDSEEFRIHFEKEFQ
P150 131 QDLVFLDGGSSSTSSRMATHMNFVRAMLSQFQPSN--QPSLMQFSNKFQTHFEKEFR
VWFA1 513 LDLVFLDGGSSSTSEAEFEVLKAFVVEYTERLRI-SQKWVR--NAVVEYHDGSIATIGLK
VWFA2 734 LDVFLDGGSSSTKIGEALENRSKEFFELQIQRMHV-GODSIH--VTVLQYSYHVTVEYPPS
VWFA3 927 LDVFLDGGSSSTPASFEDEMKEFEATISKANIGPRLT--VSVLQYGSITTIDVPWN
FACTOR B 244 HNYLVLDGGSSSTIGASNETGAKKCLVNLIEKVASYGVKPRYGLVYATYFPIHWKVSEAD
CMP2 195 LDLVFLDGGSSSVREEMFELVKKETINQ-IVESLEV--SEKQDQVGLVQYSSSV-RQEFPL
CMP1 1 -----VGVINYASAV-KNEFSL

LFA1 KMSPPDALLHCKHQLL-----TITFGAT-NVYATLVFREELTARFDATKVL-----
MAC1 NNPNPRLKPKITQLGR-----TITATGHT-NVVELENITNGARKNAKNTL-----
P150 RTSNPLSLIASCHQLQG-----TITATGHT-NVYATLVFREELTARFDATKVL-----
VWFA1 DPEPSELARRIASQVKYAG-----SQVQSTSEVLKYTLFQIFSILLRFEASRIA-----
VWFA2 EAQSKGDIQRRVREIRYQGGNR--TITGLL--PCLSDHSELVSQDRECAPNLV-----
VWFA3 VVPEKAHLISLDVQREGGSPQIGDALGFAY-RVLTSE-----GARRFASGAV-----
FACTOR B SS-NACNVISQLNEINYEDHKLKSGTNTKKALQAVYSHHSWPDVFFEGWNRIRH-----
CMP2 GQFKNNKDISAA-VKKHAYMEG-----TITGAL-KLLVDSSSTIANGARYGVPRYG-----
CMP1 ETHQTKES-LLQAVARIEPLSTG--TITGLL--QFAISRAESDTEGARLSPNKKVAI--

LFA1 IITDGG-ATDS-ENIDP--KKL--TIRHILGIGRHYQTKESQET-LHKFASKPASEFCK
MAC1 VITDGEKFGDPLGYEDPIEADREGILRYVIGGQDATERSENRRQE-LNTIASKPFRDHVF
P150 VITDGRKEGDSLDYKDVIPMAAAGILRYVIGGGLAFENRMSWKE-LNDIASKPSCNHF
VWFA1 LHASQEPQRNFRNFVRYVQGLKKKVVITPVGIGPKNLQIR--LIEKQA-PENKAFV
VWFA2 HVTGNFASDEIKRL-PGDIQ-----VVPVIGGSPKANVQ-----LERIGW-PNAP
VWFA3 LVTLV-SVDSVDAADNARS-----NRVTVPPIGIGORYDAAQ-----LRILG-PAGDSNV
FACTOR B LMTDGLHNMGGDPITVIDE-----LRLLLIGRDKRKNPR--EDYLDVYVFGVGP-LTN
CMP2 VFITDGRSQDYIT--DAKKANLLGFRHFAVVGNAV-----EDELREIASEPVAERTF
CMP1 VVITDGRFQDGVQ-VSARQAQTEIF--ATGVGRVD-----HHTLRQIASEPLDDHFD

LFA1 IIDT-FKKALFFELQKRIHVIETGSKQDLTSFNMELSSS 327
MAC1 QVNN-FEALNTIQNQLREKIFAILTQTGSSSTSEFEFSSQE 337
P150 KVED-FDALKKIQNQLREKIFAIETGTTSSSTSEFEFMAQE 335
VWFA1 LSS-VDE-LEQQRDEIVSYLCLDAPLAPPPPTLFPDQVTVGP 717
VWFA2 ITQDEHTLPREAPLVLQRC-CSGEGLIPIMLSPAPD 922
VWFA3 VRLQRTEDLPTHVTLGN-----SFLHNTSGFVRI 1115
FACTOR B QVNINALASE-KDNEHVFK-VKDMENLEQVFTCHIDEQQL 450
CMP2 YTA-DEFTISNIGKNCMAICVDEDPCECKSIVKFQTKV 393
CMP1 YVESYSYXELTHKGQDEATCVSDLCATGDHDCQIC 172

```

Figure 6

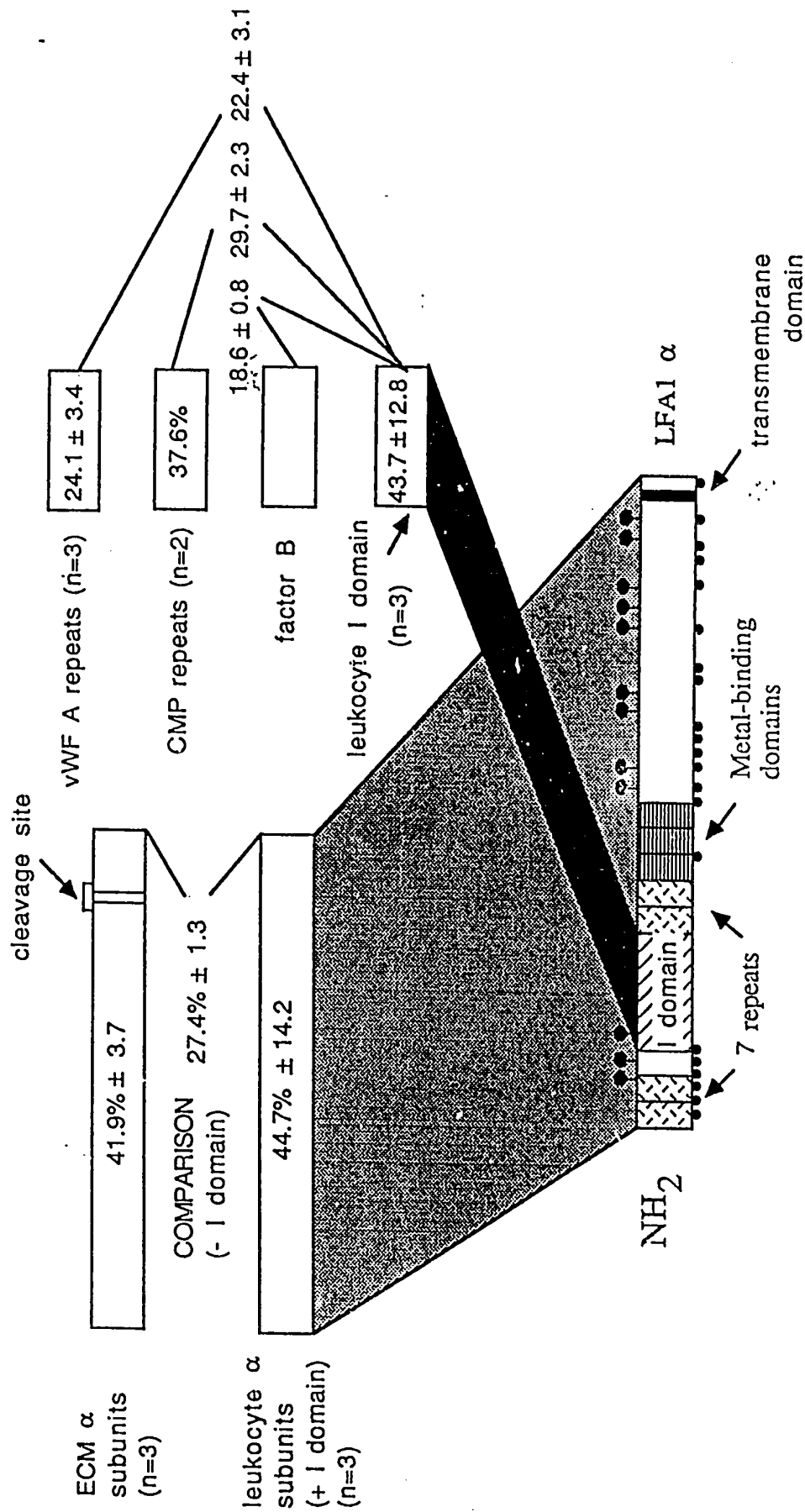


Figure 7