



제8도는 2가 양이온 부재하에 ICAM-1에 대한 HRV14의 결합을 나타낸다.

제9도는 ICAM-1 D1 및 D2의 3차 구조 모델이다.

제10도는 sICAM-1이 주요 그룹 리노바이러스에 의해 유도된 세포병리 효과를 억제함을 나타낸다.

제11도는 정제된 sICAM-1이 리노바이러스 주요 그룹 수용체를 사용한 피코나바이러스에 의해 유도된 CPE를 특이적으로 억제함을 나타낸다.

제12도는 정제된 sICAM-1이 세포에 대한 리노바이러스 비리온의 결합을 억제함을 나타낸다.

#### [발명의 상세한 설명]

본 발명은 세포간 점착 분자(Intercellular adhesion molecule) ICAM-1의 작용성 도메인(functional domain) 및 이의 단편에 관한 것이다. 이러한 작용성 도메인 및 단편은 바이러스, 특히 리노바이러스 질환의 치료에 사용될 수 있다.

세포간 점착 분자 ICAM-1은 문헌[참조: Rothlein, R. et al., J. Immunol. 137: 1270-1274(1986), 본 명세서에 참조문헌으로 인용됨]의 공정에 따라 최초로 확인되었으며, 부분적으로 특성분석되었다. ICAM-1, 이의 제조, 정제 및 특징이 문헌[참조: 미합중국 특허원 제07/045,963호(1987년 5월 4일 출원), 제07/115,798호(1987년 11월 2일 출원), 제07/155,943호(1988년 2월 16일 출원), 제07/189,815호(1988년 5월 3일 출원) 및 제07/250,446호(1988년 9월 28일 출원), 이들 특허원은 모두 본 명세서에 참조문헌으로 인용됨]에 기술되어 있다.

ICAM-1은 초기에는 내피 세포와 백혈구 사이의 세포 점착 과정에 관여하는 것으로 생각되었다. 세포 점착은 백혈구가 순환계로부터 염증 진행 부위에 이동하여 세균 또는 바이러스와 같은 외인성 침입물에 대해 숙주를 적절히 방어하도록 내피 세포와 같은 세포 기질에 부착하는 과정이다. 방어 시스템에 대한 조사가 문헌 [참조: Eisen, H.W., In: Microbiology, 3rd Ed., Harper Row, Philadelphia, PA(1980), pp. 290-295 and 381-418]에 기재되어 있다.

점착 과정에 관여하는 내피 세포 표면상의 분자중 하나가 ICAM-1이다. 이 분자는 백혈구 세포 표면에 존재하는 당단백질의 CD-18계 분자에 결합하여 점착을 중재하는 것으로 밝혀졌다[참조: Sanchez-Madrid, F. et al., J. Exper., Med. 158:1785-1803(1983); Keizer, G.D. et al., Eur. J. Immunol. 15:1142-1147(1985)]. 이 당단백질 부류는 하나의  $\alpha$ 쇄와 하나의  $\beta$ 쇄를 갖는 이종이량체로 구성된다. 각 항원의  $\alpha$ 쇄는 서로 다르지만,  $\beta$ 쇄는 고도로 보존되는 것으로 밝혀졌다[참조: Sanchez-Madrid, F. et al., J. Exper. Med. 158:1785-1803(1983)]. 당단백질계의  $\beta$ 쇄(때때로 CD18로 언급됨)는 분자량이 95kd인 것으로 밝혀졌으며,  $\alpha$ 쇄는 분자량이 150kd 내지 180kd로 다양한 것으로 밝혀졌다[참조: Springer, T., Fed. Proc. 44: 2660-2663 (1985)]. 막 단백질의  $\alpha$  아단위는  $\beta$  아단위가 갖는 광범위한 상동성을 갖지 못하나, 당단백질의  $\alpha$  아단위의 면밀한 분석결과 이들간에는 실질적인 유사성이 있는 것으로 나타났다. CD-18계에는 3가지의 주요 구성원이 있다: p150,95, MAC-1 및 LFA-1. MAC-1은 대식세포, 과립구 및 거대입자 임파구에서 발견되는 이종이량체이다. LFA-1은 대부분의 임파구상에서 발견되는 이종이량체이다[참조: Springer, T.A. et al., Immunol. Rev. 68: 111-135 (1982)]. p150,95는 MAC-1과 유사한 조직 분포를 가지며, 세포 점착에 중요한 역할을 한다[참조: Keizer, G. et al., Eur. J. Immunol. 15:1142-1147(1985)]. LFA-1 관련된 당단백질의  $\alpha$  아단위와  $\beta$  아단위 사이의 유사성에 대한 조사가 문헌[참조: Sanchez-Madrid, F. et al., J. Exper. Med. 158:586-602 (1983); J. Exper. Med. 158: 1785-1803(1983)]에 기술되어 있다.

아브라함(Abraham) 등[참조: J. Virol. 51:340-345(1984)]은 무작위로 선택된 사람 리노바이러스(HRV) 혈청형의 대부분이 동일한 세포 수용체에 결합할 수 있다는 것을 밝혔다. 그후, 내피 세포의 표면에 대한 HRV의 주요 혈청형의 부착을 차단시킬 수 있는 모노클로날 항체가 개발되었다[참조: Colonna et al., J. Cell. Biochem. Suppl. 10 (part D): 266 (1986); Colonna et al., J. Virol. 57:7-12 (1986); Colonna et al., 유럽 특허원 공보 제169,146호]. 이러한 항체에 의해 인지되는 내피 세포 수용체 단백질이 분리되었으며, 90kd 단백질인 것으로 밝혀졌다[참조: Tomassini et al., J. Virol. 58:290-295(1986)].

본 발명은 항-바이러스 치료시 세포간 점착 분자-1(ICAM-1)의 작용성 유도체의 용도에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 완전한 ICAM-1 분자의 단편을 함유하는 ICAM-1의 작용성 유도체에 관한 것이다.

상세히 설명하면, 본 발명은 바이러스 감염된 개체에게 바이러스 감염증을 억제하기 위해 충분히 양의 ICAM-1의 단편 또는 ICAM-1의 작용성 유도체의 단편을 투여함을 특징으로 하여, 상기 개체의 바이러스 감염증을 치료하는 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은

(a) 바이러스를 함유하는 것으로 추정되는 생물학적 샘플을 검정 가능하게 표지된 ICAM-1 작용성 유도체와 함께 항온처리시킨 후,

(b) 검정 가능하게 표지된 ICAM-1 작용성 유도체가 바이러스에 결합되었는지를 측정함을 특징으로 하여, 바이러스 감염 여부를 진단하는 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 ICAM-1의 작용성 유도체에 결합된 바이러스를 함유하는 백신 조성물을 수령체에게 투여함을 특징으로 하여, 바이러스 감염을 예방하는 방법을 제공한다.

제1도는 ICAM-1 cDNA의 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열을 나타낸다. 첫번째 ATG는 58번 위치에 있다. ICAM-1 트립신 펩타이드에 상응하는 해독된 서열은 밑줄표하였다. 소수성의 추정된 시그널 펩타이드 및 트랜스막 서열은 굵게 밑줄표하였다. N-결합된 글리코실화 부위는 박스로 나타내었다. 2976번 위치에 있는 폴리아데닐화 시그널 AATAAA는 굵게 밑줄표하였다. 이 서열은 HL-60 cDNA 클론에 대한 것이다. 내피 세포 cDNA는 이의 서열 길이의 대부분에 걸쳐 서열분석되었고, 단지 사소한 차이를 나타낸다.

제2도는 ICAM-1 상동성 도메인 및 면역글로불린 슈퍼유전자계에 대한 관계를 나타낸다. (A) 5개의 상동성 도메인(D1 내지 5)의 배열. 배열된 2개 이상의 동일한 잔기는 박스로 나타내었다. NCAM 도메인에서 2회 이상 보존된 잔기, 및 세트 C2 및 C1 도메인에서 보존된 잔기는 ICAM-1 내부 반복체와 함께 배열되었다. ICAM-1 도메인에서 예측된  $\beta$ 쇄의 위치는 배열위에 막대기 및 소문자로 표시하였으며, 면역글로불린 C 도메인에서  $\beta$ 쇄의 공지된 위치는 배열 아래에 막대기 및 대문자로 표시하였다. ICAM-1 도메인내의 추정된 디설파이드 브릿지의 위치는 S-S로 나타내었다. (B-D) ICAM-1 도메인과 상동성인 단백질 도메인의 배열; 단백질들은 FASTP 프로그램을 이용하여 NBRF 데이터베이스를 조사함으로써 처음 배열되었다. 단백질 서열은 MAG, NCAM, T 세포 수용체  $\alpha$  아단위 V 도메인, IgM  $\mu$ 쇄 및  $\alpha$ -1-B-당단백질이다.

제3도는 ICAM 아미노-말단 도메인의 배열을 나타낸다.

제4도는 도메인 결실 위치를 갖는 ICAM-1의 도식이다.

제5도는 COS 세포에서 ICAM-1 결실 돌연변이체의 발현을 나타낸다. COS 세포는 RR1/1으로 간접 면역형광법에 따라 유동식 세포형광계에 의해 분석되었다.

제6도는 COS 세포에서 ICAM-1 결실 돌연변이체의 발현을 나타낸다. COS 세포는 MAbs RR1/1(■), R6.5(□), LB-2(▨) 또는 CL203(▧)으로 간접 면역형광법에 따라 유동식 세포형광계에 의해 분석되었다. 특히 형광 강도는 제외된 모크(mock) 형질감염된 세포에 대한 백그라운드 결합으로 측정한다.

제7도는 LFA-1 및 HRV14에 대한 ICAM-1 결실 돌연변이체의 결합을 나타낸다. ICAM-1 결실 돌연변이체를 발현하는 COS 세포를 플라스틱 결합된 LFA-1에 대한 점착 및 35S met-표지된 HRV14의 결합에 대해 시험하였다. 다수의 실험(2 내지 4)에 대한 표준오차를 나타내었다.

제8도는 2가 양이온 부재하에 ICAM-1에 대한 HRV14의 결합을 나타낸다. 플라스틱 결합된 ICAM-1의 농도 증가에 대한 35SHRV14의 결합을 10mM  $Mg^{++}$ 를 갖는 HRV-완충액(○) 또는  $Mg^{++}$ 를 갖지 않고 5mM EDTA를 갖는 HRV-완충액(△)중에서 수행하였다. SKW3 결합을 0.5mM  $Mg^{++}$ 를 갖는 HRV 완충액(●) 또는 5mM EDTA를 갖는 HRV 완충액(▲) 중에서 수행하였다.

제9도는 ICAM-1 D1 및 D2의 3차 구조 모델을 나타낸다: LFA-1 및 HRV 결합부위의 표시. Ig 불변 도메인의 기본적인 3차 구조[참조: Wright, S.D., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:7734-7738 (1988)]를 변형시켜 ICAM-1 D1 및 D2의 예측된 b쇄(⇒) 및 b턴(turn)을 적용하였다(참조: Staunton, D.E., et al., Nature 339: 61-64(1989a)). LFA-1 또는 HRV14 결합에 관여하는 잔기를 나타내었다. LFA-1/HRV14 결합(X-배 감소)에 대한 상응하는 돌연변이체의 효과(외곽 인쇄)를 각각 나타내었다. D2 N-결합된 올리고당류의 위치(△)를 나타내었다.

제10도는 sICAM-1이 주요 그룹 리노바이러스에 의해 유도된 세포병리 효과를 억제함을 나타낸다.

제11도는 정제된 sICAM-1이 리노바이러스 주요 그룹 수용체를 사용한 피코나바이러스에 의해 유도된 CPE를 특이적으로 억제함을 나타낸다.

제12도는 정제된 sICAM-1이 세포에 대한 리노바이러스 비리온의 결합을 억제함을 나타낸다.

#### [ICAM-1의 특징]

ICAM-1은, 섬유아세포상에서는 분자량 97kd, 골수성 단구 세포주 U937상에서는 분자량 114kd 및 B 임파구종 세포 JY상에서는 분자량 90kd로, 상이한 세포 유형에서 분자량 이질성을 나타낸다. ICAM-1 생합성에는 약 73kd의 세포내 전구체를 수반하는 것으로 밝혀졌다. 투니카마이신 처리(글리코실화의 억제)로부터 발생하는 비-N-글리코실화된 형태는 55kd의 분자량을 갖는다. ICAM-1은 CD54로 명명되었다.

포볼(phorbol) 에스테르 자극된 U937 세포 또는 섬유아세포로부터 분리된 ICAM-1은 화학적 탈글리코실화 후 60kd의 분자량을 갖는 동일한 주요 생성물을 생성한다. ICAM-1 모노클로날 항체는 LFA-1 결핍 세포주에 대한 식물성 혈구응집소 아세포의 점착을 방해한다. ICAM-1을 결합할 수 있는 모노클로날 항체로(임파구가 아닌) 섬유아세포를 예비처리하면 임파구-섬유아세포 점착이 억제된다. 또한, LFA-1에 대한 항체로(섬유아세포가 아닌) 임파구를 예비처리하면 임파구-섬유아세포 점착이 억제되는 것으로 밝혀졌다.

따라서, ICAM-1은 백혈구상에서 CD18 복합체의 결합 리간드이다. ICAM-1은 임파구가 생체내에서 염증 병변으로 침투되는 것과 일치하게 염증 매개체(예: IL-1,  $\gamma$ -인터페론 및 종양 괴사 인자)에 의해 시험관 내에서 섬유아세포 및 내피 세포상에서 유도 가능하다[참조: Dustin, M.L., et. al., J. Immunol 137:245-254,(1986); Prober, J.S., et al., J. Immunol 137: 1893-1896, (1986)]. 또한, ICAM-1은 비조혈 세포(예: 맥관 내피 세포, 흉선 상피 세포, 다른 상피 세포 및 섬유아세포) 및 조혈 세포(예: 조직 대식구, 유사분열물질-자극된 T 임파구 아세포 및 편도선, 림프절 및 피어스 반점(Peyer's patches)내의 배 중심 B-세포 및 수지상 세포상)에서 발현된다[참조: Dustin, M.L., et. al., J. Immunol 137:245-254,(1986)].

ICAM-1은 양성 염증 병변(예: 알레르기성 습진, 편평 태선, 피진, 담마진 및 수포 질환)의 케라티노사이트(keratinocyte)상에서 발현된다. 또한, 알레르기 환자의 피부상에 합텐(hapten)을 적용시켜 발생한 알레르기 피부 반응도 케라티노사이트상에서 높은 ICAM-1 발현을 나타내었다. 다른 한편, 피부상의 독성 반점은 케라티노사이트상에서 ICAM-1 발현을 나타내지 않았다.

ICAM-1은 다양한 피부가 장애를 갖는 피부 병변의 생검으로부터의 케라티노사이트상에서 존재하고, ICAM-1 발현은 알레르기성 반점 시험으로부터의 병변상에서 유도되며, 독성 반점 시험 병변으로부터의 케라티노사이트는 ICAM-1을 발현하지 못한다.

ICAM-1의 소수성 분석[참조: kyte, J., et al., J. Molec. Biol., 157:105-132 (1982)]은 27개 잔기 시그널 서열의 존재를 제시한다. +1 글루타민의 지정은 3개의 상이한 ICAM-1 단백질 제제상에서 N-말단 서열을 수득할 수 없는 것과 일치한다; 글루타민은 파이로글루탐산으로 환형화되어 차단된 N-말단을 생성할 수 있다. 1부터 453까지의 해독된 서열은 주로 친수성이며, 연속해서 24개 잔기의 소수성의 추정된

트랜스막 도메인이 뒤따른다. 트랜스막 도메인은 27개 잔기의 추정된 세포질 도메인내에 함유된 수개의 하전된 잔기가 바로 뒤따른다.

성숙된 폴리펩타이드 색의 예측된 크기는 55,219 달톤으로 탈글리코실화된 ICAM-1에 대한 55,000 달톤의 관찰된 크기와 매우 일치한다[참조: Dustin, M.L., et al., J. Immunol. 137: 245-254 (1986)]. 8개의 N-결합된 글리코실화 부위가 예측된다. 이들 부위중 2개의 트립신 펩타이드 서열내의 아스파라긴의 부재는 글리코실화 및 세포의 배향을 확실시한다. 고급 만로스 N-결합된 탄수화물당 2,500 달톤을 추정하면, ICAM-1 전구체에 대해 75,000 달톤의 크기가 예측되며, 이는 73,000 달톤의 관찰된 크기와 비교된다[참조: Dustin, M.L., et al., J. Immunol. 137: 245-254 (1986)]. 고급 만로스가 복합체 탄수화물로 전환된 후, 성숙된 ICAM-1 당단백질은 세포 유형에 따라 76 내지 114kd이다[참조: Dustin, M.L., et al., J. Immunol. 137:245-254 (1986)]. 따라서, ICAM-1은 과도하게 글리코실화된 전형적인 인테그랄(integral) 막 단백질이다.

따라서, ICAM-1은 임파구가 부착할 수 있는 세포 기질로서, 임파구는 염증부위로 이동하고/하거나 이러한 염증을 유도하는 다양한 효과제 작용을 가질 수 있다. 이러한 작용은 항체의 생성, 바이러스 감염된 표적 세포의 용해 등을 포함한다.

#### [ICAM-1의 항-바이러스 작용성 유도체]

본 발명의 한가지 양태는 ICAM-1의 특정한 바이러스의 세포 수용체로서, 바이러스가 사람 세포에 점착하고 감염시키는데 필요하다는 발견에 관한 것이다[참조: Greve, J.M. et al., Cell 56:839-847 (1989); Staunton, D.E. et al., Cell 56:849-853 (1989), 두 문헌이 모두 본 명세서에 참조문헌으로 인용됨]. 특히, 리노바이러스, 및 특히 주요 혈청형의 리노바이러스는 세포 표면상에 존재하는 ICAM-1 분자에 결합하는 능력을 통하여 그들의 감염을 매개할 수 있음이 밝혀졌다.

본 발명은 바이러스 감염을 치료하기 위한 ICAM-1의 작용성 유도체의 용도에 관한 것이다. 이러한 유도체는 바이러스 부착에 대해 내피 세포의 ICAM-1과 경쟁할 수 있으므로, 수령체에게 작용성 유도체를 투여하면 바이러스가 흡착되어 감염된 개체의 세포를 부착 및 감염시키는 비루스의 비율이 감소된다.

본 명세서에 사용된, ICAM-1의 작용성 유도체는 바이러스에 의해 인지되고 바이러스와 화합(즉, 결합, 복합체 형성 등)할 수 있는 능력을 갖는 화합물이다. 이러한 생물학적 작용 이외에, ICAM-1의 작용성 유도체는 ICAM-1의 단편, 변이체, 동족체, 화학적 유도체, 또는 펩타이드 유사물의 구조와 실질적으로 유사한 구조를 갖는다. 두개의 분자가 모두 실질적으로 유사한 구조를 갖거나 유사한 생물학적 활성을 갖는 경우, 당해 분자는 다른 분자에 대해 실질적으로 유사하다고 언급된다.

ICAM-1과 같은 분자의 단편은 이 분자의 폴리펩타이드 서브세트를 언급하는 것으로 의미된다. 특히, 본 발명은 ICAM-1의 하나 이상의 단편(이러한 단편은 완전한 ICAM-1 분자에 접촉하거나 접촉하지 않을 수 있다)으로 구성된 ICAM-1의 작용성 유도체에 관한 것이다. 가용성(즉, 막에 결합되지 않음)의 작용성 유도체가 특히 바람직하다.

ICAM-1과 같은 분자의 변이체는 전체 분자 또는 이의 단편에 대해 구조 및 기능이 실질적으로 유사한 분자를 언급하는 것으로 의미된다. 따라서, 본 명세서에서 이러한 용어로서 변이체가 사용되는 경우, 두 분자중 한 분자의 구조가 다른 분자에서 발견되지 않거나, 아미노산 잔기의 서열이 동일하지 않더라도 유사한 활성을 갖는 경우 두 분자는 서로 변이체이다. ICAM-1의 돌연변이체 분자는 ICAM-1 변이체의 예이다.

ICAM-1과 같은 분자의 동족체는 전체 분자 또는 이의 단편에 대한 작용이 실질적으로 유사한 분자를 언급하는 것으로 의미된다.

본 명세서에 사용되는 바와 같이, 분자가 통상적으로 분자의 일부가 아닌 추가의 화학적 잔기를 함유하는 경우 또다른 분자의 화학적 유도체인 것으로 언급된다. 이러한 잔기는 분자의 용해성, 흡수성, 생물학적 반감기 등을 향상시킬 수 있다. 이 잔기는 분자의 독성을 감소시키거나, 분자의 바람직하지 않은 부작용을 제거 또는 약하게 할 수 있다. 이러한 효과를 매개할 수 있는 잔기가 문헌[참조: Remington's Pharmaceutical Science(1980)]에 기술되어 있다. 항원-유도체화된 분자는 특정한 부류의 화학적 유도체를 구성한다. 보조제-유도체화된 분자는 보조 잔기를 함유하는 분자(예: ICAM-1의 작용성 유도체)이다. 바이러스에 대한 이러한 분자의 결합은 항원 잔기를 바이러스와 더욱 가깝게 하여, 바이러스의 면역원성을 증가시키며 항-바이러스 치료를 촉진시킨다. 어떠한 적합한 보조 잔기도 사용될 수 있으나, 예를 들어 무라밀 디펩타이드와 같은 보조제를 사용하는 것이 바람직하다[참조: Allison, A.C. et al., UCLA Symp. Molec. Cell. Biol., New Ser. 84: 401-410(1988); Riveau, G. et al., J. Lymph. Res. 44:448-454 (1988)]. 이러한 잔기를 분자에 결합시키는 공정은 당해 분야에 널리 공지되어 있다.

ICAM-1의 펩타이드 유사물은 이의 3차 구조가 ICAM-1의 3차 구조와 실질적으로 유사한 화합물이다.

본 발명의 항-바이러스제는 천연 공정(예: ICAM-1의 동족체를 생성하기 위해 동물, 식물, 진균, 세균 등을 유도하는 방법, 또는 폴리클로날 또는 모노클로날 항-ICAM-1 항-인자형을 생성하기 위해 동물을 유도하는 방법); 합성 방법(예: ICAM-1의 작용성 유도체의 폴리펩타이드를 합성하기 위한 메리펩드 방법의 이용); 또는 재조합 기술[예: 재조합 플라스미드 또는 바이러스 벡터로부터 또는 다양한 숙주(즉, 효모, 세균, 진균, 배양된 포유동물 세포 등)에서 ICAM-1의 항-바이러스 작용성 유도체를 생성하는 기술], 또는 단백질 분해로 수득할 수 있다. 사용할 수 있는 방법의 선택은 편리성, 목적하는 수율 등과 같은 인자에 의존한다. 특정한 항-바이러스제를 생성하기 위하여 상술된 방법, 공정, 또는 기술중 단지 하나만을 사용할 필요는 없다; 상술된 공정, 방법 및 기술은 특정한 항-바이러스제를 수득하기 위하여 조합될 수 있다.

약 100개 이하의 잔기를 갖는 ICAM-1의 작용성 유도체는 통상적으로 시험관내 합성에 의해 제조될 수 있다. 필요한 경우, 이러한 단편은 정제된 단백질 또는 조 단백질의 표적된 아미노산 잔기를, 선택된 촉매 또는 말단 잔기와 반응할 수 있는 유기 유도체화제와 반응시켜 변형시킬 수 있다. 생성된 공유 유도체는

생물학적 활성에 중요한 잔기를 확인하는데 사용될 수 있다.

시스테인 잔기는 가장 통상적으로  $\alpha$ -할로아세테이트(및 상응하는 아민)(예: 클로로아세트산 또는 클로로아세트아미드)와 반응시켜 카복시메틸 또는 카복시아미도메틸 유도체를 수득한다. 또한, 시스테인 잔기는 브로모트리플루오로아세톤,  $\alpha$ -브로모- $\beta$ -(5-이미도조일)프로피온산, 클로로아세틸 포스페이트, N-알킬말레이미드, 3-니트로-2-피리딜 디설파이드, 메틸 2-피리딜 디설파이드, p-클로로머큐리벤조에이트, 2-클로로머큐리-4-니트로페놀, 또는 클로로-7-니트로벤조-2-옥사-1,3-디아졸과 반응시켜 유도체화시킨다.

히스티딘 잔기는 디에틸프로카보네이트가 히스티딘 측쇄에 비교적 특이적이므로 pH 5.5 내지 7.0에서 디에틸프로카보네이트와 반응시켜 유도체화시킨다. 파라-브로모페닐아실 브로마이드도 유용하다; 반응은 pH 6.0의 0.1M 나트륨 카코딜레이트에서 수행하는 것이 바람직하다.

리신 및 아미노 말단 잔기는 숙신산 무수물 또는 다른 카복실산 무수물과 반응시킨다. 이들 제제로의 유도체화는 리신 잔기의 하전을 전환시키는데 효과가 있다.  $\alpha$ -아미노-함유 잔기를 유도체화하기 위한 다른 적합한 시약은 이미도에스테르(예: 메틸 피콜린이미데이트); 피리독살 포스페이트; 피리독살; 클로로보로하이드라이드; 트리니트로벤젠설포산; 0-메틸-이스우레아; 2,4-펜탄디온; 및 글리옥살레이트와의 트랜스아미나제-촉매화된 반응물을 포함한다.

아르기닌 잔기는 페닐글리옥살, 2,3-부탄디온, 1,2-사이클로헥산디온 및 니하이드린종의 하나 또는 수개의 통상적 시약과 반응시켜 변형시킨다. 아르기닌 잔기의 유도체화는 구아니딘 작용 그룹의 높은 pKa 때문에 알칼리 조건하에서 반응을 수행해야 한다. 또한, 이들 시약은 리신 그룹 및 아르기닌 엡실론-아미노 그룹과 반응시킬 수 있다.

티로신 잔기의 특정한 변형은 방향족 디아조늄 화합물 또는 테트라니트로메탄과 반응시켜 티로신 잔기에 스펙트럼 표지물을 도입시키는데 특히 관심을 갖고 광범위하게 연구되었다. 가장 통상적으로, N-아세틸 이미디졸 및 테트라니트로메탄은 각각 0-아세틸 티로신 종류 및 3-니트로 유도체를 형성하는데 사용된다. 티로신 잔기는 방사선 면역검정법에 사용하기 위한 표지된 단백질을 제조하기 위해 <sup>125</sup>I 또는 <sup>131</sup>I를 사용하여 요오드화시키며, 클로로아민 T 방법이 적합하다.

카복시 측쇄 그룹(아스파르트산 또는 글루탐산)을 카보디이미드(R'-N-C-N-R') [예: 1-사이클로헥실-3-(2-모르폴리닐)-(4-에틸)카보디이미드 또는 1-에틸-3 (4 아조니아 4,4-디메틸펜틸) 카보디이미드와 반응시켜 선택적으로 변형시킨다. 또한, 아스파르트산 및 글루탐산 잔기는 암모니아 이온과의 반응에 의해 아스파라긴 및 글루타민 잔기로 전환된다.

이작용성 제제로의 유도체화는 분해된 폴리펩타이드를 방출시키고 회수하기 위해 ICAM-1 작용성 유도체 융합 폴리펩타이드를 분해시키는 방법에 사용하기 위한 ICAM-1 작용성 유도체 분자를 수-불용성 지지체 매트릭스 또는 표면에 가교결합시키는데 유용하다. 통상적으로 사용되는 가교결합 제제는 예를 들어 1,1-비스(디아조아세틸)-2-페닐에탄, 글루타르알데하이드, N-하이드록시숙신이미드 에스테르(예: 4-아지도살리실산과의 에스테르), 호모이작용성 이미도에스테르[3,3'-디티오비스(숙신이미드)프로피오네이트와 같은 디숙신이미드 에스테르 포함], 및 이작용성 말레이미드(예: 비스-N-말레이미드-1,8-옥탄)을 포함한다. 메틸-3-[p-아지도페닐]디티오]프로피오이미데이트와 같은 유도체화제는 광의 존재하에 가교결합을 형성할 수 있는 광활성화 가능한 중간물질을 생성한다. 한편, 시아노겐 브로마이드-활성화된 탄수화물과 같은 반응성의 수-불용성 매트릭스 및 문헌[참조: 미합중국 특허 제3,969, 287호, 제3,691,016호, 제4,195,128호, 제4,247,642호, 제4,229,537호 및 제4,330,440호]에 기술된 반응성 기질을 단백질 고정화에 사용한다.

글루타민 및 아스파라긴 잔기는 종종 상응하는 글루탐산 및 아스파르트산 잔기로 탈아미드화된다. 달리, 이들 잔기는 온화한 산성 조건하에서 탈아미드화된다. 이들 잔기의 어떠한 형태도 본 발명의 범위에 속한다.

다른 변형에는 프롤린 및 리신의 하이드록실화, 세린 또는 트레오닌 잔기의 하이드록실 그룹의 포스포릴화, 리신, 아르기닌 및 히스티딘 측쇄의  $\alpha$ -아미노 그룹의 메틸화[참조: T.E. Creighton, Proteins: Structure and Molecule Properties; W.H. Freeman Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)], N-말단 아민의 아세틸화, 및 몇몇 경우에는 C-말단 카복실 그룹의 아마이드화가 포함된다.

변형된 아미노산 서열을 갖는 ICAM-1의 작용성 유도체는 또한 DNA의 돌연변이에 의해 제조할 수 있다. ICAM-1 유전자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열이 제1도에 나타나 있다. 이러한 변이체는, 예를 들어 제1도에 나타난 아미노산 서열중의 잔기가 결실 또는 삽입 또는 치환되어 생성된다. 최종 작제물이 목적하는 활성을 가지는 한, 결실, 삽입 및 치환의 어떠한 조합도 최종 작제물을 생성하는데 사용될 수 있다. 분명히, 변이체를 암호화하는 DNA에서 생성될 돌연변이는 판독프레임 외부에 서열을 배치해서는 안 되며, 바람직하게는 2차 mRNA 구조를 만들 수 있는 상보성 영역을 생성하지 않아야 한다[참조: 유럽 특허원 공고 제75,444호].

유전자 수준에서, 이들 작용성 유도체는 통상적으로 ICAM-1 분자를 암호화하는 DNA내에서 뉴클레오타이드의 부위-지시된 돌연변이유발에 의해 제조되어, 작용성 유도체를 암호화하는 DNA를 생성한 후, 재조합체 세포 배양물에서 DNA를 발현시킨다. 작용성 유도체는 통상적으로 천연적으로 나타나는 동족체와 동일한 정량적 생물학적 활성을 나타낸다. 그러나, 작용성 유도체는 정상적으로 생성된 ICAM-1 분자에 대한 특성과 실질적으로 다를 수 있다.

아미노산 서열에 변화를 도입하는 부위는 예정할 수 있으나, 돌연변이 자체는 미리 결정할 필요가 없다. 예를 들어, 주어진 부위에서의 돌연변이 수행을 최적화하기 위하여, 무작위 돌연변이유발을 표적 코돈 또는 영역에서 수행할 수 있으나, 발현된 ICAM-1 작용성 유도체는 목적하는 활성을 갖는 최적 조합물에 대해 스크리닝한다. 공지된 서열을 갖는 DNA의 예정된 부위에서 치환 돌연변이를 생성하는 기술(예: 부위-특이적 돌연변이유발)은 널리 공지되어 있다.

본 발명에 따른 ICAM-1 작용성 유도체 분자는 바람직하게는 먼저 제조된 작용성 유도체 또는 단백질의 비변이체를 암호화하는 DNA의 부위-특이적 돌연변이유발에 의해 제조된다. 부위-특이적 돌연변이유발은 목적하는 돌연변이의 DNA 서열을 암호화하는 특정한 올리고뉴클레오타이드 서열 및 충분한 수의 인접한 뉴클레오타이드를 이용하여 ICAM-1의 작용성 유도체를 생성함으로써, 횡단되는 결실 점점의 양측상에 안정한 듀플렉스를 형성하기 위해 충분한 크기의 프라이머 서열 및 서열 복합체를 제공해야 한다. 통상적으로, 뉴클레오타이드 약 20 내지 25개의 프라이머가 바람직하며, 서열 점점의 양측상의 약 5 내지 약 10개의 잔기가 변형된다. 일반적으로, 부위-특이적 돌연변이유발 기술이 당해 분야에 널리 공지되어 있다[참조: Adelman et al., DNA 2:183 (1983), 본 명세서에 참조문헌으로 인용됨].

알 수 있는 바와 같이, 부위-특이적 돌연변이유발 기술은 통상적으로 일본쇄 및 이본쇄 형태 모두로 존재하는 파아지 벡터를 사용한다. 부위-지시된 돌연변이유발에 유용한 대표적인 벡터는 M13 파아지와 같은 벡터를 포함한다[참조: Messing et al., Third Cleveland Symposium on Macromolecules and Recombinant DNA, Editor A. Walton, Elsevier, Amsterdam(1981), 본 명세서에 참조문헌으로 인용됨]. 이들 파아지는 시판되고 있으며, 이들의 사용은 당해 전문가에게 널리 공지되어 있다. 달리는, 일본쇄 파아지 복제 기원을 함유하는 플라스미드 벡터[참조: Veira et al., Meth. Enzymol. 153:3 (1987)]를 일본쇄 DNA를 수득하는데 사용할 수 있다.

일반적으로, 본 발명에 따른 부위-지시된 돌연변이유발은 관련 단백질을 암호화하는 DNA 서열을 서열내에 포함하는 일본쇄 벡터를 먼저 수득함으로써 수행된다. 목적하는 돌연변이된 서열을 갖는 올리고뉴클레오타이드 프라이머는 예를들어 문헌[참조: Crea et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 75:5765 (1978)]의 방법에 의해 일반적으로 합성 제조된다. 이어서, 이 프라이머를 일본쇄의 단백질 서열 함유 벡터와 어닐링시키고, 이. 콜라이 폴리머라제 I 클레노우 단편과 같은 DNA-폴리머화 효소를 사용하여, 돌연변이를 갖는 본쇄의 합성을 완성시킨다. 따라서, 돌연변이된 서열 및 제2 본쇄는 목적하는 돌연변이를 갖는다. 이어서, 이러한 헤테로듀플렉스 벡터를 적합한 세포(예: JM101 세포)를 형질전환하는데 사용하고, 돌연변이된 서열 배열을 갖는 재조합체 벡터를 함유하는 클론을 선별한다.

이러한 클론을 선별한 후, 돌연변이된 단백질 영역을 제거시킨후, 단백질 생성에 적합한 벡터, 일반적으로 적합한 숙주의 형질전환에 사용될 수 있는 유형의 발현 벡터에 삽입시킨다.

아미노산 서열 결실은 일반적으로 약 1 내지 30개의 잔기, 보다 바람직하게는 1 내지 10개 잔기의 범위이며, 통상적으로 인접한다.

아미노산 서열 삽입물은 1개의 잔기로부터 본질적으로 무제한의 길이를 갖는 폴리펩타이드까지의 아미노산 및/또는 카복실 말단 융합, 및 1개 또는 다수개 아미노산 잔기를 갖는 서열내 삽입물을 포함한다. 서열내 삽입물(즉, 완전한 ICAM-1 분자 서열내의 삽입물)은 일반적으로 약 1 내지 10개의 잔기, 보다 바람직하게는 1 내지 5개의 잔기 범위일 수 있다. 말단 삽입의 예는, 재조합체 숙주로부터 ICAM-1 작용성 유도체의 분비를 용이하게 하기 위해 분자의 N-말단과, 숙주 세포와 이종 또는 동종인 시그널 서열의 융합을 포함한다.

작용성 유도체의 제3 그룹은 ICAM-1 분자내에 적어도 하나의 아미노산 잔기 및 바람직하게는 단지 하나의 아미노산 잔기를 제거시키고 그 위치에 다른 잔기가 삽입된 것이다. 이러한 치환체는 ICAM-1 분자의 특성을 정교하게 조절하는 것을 목적하는 경우, 바람직하게는 하기 표 1에 따라 수행한다.

[표 1]

| 최초잔기 | 치환체 예         |
|------|---------------|
| Ala  | gly; ser      |
| Arg  | lys           |
| Asn  | gln; his      |
| Asp  | glu           |
| Cys  | ser           |
| Gln  | asn           |
| Glu  | asp           |
| Gly  | ala; pro      |
| His  | asn; gln      |
| Ile  | leu; val      |
| Leu  | ile; val      |
| Lys  | arg; gln; glu |
| Met  | leu; tyr; ile |
| Phe  | met; leu; tyr |
| Ser  | thr           |
| Thr  | ser           |
| Trp  | tyr           |
| Tyr  | trp; phe      |
| Val  | ile; leu      |

작용적 또는 면역학적 동질성의 실질적인 변화는 표 1에 나타난 치환체보다 덜 보존적인 치환체를 선택 함으로써 이루어질 수 있다[즉, (a) 치환 범위내의 폴리펩타이드 주쇄의 구조, 예를들어 시이트(Sheet) 또는 나선형 구조, (b) 표적 부위에 있는 분자의 전하 또는 소수성, 또는 (c) 측쇄 크기의 유지 효과가 현저히 다른 잔기를 선택함으로써 이루어질 수 있다]. 일반적으로 예측되는 치환은 (a) 글리신 및/또는 프롤린의 또다른 아미노산에 의한 치환, 또는 결실 또는 삽입; (b) 친수성 잔기(예: 세린, 트레오닌)의 소수성 잔기(예: 루이신, 이소루이신, 페닐알라닌, 발린 또는 알라닌)에 의한 치환(또는 그 반대); (c) 시스테인 잔기의 다른 잔기에 의한 치환(또는 그 반대); (d) 양전성 측쇄를 갖는 잔기(예: 리신, 아르기닌, 또는 히스티딘)의 음전하를 갖는 잔기(예: 글루탐산 또는 아스파르트산)에 의한 치환(또는 그 반대); (e) 큰 측쇄를 갖는 잔기(예: 페닐알라닌)의 큰 측쇄를 갖지 않는 잔기(예: 글리신)에 의한 치환(또는 그 반대)을 포함한다.

대부분의 결실, 삽입, 특히 치환은 ICAM-1 분자의 특성을 급진적으로 변화시킬 것으로 기대되지 않는다. 그러나, 치환, 결실 또는 삽입의 효과가 이를 수행하기 전에는 정확히 예측하기 힘든 경우, 그 효과를 통상의 스크리닝 검정법에 의해 평가할 수 있음을 당해 분야의 전문가들이라면 알 수 있을 것이다. 예를 들어, 작용성 유도체는 통상적으로 천연 ICAM-1 분자 암호화 핵산의 부위-지시된 돌연변이유발, 재조합체 세포 배양물에서 변이체 핵산의 발현 및 임의로 예를들여(적어도 하나의 잔류하는 면역 에피토프에 결합시켜 작용성 유도체를 흡수하기 위해) 항-ICAM-1 분자 항체 컬럼상에서의 면역친화성 흡착과 같은 세포 배양물로부터의 정제에 의해 생성된다.

이어서, 세포 용해물 또는 정제된 ICAM-1 분자의 작용성 유도체의 활성을 목적하는 특성에 대해 적합한 스크리닝 검정법으로 스크리닝한다. 예를들어, 작용성 유도체의 면역학적 특성(예: 주어진 항체에 대한 친화성) 변화를 경쟁적 면역검정법으로 측정한다. 면역조절 활성의 변화는 적당한 검정에 의해 측정된다. 이러한 단백질 특성(예: 산화환원 안정성 또는 열안정성, 생물학적 반감기, 소수성, 단백질 분해에 대한 감수성 또는 담체와의 응집 경향 또는 다량체로의 응집 경향)의 변화를 통상의 기술을 가진 전문가에게 널리 공지된 방법으로 검정한다.

#### [ICAM-1의 작용성 도메인의 맵핑]

ICAM-1의 조사 결과 7개의 도메인을 갖는다는 것이 밝혀졌다. 이들 도메인중 5개는 세포외에 존재(도메인 5는 세포 표면에 가장 인접하고, 도메인 1은 세포 표면으로부터 가장 멀리 떨어져 있다)하고, 하나의 도메인은 트랜스막 도메인이며, 하나의 도메인은 세포질 도메인(즉, 세포내에 위치)이다. 바이러스에 결합하는 ICAM-1의 능력에 기여하는 도메인을 측정하기 위하여, 에피토프 맵핑 조사가 이용된다. 이러한 조사를 수행하기 위하여 상이한 결실 돌연변이체를 제조하고, 바이러스에 대한 결합능에 대해 특성화한다. ICAM-1에 결합할 수 있는 어떠한 바이러스도 이러한 조사에 사용될 수 있으나, 주요 혈청형의 사람 리노바이러스(HRV-14)를 사용하는 것이 바람직하다. 다른 방법으로는, 바이러스 또는 LFA-1에 결합하는 ICAM-1의 능력을 방해하는 것으로 공지된 항-ICAM 항체를 사용하여 수행할 수 있다. 이러한 적합한 항체의 예는 RR1/1[참조: Rothlein, R. et al., J. Immunol. 137:1270-1274(1986)], R6.5[참조: Springer,

T.A. et al., U.S. Patent Application Serial No. 07/250,446], LB-2[참조: Clark, E.A. et al., In: Leukocyte Typing I(A. Bernard, et al., Eds.), Springer-Verlag pp 339-346(1984)], 또는 CL203[참조: Staunton, D.E. et al., Cell 56:849-853(1989)]을 포함한다. 또다른 연구 방법으로는 결실 돌연변이체가 LFA-1에 결합할 수 있는가를 측정함으로써 수행될 수 있다. 이러한 실험을 수행하기 위해 용이하게 채택할 수 있는 방법이 문헌[참조: 유럽 특허원 공보 제169,146호, 미합중국 특허원 제07/045,963호 및 Rothlein, R. et al., J. Immunol. 137:1270-1274(1986), 이들 문헌은 모두 본 명세서에 참조문헌으로 인용됨]에 기술되어 있다.

ICAM-1의 결실 돌연변이체는 어떠한 다양한 방법으로도 생성할 수 있다. 그러나, 바람직하게는 부위 지시된 돌연변이유발, 또는 다른 재조합 방법(예: 특정한 단백질 영역을 암호화하는 서열이 결실된 ICAM-1 발현 유전자 서열의 삭제)으로 이러한 돌연변이체를 생성한다. 이러한 돌연변이체를 생성하기 위하여 채택할 수 있는 방법이 당해 분야에 널리 공지되어 있다. 이러한 공정을 이용하여, 3개의 ICAM-1 결실 돌연변이체를 제조한다. 제1 돌연변이체는 아미노산 잔기 F185부터 P284(즉, 도메인 3의 결실)까지가 결실되고, 제2 돌연변이체는 아미노산 잔기 P284부터 R451(즉, 도메인 4 및 5의 결실)까지가 결실되며, 제3 돌연변이체는 Y476 다음의 아미노산 잔기(즉, 세포질 도메인의 결실)가 결실된다. 이러한 조사 결과는 도메인 1, 2 및 3이 ICAM-1과 항-ICAM-1 항체, LFA-1 및 바이러스와의 상호작용에 주로 관여한다는 것을 나타낸다.

#### [바이러스 결합에 미치는 ICAM-1에서의 돌연변이의 효과]

ICAM-1은 바이러스, 특히 피코나비리데(Picornaviridae)속의 주요 혈청형의 리노바이러스, 그룹 A 콕사키바이러스(coxsackievirus)[참조: Colonna, R.J. et al., J. virol. 57:7-12 (1986)] 및 멘고 바이러스(Mengo virus)[참조: Rossmann, M.G. et al., Virol. 164:373-382 (1988)]와 상호작용하고 결합하는 능력을 갖는다. 이러한 상호작용은 ICAM-1 분자의 도메인 1에 존재하는 ICAM-1 아미노산 잔기에 의해 중재된다(제1도 및 2도). 이러한 상호작용은 ICAM-1의 도메인 2 및 3에 존재하는 아미노산의 분포에 의해 보조된다. 따라서, ICAM-1의 도메인 1, 2 및 3을 함유하는 ICAM-1 분자의 가용성 단편이 본 발명의 바람직한 작용성 유도체이다. ICAM-1의 도메인 1 및 2를 함유하는 ICAM-1 분자의 가용성 단편이 보다 바람직하다. ICAM-1의 도메인 1을 함유하는 ICAM-1 분자의 가용성 단편이 가장 바람직하다. 제1 ICAM-1 도메인내의 몇몇 아미노산 잔기가 ICAM-1과 예를들어 주요 혈청형의 사람 리노바이러스와의 상호작용에 관여한다. 이들 아미노산의 다른 아미노산으로의 치환은 리노바이러스가 ICAM-1에 결합하는 능력을 변화시킨다. 천연 아미노산 잔기 및 생성된 돌연변이체 ICAM-1 분자가 LFA-1, 또는 리노바이러스, 또는 항-ICAM-1 모노클로날 항체에 결합하는 능력에 미치는 이러한 잔기의 치환 효과를 표 3에 나타내었다. 표 3에서, 잔기는 아미노산을 암호화하는 일문자로 기재하고, 그 다음에 ICAM-1 분자에서 잔기의 위치를 기재하였다. 따라서, 예를들어 E90은 ICAM-1의 90위치에 있는 글루탐산 잔기를 언급한다. 유사하게, E90V는 90위치의 글루탐산 잔기 및 91위치의 발린 잔기로 구성된 디펩타이드를 언급한다. 치환 서열은 사선 / 표시의 우측에 나타내었다. ICAM-1의 Q1T, R13, Q27, K39KE, G46NN, R49KV, Q58, D71, K77T 및 R166PQ 잔기가 바이러스 결합에 관여한다(표 3).

바이러스 결합에 관여하는 ICAM-1 아미노산에서 돌연변이를 갖는 ICAM-1의 작용성 유도체가 본 발명에 특히 중요하다. 예를들어 V4를 G로 대체시키면 리노바이러스 또는 LFA-1에 대한 결합능이 약한 돌연변이체 ICAM-1 분자가 형성된다(표 3). ICAM-1의 R13 잔기를 E로 대체시키면, LFA-1 또는 리노바이러스에 대한 결합능이 실질적으로 약한 돌연변이체 분자가 형성한다(표 3). ICAM-1의 Q58 잔기를 H로 대체시키면, LFA-1을 결합하는 능력은 실질적으로 정상적이나 리노바이러스에 결합하는 능력은 실질적으로 손상된 돌연변이체 분자가 형성된다(표 3). ICAM-1의 D60S 잔기를 KL로 대체시키면, LFA-1을 결합하는 능력이 실질적으로 약하고 리노바이러스에 결합하는 능력이 약한 돌연변이체 분자가 형성된다(표 3).

LFA-1을 결합하는 능력은 감소되나 바이러스를 결합하는 능력은 정상적인 ICAM-1의 작용성 유도체가 특히 바람직하다. Q27을 L로 대체시키면 돌연변이체 ICAM-1 분자가 형성된다. 이러한 ICAM-1 작용성 유도체는 LFA-1을 결합하는 능력은 실질적으로 약하나, 리노바이러스를 결합하는 능력은 정상적이다(표 3). 표 3에 나타난 바와 같이 ICAM-1의 몇몇 작용성 유도체가 바람직한 특성을 나타내는 것으로 밝혀졌다. 지시된 위치에서 A3GL, L27, A34, H73 및 T73와 같은 아미노산을 갖는 ICAM-1의 작용성 유도체가 바람직한 유도체의 예이다. 수형체에 이러한 돌연변이체 분자의 투여는 천연적인 ICAM-1-LFA-1 상호작용을 변형시키지 않으면서 바이러스 감염을 치료할 수 있다. 따라서, 이러한 투여는 바이러스 감염은 치료하며, 수형체의 면역을 억제시키거나 염증 반응을 방해하지는 않는다.

제1 도메인 및 제2 도메인에서 글리코실화 부위는 바이러스 결합에 관여한다(표 3). N48을 H로 대체시키거나 N175를 A로 대체시키면, 바이러스 또는 LFA-1의 결합능이 약화된 돌연변이체 ICAM-1 분자가 형성된다. N118을 Q로 대체시키거나 N156을 E로 대체시키면, LFA-1을 결합하는 능력이 더 약한 돌연변이체 ICAM-1 분자가 형성된다. 이와는 대조적으로, N103을 K로 대체시키거나 N175 TSA를 QTLG로 대체시키면, 바이러스 또는 LFA-1을 실질적으로 결합할 수 없는 돌연변이체 ICAM-1 분자가 형성된다.

#### [본 발명의 항-바이러스제]

ICAM-1의 상술된 작용성 유도체 이외에, 본 발명에 따라 바이러스 감염의 치료에 사용될 수 있는 다른 제제는 ICAM-1에 대한 항체, 항-ICAM-1 항체에 대한 항-이디오타입 항체, 및 ICAM-1에 결합할 수 있는 수용체 분자(예: LFA-1, p150, 95, Mac-1 등) 또는 이러한 분자의 단편을 포함한다.

사용될 수 있는 ICAM-1 (또는 ICAM-1의 작용성 유도체)에 대한 항체는 폴리클로날 또는 모노클로날 항체일 수 있다.

본 발명에 중요한 항-이디오타입 항체는 ICAM-1과 경쟁하여(또는 배제시켜) HRV에 결합할 수 있다. 이러한 항체는, 예를들어 항체를 항-ICAM-1 항체에 대해 생성한 후 HRV 또는 CD18계의 구성원(예: LFA-1)을 결합하는 능력에 대해 항체를 스크리닝하여 수득할 수 있다.

CD-18계의 분자는 ICAM-1에 결합할 수 있으므로, 이러한 분자(예:  $\alpha$  및  $\beta$  아단위를 모두 갖는 이종이량체,  $\alpha$  또는  $\beta$  아단위중 단지 하나만으로 구성된 분자, 또는 두 아단위 모두 또는 어느 하나의 단편

을 갖는 분자)의 투여로 내피 세포상에 존재하는 ICAM-1에 대한 결합을 위해 HRV와 경쟁할 수 있다(또는 배제시킬 수 있다).

#### [본 발명의 치료 용도]

본 발명의 치료 효과는 환자에게 ICAM-1의 치료학적 활성 작용성 유도체, ICAM-1에 결합할 수 있는 CD18 계의 구성원, 항-ICAM-1 항체에 대한 항-이디오타입 항체 또는 ICAM-1에 대한 항체를 투여하여 수득할 수 있다. 이러한 작용성 유도체의 치료상 이점은 담체에 대한 결합을 증가시키거나 ICAM-1 작용성 유도체의 항-바이러스 활성을 증가시키기 위해 첨가된 추가의 아미노산 잔기를 갖는 ICAM-1의 작용성 유도체를 사용함으로써 증대시킬 수 있다. 본 발명의 범위에는 추가로 작용성 유도체가 바이러스를 결합하는 능력을 나타내는 한 특정한 아미노산 잔기가 결실되거나 변형된 아미노산 잔기를 함유하는 ICAM-1의 작용성 유도체를 포함시키고자 한다.

본 명세서에 기술된 ICAM-1 작용성 유도체는, 이들을 함유하는 제제가 통상적으로 및 천연적으로 발견되는 물질이 실질적으로 없는 경우, 천연 오염물이 실질적으로 제거되었다라고 언급된다.

환자에게 본 발명의 치료학적 활성 분자를 제공하는 경우, 투여되는 제제의 용량은 환자의 연령, 체중, 신장, 성별, 일반적 건강 상태, 이전의 의학적 내력 등에 따라 달라진다. 일반적으로, 다소 적거나 많은 용량을 투여할 수 있으나, 약 1pg/kg 내지 10mg/kg(환자의 체중당)의 제제 용량으로 수형체에 투여함이 바람직하다.

본 발명의 치료제는 정맥내, 근육내, 피하내, 장내 또는 비경구적으로 환자에게 투여할 수 있다. 이러한 제제를 주사로 투여하는 경우, 연속 주입, 단일 거환(boluses) 또는 다수의 거환으로 투여될 수 있다. 특히 바람직한 투여 방법은 비내 투여이다.

항-바이러스제는 약제학적으로 허용되는 조성물의 일부로서 수형체에게 제공된다. 조성물의 투여가 수형체 환자에 의해 허용될 수 있는 경우, 그 조성물은 약제학적으로 허용된다고 언급된다. 본 발명의 항-바이러스제는 치료학적 활성양으로 수형체에게 제공된다. 투여되는 양이 생리학적으로 의미있는 경우, 그 양은 치료학적 활성이라고 언급된다. 제제의 존재로 수형체 환자의 생리에 검정 가능한 변화가 생기는 경우, 그 제제는 생리학적으로 의미가 있다. 예를들어 제제를 수형체 환자에게 투여하여 당해 수형체에서 바이러스 감염 또는 감염성을 억제하거나 약화시킬 수 있는 경우, 그 제제의 양이 치료학적 활성이다.

본 발명의 항-바이러스제의 투여는 예방 목적 또는 치료 목적일 수 있다. 예방적으로 제공되는 경우, 항-바이러스제는 바이러스 감염의 증상중(예: 감염전이나 감염시 또는 감염 직후, 감염 증상의 어떠한 진행 시기)에 제공된다. 제제의 예방적 투여는 연속적인 바이러스 감염을 방지 또는 약화시키거나, 이러한 감염이 다른 개체에게 전염될 가능성을 감소시킬 수 있다.

치료학적으로 제공되는 경우, 항-바이러스제는 급성 바이러스 감염의 증상(예: 경비출혈, 발열 등)의 개시(또는 바로 직후)에 제공된다. 이제제의 치료학적 투여는 급성 바이러스 감염을 약화시킬 수 있다.

따라서, 본 발명의 항-바이러스제는 (예측된 감염을 억제하기 위해서) 바이러스 감염 개시전이나 감염 개시후에 투여될 수 있다.

본 발명의 항-바이러스 분자는 약제학적으로 유용한 조성물을 제조하기 위해 공지된 방법에 따라 제형화될 수 있다(이들 물질 또는 작용성 유도체는 약제학적으로 허용되는 담체 비히클과 혼합된다). 다른 사람 단백질(예: 사람 혈청 알부민)을 포함하는 적합한 비히클 및 이의 제제가 문헌[참조: Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th ed., Osol, A., Ed., Mack, Easton PA (1980)]에 기술되어 있다. 효과적인 투여에 적합한 약제학적으로 허용되는 조성물을 제조하기 위하여, 이러한 조성물은 적합한 양의 담체 비히클과 함께 유효량의 제제를 함유한다.

작용 기간을 조절하기 위하여 추가의 약제학적 방법을 이용할 수 있다. 조절된 방출 제제는 약제를 흡수하거나 복합체를 만들도록 중합체를 사용함으로써 성취될 수 있다. 조절된 전달은 적합한 거대분자(예: 폴리에스테르, 폴리아미노산, 폴리비닐, 피롤리돈, 에틸렌비닐아세테이트, 메틸셀룰로즈, 카복시메틸셀룰로즈, 또는 프로타민, 셀페이트) 및 거대분자의 농도 뿐만 아니라 방출을 조절하기 위한 도입 방법을 선택하여 실시할 수 있다. 방출 조절된 제제에 의해 작용 기간을 조절하기 위한 또다른 가능한 방법은 항-바이러스제를 중합체성 물질의 입자(예: 폴리에스테르, 폴리아미노산, 하이드로겔, 폴리(락트산), 또는 에틸렌 비닐아세테이트 공중합체)에 도입하는 것이다. 달리, 이들 제제를 중합체성 입자에 도입시키는 대신에, 이들 물질을 예를들어 코아세르베이션(coacervation) 기술 또는 계면 중합화에 의해 제조된 마이크로캡슐(예: 각각 하이드록시 메틸셀룰로즈 또는 젤라틴 마이크로캡슐, 및 폴리(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐), 또는 콜로이드성 약제전달 시스템(예: 리포솜, 알부민 중심체, 마이크로에멀전, 나노입자 및 나노캡슐) 또는 마크로에멀전에 트랩시킬 수 있다. 이러한 기술이 문헌[참조: Remington's Pharmaceutical Sciences (1980)]에 기술되어 있다.

#### [본 발명의 진단 및 예측적 용도]

주요 혈청형의 사람 리노바이러스를 인지하고 결합하는 ICAM-1의 능력은 개체에서 리노바이러스 감염의 존재를 진단하기 위한 이의 용도에 기초를 제공한다. 현재, 미합중국에서 내과병원을 찾는 사람의 약 20%가 리노바이러스 또는 세균 감염에 의해 발병될 수 있는 질병 증상을 수반한다. 세균 감염은 항생제로 치료할 수 있으나, 이러한 제제는 리노바이러스에 대해서 효과적이지 못하고, 리노바이러스와 세균 감염을 구별하는 방법이 매우 필요하다.

본 발명에 따라, 개체의 점액, 경비 분비액, 또는 기타 체액에서 리노바이러스의 존재를 확인할 수 있는 검정법이 제공된다. 사람 리노바이러스는 60개의 ICAM-1 결합 부위를 가지므로, 동시에 60개의 상이한 ICAM-1 분자를 결합할 수 있다. 각각의 결합 부위는 너무 작아서 항체에 접근할 수 없다.

하나의 양태에서, 본 발명의 검정법은 검정 가능하게 표지된 ICAM-1 작용성 유도체 분자의 양을 환자의 점액, 경비 분비액 등의 존재하에 배양한 후, 바이러스에 결합된 표지된 분자의 양을 측정함을 특징으로

한다.

바람직한 양태에서, 표지되지 않은 ICAM-1 작용성 유도체는 고체 지지체(예: 유리, 폴리스티렌, 폴리프로필렌, 폴리에틸렌, 텍스트란, 나일론, 아밀라제, 천연 및 변형된 셀룰로즈, 폴리아크릴아미드, 아가로즈 및 마그네타이트)에 결합시킨다. 담체의 특성은 본 발명의 목적상 어느정도 가용성이거나 불용성일 수 있다. 지지체 물질은 커플링된 분자가 바이러스에 결합할 수 있는한 실질적으로 모든 가능한 구조적 배위도 가질 수 있다. 따라서, 지지체 배위는 비이드에서와 같이 구형이거나, 시험관의 내부 표면 또는 막대기의 외부 표면에서와 같이 실린더형일 수 있다. 반면, 표면은 시이트, 시험 스트립 등과 같이 편평할 수 있다. 당해 분야의 전문가라면 모노클로날 항체를 결합시키기 위한 많은 다른 적합한 담체(예: 유리, 폴리스티렌, 종이, 셀룰로즈 등)를 알 수 있을 것이며, 통상의 실험을 이용하여 이를 확인할 수 있을 것이다.

바이러스를 함유하는 것으로 추정되는 유체 샘플은, 유체내에 존재하는 바이러스가 지지체-결합된 ICAM-1의 작용성 유도체에 결합하기에 충분한 조건하에, 결합된 ICAM-1 작용성 유도체와 접촉시킨다. 이어서, 표지된 ICAM-1 작용성 유도체가 바이러스상의 개방된 ICAM-1 결합 부위에 결합하기에 충분한 조건하에 지지체를 표지된 ICAM-1의 작용성 유도체의 존재하에 배양한다. 표지된 ICAM-1 작용성 유도체의 결합되지 않은 분자를 세척하여 제거시킨 후, 지지체에 결합된 표지물의 양을 측정한다. 지지체에 결합된 표지된 ICAM-1 작용성 유도체 분자의 존재는 유체 샘플중에 바이러스가 존재한다는 것을 나타낸다.

용이하게 알 수 있는 바와 같이, 상술된 검정법의 목적을 이탈하지 않으면서 이와 동등한 많은 검정법이 이용될 수 있다. 예를들어, 이 검정법은 고체 지지체를 사용하기 보다는 액체상중에서 수행할 수 있다. 달리는 면역검정법의 다른 변형을 이용할 수 있다. 결합된 ICAM-1을 사용하는 대신, 결합된 항-리노바이러스 항체를 사용할 수 있다. 이러한 검정법으로 결합된 항체의 특성 및 특이성에 따라 아혈청형(또는 바이러스의 아종)을 확인할 수 있다.

본 발명의 당해 양태에 따라 사용될 수 있는 표지물의 유형은 예를들어 (이에 한정됨이 없이) 효소 표지물, 방사선 동위원소 표지물, 비-방사선 동위원소 표지물, 형광 표지물 및 화학발광 표지물을 포함한다.

적합한 효소 표지물의 예는 말레이트 데하이드로게나제, 스태필로코커스 뉴클레아제, 델타-5-스테로이드 이소머라제, 효모-알콜 데하이드로게나제, 알파-글리세롤 포스페이트 데하이드로게나제, 트리오스 포스페이트 이소머라제, 퍼옥시다제, 알칼리성 포스파타제, 아스파라기나제, 글루코스 옥시다제, 베타-갈락토시다제, 리보뉴클레아제, 우레아제, 카탈라제, 글루코스-6-포스페이트 데하이드로게나제, 글루코아밀라제, 아세틸콜린 에스테라제 등을 포함한다.

적합한 방사선 동위원소 표지물의 예는 H, In, I, I, P, S, C, Cr, To, Co, Fe, Se, Eu, Y, Cu, Ci, At, Pb, Sc, Pd 등을 포함한다.

적합한 비-방사선 동위원소 표지물의 예는 Gd, Mn, Dy, Tr, Fe 등을 포함한다.

적합한 형광 표지물의 예는 Eu 표지물, 플루오레세인 표지물, 이소티오시아네이트 표지물, 로다민 표지물, 피코에리트린 표지물, 피코시아닌 표지물, 알로피코시아닌 표지물, o-프탈알데하이드 표지물, 플루오레스아민 표지물 등을 포함한다.

화학발광 표지물의 예는 루미날 표지물, 이소루미날 표지물, 방향족 아크리디늄 에스테르 표지물, 이미다졸 표지물, 아크리디늄염 표지물, 옥살레이트 에스테르 표지물, 루시페린 표지물, 루시페라제 표지물, 애쿠오린 표지물 등을 포함한다.

당해 분야의 전문가라면 본 발명에 따라 사용할 수 있는 다른 적합한 표지물을 알 수 있다. ICAM-1의 작용성 유도체에 대한 이러한 표지물의 결합은 당해 분야의 전문가에게 일반적으로 공지된 표준 기술을 이용하여 수행할 수 있다. 전형적인 기술이 문헌[참조: Kennedy, J.H., et al., (Clin. Chim. Acta 70:1-31 (1976)), and Schurs, A.H.W.M., et al. (Clin. Chim. Acta 81:1-40 (1977))]에 기술되어 있다. 후자의 문헌에 언급된 커플링 기술은 글루타르알데하이드법, 페리오데이트법, 디말레이미드법, m-말레이미도벤질-N-하이드록시-숙신이미드 에스테르법이며, 이들 방법은 모두 본 명세서에 참조로 인용되었다.

상술된 시험관내 검정법 이외에, 생체내 영상화에 의해 감염의 중심을 확인하기 위하여 개체에게 검정 가능하게 표지된 ICAM-1의 작용성 유도체를 투여할 수 있다. 또다른 양태에서, 환자 조직의 샘플을 꺼내어, 바이러스 감염의 정상 소재의 측정을 수행하기 위해, 검정 가능하게 표지된 ICAM-1의 작용성 유도체의 존재하에서 배양한다. 이러한 정상 소재의 분석은 바이러스의 존재를 평가하기 위해 배양물 또는 배양 배지중의 세포상에서도 수행할 수 있다.

#### [항-바이러스제의 백신으로서의 이용]

본 발명은 또한 백신의 제조를 통한 바이러스 감염을 방지하는 방법을 제공한다. 본 발명의 한 양태에 따라, 하나 이상의 리노바이러스 아혈청형 또는 아종(주요 혈청형 모두)을 바이러스의 감염성을 감소시키기 위해 ICAM-1의 작용성 유도체의 존재하에서 배양한다. 이어서, 결합된 ICAM-1의 작용성 유도체를 함유한 바이러스를 개체에서 면역 반응을 일으키기에 충분한 양으로 환자에게(주사, 경구, 또는 비내) 투여한다. 바이러스 ICAM-1 결합 부위가 ICAM-1 작용성 유도체에 의해 차단되므로, 투여 결과 질병이 없어진다.

바람직한 태양에서, 바이러스 감염성을 약독화시키기 위하여 사용되는 ICAM-1의 작용성 유도체는 보조제 유도체화된 ICAM-1 분자이다. 이러한 분자의 사용은 약독화된 바이러스의 면역원성을 증가시킬 수 있다.

일반적으로 본 발명을 기술하였으나, 달리 명시되지 않는한 본 발명을 제한하지 않으면서 설명하기 위해 제공된 하기 실시예를 통해 본 발명을 보다 용이하게 이해할 수 있을 것이다.

#### [실시예 1]

[면역글로불린 슈퍼유전자계의 인테그린-결합 구성원인 ICAM-1]

ICAM-1 내부 반복체의 배열을 마이크로제니(Microgenic) 단백질 배열 프로그램[참조: Queen, C., et al., NuCl. Acid. Res., 12:581-599 (1984)]을 사용하여 수행한 후, 조사하였다. IgM, N-CAM 및 MAG에 대해 ICAM-1을 배열시키는 것은 마이크로제니(Microgenic)와 얼라인(Align) 프로그램[참조: Dayhoff, M.O., et al., Meth. Enzymol. 91:524-545(1983)]을 사용하여 실시했다. 국립 생체의학 연구 재단(National Biomedical Research Foundation)이 후원한 4개의 단백질 서열 데이터 베이스는, 윌리엄스(Williams)와 피어슨(Pearson)의 FASTP 프로그램을 이용하여, 단백질 서열의 유사성에 대해 조사했다[참조: Lipman, D.J., et al., Science 227:1435-1439(1985)].

ICAM-1은 인테그린의 리간드이기 때문에, 이것이 면역글로불린 슈퍼유전자계의 구성원이라고 예상되지 않았다. 그러나, ICAM-1 서열의 조사는 이것이 면역글로불린 슈퍼유전자계 내의 구성원에 대해 제안된 모든 기준을 충족시키고 있음을 보여주고 있다. 이 기준은 다시 하기에서 논의된다.

ICAM-1의 전체적인 세포외 도메인(extracellular domain)은, 제2a도에 정렬되어 나타난 것과 같이 5개의 동종 면역글로불린-유사 도메인으로 구성되었다. 도메인 1 내지 4는 각각 88, 97, 99 및 99개의 잔기 길이이며, 따라서 전형적인 Ig 도메인 크기이다; 도메인 5는 68 잔기 내에서 잘려있다. FASTP 프로그램을 이용한 NBRF 데이터 베이스의 연구는, IgM과 IgG C 도메인을 포함한 면역글로불린 슈퍼유전자계의 구성원과, T 세포 수용체  $\alpha$  아단위 가변 도메인 및 알파 1 $\beta$  당단백질이 상당한 상동성이 있음을 보여주고 있다(제2b-d도).

상기 정보를 이용하여, ICAM-1의 아미노산 서열을 면역글로불린 슈퍼유전자계의 다른 구성원의 아미노산 서열과 비교했다.

세가지 유형의 Ig 슈퍼계 도메인, 즉 V, C1 및 C2가 구분되어 왔다. V와 C 도메인 모두는, 도메인 내부의 디설파이드 결합에 의해 함께 연결된 2개의  $\beta$ -시이트로 구성되어 있다; V 도메인은 9개의 항-평행  $\beta$ -본쇄를 갖고 있으며, C 도메인은 7개를 갖고 있다. 불변 도메인은 제2a도에 나타난 바와 같이 특징적인 잔기에 근거하여 C1- 및 C2-세트로 나뉜다. C1-세트는 항원 인지에 관계된 단백질을 포함한다. C2-세트는 여러가지 Fc 수용체, 및 세포접착에 관계되는 CD2, LFA-3, MAG 및 NCAM 등의 단백질을 포함한다. ICAM-1 도메인은, 당해 세트에 ICAM-1을 위치시킨 C2-세트의 도메인과 가장 강하게 상동성을 나타내는 것으로 밝혀졌다; 이것은 제2도에서  $\beta$ -본쇄 B-F에 대해 나타난 바와 같은 C1 도메인보다, C2에 보존된 잔기에 대해 더 강한 유사성을 나타내는 것으로 반영된다. 또한, ICAM-1 도메인은, V와 C1 도메인내에서 이들 본쇄와 결합하는 경우보다 C2 도메인의  $\beta$ -본쇄 A 및 G와 훨씬 더 잘 결합되어, 전체 C2 도메인 강도를 통해 좋은 배열이 되도록 한다. NCAM, MAG 및  $\alpha$  1- $\beta$  당단백질로부터의 C2 도메인과의 배열은 제2b도 및 2c도에 나타나 있다: 상동성(identity)의 범위는 28 내지 33%다. T 세포 수용체 V $\alpha$ 와의 상동성 27% 및 IgM C 도메인 3과의 상동성 34%의 배열이 나타난다(제2b, 2d도).

면역글로불린 도메인의 가장 중요한 특징의 하나는,  $\beta$  시이트 샌드위치를 안정화시키는 B 및 F  $\beta$  본쇄를 브릿징하는 디설파이드-결합된 시스테인이다; ICAM-1에서 시스테인은, 몇가지 다른 V- 및 C2-세트 도메인에서 처럼 샌드위치와 접해있고 이 접착을 안정화시키는 루이신이 발견된 도메인 4의 본쇄 f를 제외하고, 모든 경우에서 보존된다. 시스테인 사이의 거리(43, 50, 52 및 37 잔기)는 C2-세트에서 기술된 바와 같다.

ICAM-1에서 쇄내의 디설파이드 결합의 존재를 테스트하기 위해, 환원 및 비-환원 조건하에서 내피 세포 ICAM-1을 SDS-PAGE 처리했다. 내피 세포 ICAM-1은, JY 또는 비장 용모 세포 ICAM-1보다 낮은 글리코실화 이종성을 나타내며 Mr에서 전이에 대해 커다란 민감성을 나타내기 때문에 사용됐다. 그러므로, ICAM-1은, 상기에서 기술된 바와 같이, 16시간 동안 LPS(5 $\mu$ g/ml)로 자극된 체대정맥 내피 세포 배양물로부터 면역침화성 크로마토그래피에 의해 정제된다. 아세톤으로 침전시킨 ICAM-1을 0.25% 2-머캅토에탄올 또는 25mM의 요오도아세트 아미드를 지닌 샘플 완충액[참조: Laemmli, U.K., Nature 227:680-685(1970)]에 재현탁시키고, 100°C에서 5분간 유지시킨다. 샘플을, SDS-PAGE 4670 및 은 염색 4613으로 처리한다. 내피 세포 ICAM-1은 환원 조건하에서 뚜렷한 Mr 값이 100kd, 비-환원 조건하에서 96kd를 나타내는 것으로 보아, 천연 ICAM-1에 쇄내 디설파이드가 존재하고 있음을 강력히 시사해 주고 있다.

2차 구조를 예견하기 위해 일차 서열을 사용했을 경우[참조: Chou., P.Y., et al., Biochem. 13:211-245(1974)] 각 ICAM-1 도메인내의 예상된 7개  $\beta$  본쇄, 제2a도 상단의 표지된 a 내지 g는, 면역글로불린 도메인에 대한 예측을 정확히 충족시켜 주는 것이며 면역글로불린중의 본쇄 A 내지 H의 위치와 상응한다는 것을 나타낸다(제2a도, 하단). 도메인 5는 A 및 C 본쇄가 결실되어 있지만, 이들이 시이트의 가장자리를 형성하기 때문에 시이트는 여전히 형성될 수 있으며, 다른 C2 도메인에 대해 제안된 것처럼 본쇄 D와 함께 본쇄 C의 자리를 차지하게 될 것이다: B와 F 본쇄 사이의 특징적인 디설파이드 결합은 영향받지 않는 것 같다. 결국, 도메인 크기, 서열, 상동성, 추정된 도메인내에서 디설파이드 결합을 형성하는 보존 시스테인, 디설파이드 결합의 존재 및 예상된  $\beta$  시이트 구조 모두에 대한 표준은 면역글로불린 슈퍼유전자계중에 ICAM-1이 포함됨을 말해주는 것이다.

ICAM-1은, NCAM 및 C2 세트의 MAG 당단백질과 가장 강하게 상동성인 것으로 밝혀졌다. 이것은 NCAM과 MAG 모두가 세포-세포 접촉을 매개하기 때문에 특히 관심이 많은 것이다. NCAM은 뉴론-뉴론 및 신경-근육 상호작용에 있어서 중요하고 [참조: Cunningham, B.A., et al., Science 236:799-806(1987)], 반면에 MAG는 수초발생중 뉴론-핍지신경교 및 핍지신경교-핍지신경교 사이의 상호작용에 중요한 것이다[참조: Poltorak, M., et al., J.Cell Biol. 105:1893-1899(1987)]. NCAM 및 MAG의 세포 표면 발현은 각각 신경계 형성중 및 수초발생중에 발생학적으로 조절되며, 염증내에서 ICAM-1의 조절된 유도과 유사하다[참조: Springer T.A., et al., Ann. Rev. Immunol. 5:223-252(1987)]. ICAM-1, NCAM[참조: Cunningham, B.A., et al., Science 236:799-806(1987)] 및 MAG[참조: Salzer, J.L., et al., J. Cell Biol. 104:957-965(1987)]은 전체적인 구조에서 유사할 뿐 아니라 상동성인데, 이는 NCAM에서 비록 몇가지 부가적인 비-Ig-유사 서열이 마지막 C2 도메인과 트랜스막 도메인 사이에 존재하지만 각각은 N-말단 세포외 영역을 형성하는 5 C2 도메인으로 구성된 완전한 막 당단백질이기 때문이다. ICAM-1은 21%의 동일성을 갖는 MAG와 트랜스막 및 세포질 도메인을 포함한 그 전체의 길이에 걸쳐 정렬한다: 같은 %의 동일성은 ICAM-1 및 NCAM-1의 5 도메인과 비교할 때 알 수 있다. ICAM-1의 cDNA 서열은 제1도에 나타나 있다. 도메인 비교에 따른 도메인은, ICAM-1과 NCAM 분자내에 있는 도메인 사이의 상동성 수준(각각  $x \pm s.d.$  21 $\pm$ 2.8%

및  $18.6 \pm 3.8\%$ )이 ICAM-1 도메인을 NCAM 및 MAG 도메인과 비교한 상동성 수준(각각  $20.4 \pm 3.7$  및  $21.9 \pm 2.7$ )과 같음을 보여주고 있다. 비록, NCAM[참조: Cunningham, B.A., et al., Science 236: 799-806(1987); Barthels, D., et al., EMBO J. 6:907-914(1987)] 및 MAG[참조: Lai, C., et al., Proc. Natl. Acad. Sci(USA) 84:4377-4341(1987)]의 C-말단 영역중에 또다른 스플라이싱의 증거가 있긴 하지만, 내피 또는 HL-60 ICAM-1 클론의 서열화에서 또는 다양한 세포 유형에서 ICAM-1 단백질 골격 및 전구체의 연구로부터는 이에 대한 증거를 전혀 밝혀내지 못했다[참조: Dustin, M.L., et al., J. Immunol. 137:245-254(1986)].

## [실시예 2]

### [절단된 ICAM-1 유도체의 유전적 작제 및 발현]

천연의 상태에서, ICAM-1은 5 면역글로불린-유사 도메인, 트랜스막 도메인 및 세포질 도메인의 세포의 영역을 포함하는 세포막-결합 단백질이다. 트랜스막 도메인 및/또는 세포질 도메인이 결실된 ICAM-1의 작용성 유도체를 작제하는 것이 바람직하며, 이로써 가용성인 분비된 형태의 ICAM-1이 생성될 수 있다. 이들 작용성 유도체는 ICAM-1 유전자의 올리고뉴클레오타이드-지시된 돌연변이유발에 의해 작제되고, 이어 돌연변이 유전자를 형질감염시킨 후 원숭이 세포내에서 발현시킨다.

아미노산 치환 및/또는 절단된 유도체를 생성하는 ICAM-1 유전자에서 돌연변이체는 쿤켈, 티(Kunkel, T.)의 방법에 의해 생성된다[참조: Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 82: 488-492(1985)]. 상기에서와 같이 제조된 ICAM-1 cDNA를 엔도뉴클레아제 Sal1 및 Kpn1으로 분해하고, 수득된 1.8kb DNA 단편을 플라스미드 벡터 CD8에 아클론시킨다[참조: Seed, B. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 84: 3365-3369(1987)]. 이. 콜라이(E. coli)(BW 313/P3)의 dut, ung 균주를 이 작제물로 형질전환시켜 pCD1. 8C로 명명한다. 헬퍼 파지 R408(스트라타겐)으로 감염시켜 일본체의 우라실-함유 주형을 형질전환체로부터 분리한다. 돌연변이체 ICAM-1 cDNA들은, 잘못 짝지워진 염기를 함유한 올리고뉴클레오타이드로 이차 본쇄 합성을 개시하고, 이어서 수득된 이중이본쇄로 ung 숙주(MC1061/P3)을 형질전환시켜 생성된다. 돌연변이체는, 돌연변이체 올리고뉴클레오타이드에 의해 도입된 새롭게 생성된 엔도뉴클레아제 제한 부위를 스크리닝함으로써 분리할 수 있다. 돌연변이체 ICAM-1 단백질은, 표준 DEAE-텍스트란 방법을 이용하여 진핵성 발현 벡터 CDM8중에 돌연변이체 DNA를 갖는 Cos-7 세포를 형질감염시킴으로써 발현시킨다[참조: Selden, R.F. et al., In: Current Protocols in Molecular Biology(Ausubel, F.M. et al., eds.) pages 9.2.1-9.2.6(1987)].

트랜스막 및 세포질 도메인은 결실되어 있으나, 모든 5가지 면역글로불린-유사 도메인을 포함한 세포외 영역을 함유하는 ICAM-1의 절단된 작용성 유도체를 제조한다. 각각, 452 및 453번에 위치한 아미노산 티로신(Y) 및 글루탐산(E)에 대한 코돈을 페닐알라닌(F) 및 해독 종결 코돈(TAG)으로 전환시키기 위해서 30bp 돌연변이체 올리고뉴클레오타이드(CTC TCC CCC CGG TTC TAG ATT GTC ATC ATC)가 사용된다. 이 돌연변이체는 그의 독특한 XbaI 제한 부위에 의해 분리되고, YE/F, TAG로 명명된다.

돌연변이체 단백질을 발현시키기 위해 COS 세포들을 3개의 돌연변이체 아클론(#2, #7 및 #8)으로 형질감염시켰다. 이 3개 돌연변이체 아클론을 사용한 형질감염 3일후, 배양 상층액 및 세포 용해물을 항-ICAM-1 모노클로날 항체 RR1/1 및 SDS-PAGE를 사용하여 면역침전에 의해 분석한다. ICAM-1은 돌연변이체 아클론 #2, 및 #8로 형질감염된 세포의 배양 상층액에서는 침전됐으나, 이들 세포의 용해물에서는 침전되지 않았다. 배양 상층액에서 발견된 ICAM-1의 분자량은 ICAM-1의 막 형태와 비교하여 약 6kd가 감소하였는데, 이는 돌연변이체 DNA로부터 예견된 크기와 일치한다. 결국, ICAM-1의 작용성 유도체는 가용성 단백질로서 분비된 것이다. 그와 달리, ICAM-1은 천연 ICAM-1으로 형질감염된 세포의 대조군 배양 상층액으로부터 면역침전되지 않았는데, 이는 ICAM-1의 막 형태가 Cos 세포들로부터 방출되지 않았음을 입증하는 것이다. 게다가, 음성 대조군 모크-형질감염된 세포(mock-transfected cells)로부터의 배양 상층액이나 세포 용해물로부터는 어떤 ICAM-1도 면역침전되지 않았다.

형질감염된 세포로부터 분비된 절단된 ICAM-1은 ICAM-1 특이성 항체(R6-5-D6)를 사용하여 면역침화성 크로마토그래피로 정제하고, 세포 결합 분석에서 작용 활성도를 시험한다. 세정제 옥탈글루코사이드의 존재하에 정제한후, 천연 ICAM-1 또는 절단된, 분비된 형태를 함유하는 제제들을 0.25% 옥탈글루코사이드의 최종 농도(세정제의 임계 마이셀 농도 이하의 농도)까지 희석시켰다(세정제의 임계 마이셀 농도 이하의 농도). 이들 ICAM-1 제제들을, 고정-상(Solid-Phase)에 결합된 ICAM-1을 제조하기 위해, 플라스틱 96-웰 플레이트(Nunc) 표면에 결합시킨다. 미결합된 물질을 세척시켜 버린후, 표면에 LFA-1을 지닌 약 75-80% 및 83-88%의 SKW-3 세포들을 각각 천연 ICAM-1과 절단된 형태의 ICAM-1에 특이적으로 결합시킨다. 이런 데이터는, 분비되고 절단된 가용성 ICAM-1 작용성 유도체가 면역학적 반응성과 천연 ICAM-1의 특성인 ICAM-1 의존성 점착을 매개하는 능력 모두를 갖고 있음을 입증하는 것이다.

세포질 도메인만이 결실된 ICAM-1의 작용성 유도체는 유사한 방법으로 제조한다. 아미노산 476 (Y)에 대한 코돈을 TAG 해독 종결 코돈으로 변형시키기 위해 25bp의 올리고뉴클레오타이드 (TC AGC ACG TAC CTC TAG AAC CGC CA)를 사용한다. 이 돌연변이체를 Y/TAG로 명명한다. 돌연변이체로 형질감염시킨 Cos 세포의 면역침전 분석 및 SDS-PAGE에 의해, 천연 ICAM-1보다 분자량이 약 3kd 적은 막에 결합된 형태의 ICAM-1이 검출됐다. 돌연변이체-형질감염된 Cos 세포의 간접적인 면역형광은 LPS-자극된 사람 내피 세포상에서 발현된 천연 ICAM-1과 유사한 반점 염색 양상을 입증해 보인다. 최종적으로, 돌연변이체 DNA로 형질감염된 세포는 천연 ICAM-1 DNA로 형질감염된 Cos 세포들과 유사한 방법으로 플라스틱 표면상에서 정제된 LFA-1에 특이적으로 결합한다(표 2).

## [표 2]

LFA-1에 결합하는 ICAM-1의 작용성 유도제 또는 ICAM-1을 발현시키는 세포의 능력

| 형질감염                | 하기와 같은 존재하에 LFA-1에 결합하는 ICAM-1을 발현시키는 세포의 % |       |
|---------------------|---------------------------------------------|-------|
|                     | 항체 없음                                       | RR1/1 |
| 모크                  | 0                                           | 0     |
| 천연 ICAM-1           | 20                                          | 0     |
| $\gamma^{476}$ /TAG | 20                                          | 0     |

## [실시예 3]

[생물학적 반감기 친화성 및 제거력(Clearance ability)이 증가된 ICAM-1의 다량체형]

ICAM-1의 도메인 1 및 2가 면역글로불린 중쇄의 힌지(hinge) 영역에 부착되어 있는 키메라 분자를 작제한다. 바람직한 작제물은, 힌지 영역에 대해 바로 N-말단인 면역글로불린 중쇄 유전자의 단편에 ICAM-1 도메인 2의 C-말단을 부착시켜, 힌지 부분에 의해 부여된 절편 유연성을 가능케 한다. 따라서, ICAM-1 도메인 1 및 2는 항체의 Fab 단편을 대체한다. IgG 부류의 중쇄에 대한 부착 및 동물 세포의 생성은 키메라 분자를 생성한다. IgA 또는 IgM으로부터 유도된 중쇄를 함유하는 분자의 생성은 2 내지 12개의 ICAM-1 분자를 함유하는 고도의 다량체 분자를 생성한다. ICAM-1중쇄 키메라 분자를 생성하는 동물 세포 중에서 J-쇄 유전자의 공-발현은 적절히 조합된 IgA 및 IgM 다량체가 4 내지 6개의 ICAM-1 분자를 함유하는 IgA 분자 및 IgM의 경우 약 10개의 ICAM-1 분자를 함유하는 분자를 현저히 생성시킨다. 이들 키메라 분자들은 여러 가지 이점을 가질 수 있다. 첫째, Ig 분자들은 순환시 오래 지속되도록 작제되는데, 이것은 생물학적 반감기를 증가시키게 될 것이다.

또한, 이들 조작된 분자들의 다량체형 성질은, 치료학적 관계에 따라서, 이들이 리노바이러스 뿐만 아니라 세포 표면 LFA-1과 대단히 높은 친화력으로 반응하게 하며, 결국은 유효한 투여량을 제공하기 위해 필요로 하는 재조합 단백질의 양을 크게 감소시킨다. IgA 및 IgM은 코에서와 같이 점막 부위의 분비물 내에 통상 존재하는 고도로 글리코실화된 분자다. 이들의 높은 친수성은 점막 내외에서 결합하는 세균과 바이러스가 세포에 부착하는 것 및 상피 세포 막 배리어를 횡단해 가는 것을 방해한다. 따라서, 이들의 치료학적 효능이 증가될 수 있다. IgM 및 특히 IgA는 점막 환경하에서 안정하며, ICAM-1 작제물의 안정성을 증가시킬 것으로 보인다. 이러한 ICAM-1 작용성 유도제가 혈류에 투여된다면, 이것 역시 생물학적 반감기를 증가시킬 것이다. IgA는 보체를 고정시키지 않으며, 따라서 보체를 고정시키는 것이 해로운 경우에 이상적일 것이다. IgG H 쇠 키메라가 필요할 경우, 보체에 부착하는데 관련된 영역 뿐만 아니라 Fc 수용체와의 상호작용에 관련된 영역을 돌연변이시킬 수 있다.

ICAM-1의 도메인, 1, 1-2, 1-3, 1-4, 또는 1-5가 힌지 영역 및 IgA의 CH2 및 CH3 도메인과 결합한 키메라 분자는 코에 있어서 바이러스 억제제로서 사용하기에 특히 적절하다. 3가지 IgH 쇠 서열이 기술된 바 있다[참조: Tsuzukida 등에 의해 고찰, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 76: 1104-1108(1979)], 이 참고 문헌은 본원에 참고로 인용됨]. ICAM-1 cDNA(상기에서 지적된 3' 절단 영역)와 IgA H 쇠를 연결시키는 표준 방법이 사용될 수 있다. IgA H 쇠는 잔기 221-241에 또는 그 사이에 결합될 수 있으며[참조: Tsuzukida 등의 넘버링 시스템, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 76: 1104-1108(1979)], 이에 의해 IgA H의 C-말단으로 이 영역중에서 시작되는 IgA H의 영역이 키메라의 C-말단 부분과 결합할 수 있다. ICAM-1은 FAB 단편과 유사할 것이다; 이 작제물에는 IgA의 VH와 CH1이 존재하지 않기 때문에 어떤 L 쇠도 필요하지 않을 것이다.

IgA는 점막 환경에 특수화되어 있으며[Underdown et al., Ann. Rev. Immunol. 4: 389-417(1986)], ICAM-1 키메라의 안전성을 향상시킨다. 또한, 유코 다당류에 결합하는 이런 분자의 능력은 리노바이러스의 제거 또는 비내의 상태 보존을 향상시킬 수 있다.

더욱이, IgA C 영역은 중합화된다. IgA 단량체는 2개의 H 및 L 쇠를 함유하며; ICAM-1 IgA H 쇠 키메라 단량체는 2개의 ICAM-1 H 쇠를 함유하고 있는데, 이것은 IgA 힌지 영역에 디설파이드 뿐만 아니라 CH2와 CH3간의 비-공유 상호작용에 의해 안정화될 수 있다. 이 단량체 단위는 IgA 아미노산 위치 471에 있는 시스테인 잔기에 의해 이량체 및 삼량체로 추가로 조립될 수 있는데, 이 시스테인 잔기는 단량체를 서로 연결시키거나 J 쇠에 연결시킬 수 있다. 이런 작제물은, 부가적인 특성을 제공하고 안정성을 변형시키기 위해서 J 쇠 작제물과의 공-형질감염 없이 사용될 수 있다. J 쇠는 이량체형 또는 삼량체형 IgA를 수득하는데 필요하진 않다.

키메라는 리노바이러스와 다점 상호반응을 위한 다량체 ICAM-1의 이점을 가지기 때문에, 친화성을 높이고 이에 의해 중화에 필요한 ICAM-1의 농도를 10M 내지 10M까지 낮출 수 있다. IgA의 힌지 영역은 리노바이러스와 결합하기 위한 적절한 배향을 부여하며, 0-연결된 글리코실화 때문에 프로테아제 내성이 있다. IgA1, IgA2 및 IgA2, A2m(1) 및 A2m(2)의 대립형질 변이체는 힌지와 CH도메인의 서열중에 차이가 있으며, 프로테아제에 대한 감수성에도 차이가 있다[참조: Flanagan, J. G. et al., Cell 36: 681-688(1984)], 이 문헌은 본원에 참조로 인용됨].

## [실시예 4]

[ICAM-1 개략 구조 및 LFA-1 및 리노바이러스 결합부위: 세포 정착 수용체의 바이러스 의태]

ICAM-1 및 2차 LFA-1 카운터-수용체, ICAM-2는 면역 글로불린 (Ig) 상과 (Superfamily)의 아과(Subfamily)를 구성한다[참조: Stanuton, D. E., et al., Cell 52: 925-933(1988), 이 문헌은 본원에 참고로 인용됨]. ICAM-1은 5개의 Ig-유사 C 도메인을 가지고 있는 반면 ICAM-2는 2개를 지니고 있는데, 이는 ICAM-1의 아미노말단 도메인과 가장 상동성이다. 다양한 세포 유형에서 발현된 ICAM-1 및 ICAM-2는 면역 반응에서 유도 및 효능기 작용을 포함하는 다양한 백혈구 정착 의존(ICAM-1 및 ICAM-2) 발현은 사이토카인에 의해 고도로 유도되며, 그에 따라 LFA-1/ICAM-1 정착 시스템은 염증 발생시 백혈구의 이동과 위치 설정을 안내할 수가 있다[참조: Rothlein, R. J. Immunol. 137: 1270-1274(1986); Marlin, S.D. et al, Cell 51: 813-819(1987); Kishimoto, T.K. et al., Adv. Immunol. 46: 149-182(1989); Dustin, M.L. et al., Immunol. Today 9: 213-215(1988), 이 모든 문헌은 본원에 참고로 인용됨].

LFA-1(CD11a/CD18)은, 두가지 다른 백혈구 인테그린 Mac-1(CR3: CD11b/CD18) 및 p150/95(CD11c/CD18)[참조: Hynes, R. O., Cell 48: 549-554(1987)]과 가장 밀접하게 연관된 인테그린 부류의 한 구성원이다. 호중구 정착을 지원할 뿐만 아니라 Mac-1은 iC3b, 레이슈마니아 gp63 및 피르리노겐을 포함하는 여러 가지 리간드를 결합시키는 것으로 입증됐다[참조: Ruoslahti, E., et al., Cell 44: 517-518(1986); Hynes, R. O., Cell 48: 549-554(1987)]. 이들 리간드에 대한 부착은 RGD 또는 KXXDS 서열을 함유하는 펩타이드와 경쟁할 수 있다[참조: Marlin, S.D. et al., Cell 51: 813-819(1987)]. 어떤 ICAM도 RGD 또는 KXXDS 서열을 가지고 있지 않다. 따라서, ICAM-1 및 LFA-1 사이의 상호작용은 RGD 펩타이드와 경쟁하지 않는다는 것은 일정하다. 결국, ICAM-1 상에서 LFA-1과 접촉하는 부위는 다른 많은 인테그린-리간드 상호작용과 유사하여 분명치 않다.

최근에 ICAM-1은 리노바이러스의 주요 그룹에 의해 수용체로서 전환되는 것이 입증되었다[참조: Greve, J.M. et al., Cell 56: 839-847(1989); Staunton, D.E. et al., Cell 56: 849-853(1989); Tomassini, J.E. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86: 4907-4911(1989); 이들 참고 문헌은 본원에 참고로 인용됨]. 작고, RNA를 함유하며, 단백질로 봉입된 피코나바이러스과의 구성원인 리노바이러스는 일반적인 감기의 40-50%를 유발한다[참조: Rueckert, R.R., In: Fields Virology, Fields, B.N. et al., (eds.), Raven Press, NY, (1985) pp 705-738; Sperber, S.J. et al. Antimicrob. Agents Chemo. 32: 409-419(1988); 이들은 본원에 참조로 인용됨]. 100개 이상의 면역학적 비-교차 반응성 리노바이러스가 정의된 바 있으며, 이중 90%가 ICAM-1과 결합한다.

X-레이 결정학에 의해 리노바이러스는, 직경이 30nm(나노미터)이고 각 캡시드 단백질의 60개 카피(Copy)를 갖는 정 20면체의 대칭성을 가지며[참조: Rossmann, M.G et al., Nature 317: 145-153(1985)], 이에 따라 ICAM-1에 대해 60개의 잠재적인 결합 부위를 갖는 것으로 밝혀졌다. 아미노산 치환 돌연변이체 및 항 바이러스제와의 결합에 의해 유도된 구조적 변화에 근거하여, 축의 5-배 길이에 해당하는 캡시드내에서 깊이 가라 앉은 영역 또는 캐년(canyon)이 확인된 바 있다. [참조: Rossmann, M.G et al., Nature 317: 145-153(1985); Colonno, R.J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85: 5449-5453(1988); Rossmann, M.G. et al., Ann. Rev. Biochem. 58: 533-573(1989)]. 캐년의 기저에 있는 잔기들은 ICAM-1 결합 기능과 관련되어 있다.

단일 ICAM-1 Ig-유사 도메인은 캐년 바닥에서 HRV 잔기들과 결합하는 개략적인 정확한 크기(dimension)일 것으로 예측된다[참조: Staunton, D.E. et al., Cell 56: 849-853(1989)]; 그러나, 항체 Fab 단편은 제외되는 것으로 예측된다[참조: Rossmann, M.G. et al., Nature 317: 145-153(1985)]. Fab 단편의 항체 결합부위는 캐년 바닥(floor)과 접촉하기에는 지나치게 크므로, 수용체 특이성은 캐년 바닥에 있는 상대적으로 보존된 잔기들에 의해 유지되고 있는 반면 캐년 가장자리에 있는 잔기들의 돌연변이체는 캐년 가설로 알려진 새로운 혈청형 및 면역 감시망의 침입을 허용하게 된다[참조: Rossmann, M.G. et al., Nature 317: 145-153(1985); Colonno, R.J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85: 5449-5453(1988); Rossmann, M.G. et al., Ann. Rev. Biochem. 58: 533-573(1989)].

ICAM-1의 전체적인 크기와 모양은 ICAM-1의 Ig 도메인이 어떻게 정렬해 있는 지를 이해하는데 중요하다. 그러므로, Ig 상과 구성원의 X-선 결정 구조는 쌍을 이룬 Ig 도메인을 갖는 면역글로불린 HLV 항원에 대해서만 유용하다; 그러나 하나의 도메인을 함유하고 있는 Thy-1에 의해 입증된 바와 같이, 도메인은 쌍을 이루지 않을 수도 있다.

LFA-1에 결합하는 것을 차단하는 3개의 비-가교결합 차단 ICAM-1 MAb(RR1/1, R6.5 및 LB-2)들을 HRV 결합을 차단하는 반면, 다른것(CL203)들은 LFA-1 또는 HRV 결합 어느것도 차단하지 않는다[참조: Makgoba, M.W. et al., In: Immunobiology of HLA Volume II: Immunogenetics and Histocompatibility, B. Dupont, ed., New York: Springer-Verlag, pp. 577-580(1989); Maio, M., J. Immunol. 143: 181-188(1989); Staunton, D.E. et al., Cell 56: 849-853(1989), 이 문헌은 본원에 참고로 인용됨]. 이런 발견은 LFA-1 및 HRV가 ICAM-1상의 중첩 영역에 결합할 수 있음을 보여주고 있다.

ICAM-1외에, 세포 정착 분자 CD4 및 보체 수용체 CR2는 각각 HIV 및 EBV 바이러스에 의해 바이러스 수용체로서 전환되는 것으로 밝혀졌다[참조: Maddon, P.J., Cell 47: 333-348(1986); Fingerth, J.D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 4510-4514(1984), 이것은 본원에 참조로 인용됨]. 또한 ICAM-1과 유사한 Ig 도메인 구조를 갖는, 세포 정착의 기능을 나타내는 분자는 폴리오 바이러스 수용체이다[참조: Mendelsohn, C.L. et al., Cell 56: 855-865(1989)], 이것은, 세포 정착 및 바이러스 정착이 근본적으로 대단히 유사하기 때문에, 보다 동시에 일어날 수 있다. 따라서, 바이러스에 의해 결합되도록 적용된 세포 정착 분자의 영역은 세포 정착 수용체에 결합하도록 선택된 영역과 유사함을 알 수 있다.

LFA-1 및 HRV에 결합 부위는 부위-지시된 돌연변이유발에 의해 결정된다. ICAM-1상의 영역은 부위-지시된 돌연변이유발에 의한 아미노산 치환과 결실 도메인에 의해 한정된다. LFA-1에 대한 ICAM-1상의 결합 부위의 특성화는, Ig와 인테그린 상과 구성원들 사이의 상호작용을 통찰할 수 있게 해준다.

## [실시에 5]

## [ICAM-1 돌연변이체의 생성]

## [올리고뉴클레오타이드-지시된 돌연변이유발]

1.8kb SalI-KpnI 단편중 ICAM-1 cDNA의 암호화 영역이 발현 벡터 CDMB로 아클론되었다[참조: Seed, B. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 84: 3365-3369(1987)]. 쿤켈, 티(Kunkel, T.)[참조: Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 82: 488-492(1985)]의 방법 및 스타운튼 디 등[참조: Staunton, D.E. et al., Cell 52: 925-933(1988)]의 변형에 근거하여, 이 작제물(pCD1.8)는 올리고뉴클레오타이드-지시된 돌연변이유발에 이용되는 우라실을 함유한 일본쇄 주형을 생성시키기 위해 이용된다.

간단하게, 이. 콜라이 균주 XS127은 pCD1.8을 사용하여 형질전환시킨다. 하나의 콜리니를, 포화에 달할 때까지, 13 $\mu$ g/ml 암피실린 및 8 $\mu$ g/ml 테트라사이클린을 함유한 1ml의 루리아 브로쓰(Luria Broth; LB) 배지(Difco)속에서 성장시킨다. 배양물 100 $\mu$ l를 감염 다중도(Multiplicity of Infection; MOI) 10에서 R408 헬퍼 파지(Stratagene)로 감염시키고, 암파실린과 테트라사이클린을 함유한 10ml의 LB 배지를 37 $^{\circ}$ C에서 16시간 동안 배양한 배양물에 가한다. 이어서, 10,000rpm으로 1분간 원심분리시키고 상층액 0.22 $\mu$ m 여과액(파지 현탁액)을 사용하여 E. coli BW 313/p3를 감염시킨 다음 암파실린과 테트라사이클린으로 보충된 LB 아가(Difco) 플레이트에 플레이팅한다. 콜로니를 채취하여 암파실린과 테트라사이클린을 함유한 1ml의 LB 배지에서 포화 상태로 성장시켜 MOI 10에서 헬퍼 파지로 감염시킨다. 배양 용적을 250ml까지 증가시키고, 세포들을 하루밤 동안 배양한다. 표준 파지 추출에 의해 일본쇄 DNA를 분리한다. 돌연변이체 올리고뉴클레오타이드를 인산화시키고, pCD1.8 주형과 함께 2번째 본쇄 합성 반응에 이용한다[참조: Staunton, D.E. et al., Cell 52: 925-933(1988)].

## [형질감염]

COS 세포를 10cm 조직 배양 플레이트에 접종하면 16 내지 24시간내에 50%가 유착하게 된다. 이어서, COS 세포들을 TBS로 한번 더 세척한후 10% Nu 혈청(Collaborative) 5 $\mu$ g/ml 클로로퀸, 3 $\mu$ g의 돌연변이체 플라스미드 및 200 $\mu$ g/ml DEAE-덱스트란 셀레이트를 함유한 4ml RPMI와 함께 4시간 동안 배양한다. 10% DMSO/PBS로 세포를 세척하고, 이어서 PBS로 처리한 다음 배양 배지에서 16시간 동안 배양한다. 배양 배지를 신선한 배지로 대체하고, 형질감염 48시간후에 COS 세포들을 트립신/EDTA(Gibco)으로 처리하여 현탁시키고, HRV 결합을 위해 2, 10cm 플레이트 뿐만 아니라 24웰 조직 배양 플레이트로 나눈다. 72시간째에 5mM EDTA/HBSS를 사용하여 10cm 플레이트로부터 세포들을 수확하고, LFA-1로 피복된 플레이트 라스틱에 정착시키고 면역형광을 처리한다.

## [LFA-1 및 HRV 결합]

TS2/4 LFA-1 mAb 세포파소스상에서 면역친화성 크로마토그래프에 의해 SKW-3 용해물로부터 LFA-1을 정제하고, 2mM MgCl 및 1% 옥틸글루코사이드의 존재하에 pH 11.5에서 용출시킨다. LFA-1(6-cm 플레이트당 200 $\mu$ l당 10 $\mu$ g)은, 2mM MgCl를 함유하는 PBS(인산염으로 완충시킨 생리식염수)에서 옥틸글루코사이드를 0.1%까지 희석시키고 4 $^{\circ}$ C에서 하루밤 배양함으로써, 박테리아용 페트리 디쉬에 결합시킨다. 플레이트를 1% BSA(소혈청 알부민)로 차단시키고, 2mM MgCl, 0.2% BSA, 0.025% 아지드 및 50 $\mu$ g/ml 겐타마이신을 함유한 PBS에 저장한다.

5% FCS(태아 송아지 혈청), 2mM MgCl, 0.025% 아지드(완충액)를 함유한 PBS중에서 Cr-표지된 COS 세포들을 LFA-1 피복된 미세역가 플레이트내에서 5 $\mu$ g/ml RR1/1 및 R6.5의 존재 또는 부재하에서 25 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 배양한다. 비-점착(성) 세포들은 완충액으로 3회 세척하여 제거한다. 점착(성) 세포들은 10mM이 될 때까지 EDTA를 가하여 용출시키고,  $\gamma$ -계수한다.

HRV 결합 연구를 위해, COS 세포들은 24웰 플레이트에 재접종하였다. 하루가 지나서, 유착 단층을 RPMI 1640/10mM MgCl/25mM 헤페스 pH 7.3(리노바이러스-14 완충액) 1ml로 두번 세척한다. 앞서 기술한 바와 같이, 형질감염시킨 COS 세포들을 LFA-1 피복된 플라스틱에 결합시키기 위해 Cr로 표지시켰다[참조: Staunton, D.E. et al., Nature 339: 61-64(1989)], ICAM-1 MAb RR1/1[참조: Rothlein, R., et al., J. Immunol. 137:1270-1274(1986)], R6.5[참조: Routhlein, R., et al., J. Immunol. 141: 1665-1669(1988)], LB-1[참조: Clark, E.A., et al., Hum. Immunol. 16:100-113(1986)] 및 CL203[참조: Maio, M., J. Immunol. 143: 181-188(1989)], 모든 문헌은 본원에 참고로 인용됨]을 이용하여 면역점전과 간접 면역형광을 수행한다.

각각의 웰(Well)에 100 $\mu$ l의 HRV-완충액중의, [S]-Met 표지된 HRV 14[참조: Sherry, B. et al., J. Virol. 57: 246-257(1986)], 이 문헌은 본원에 참고로 인용됨], 15-25,000cpm(약 107 PFU)을 가한다. 수평 회전(100rpm)하에, 35 $^{\circ}$ C, 5% CO 대기중에서 1시간 안에 결합이 발생한다. 미결합 [S] HRV14는 흡인하고, 150ml의 HRV 완충액으로 COS 세포들을 부드럽게 세척한 다음, 섬광 계수를 하기 위해 PBS중의 1% SDS에 용해시킨다.

ICAM-1 돌연변이체에 대한 LFA-1과 HRV-14의 결합은 모크 형질감염시킨 세포와의 결합에 대해 보정하고, CL203 mAb로 염색한 COS 세포들의 백분율 및 야생형(Wild type)을 사용하여 수득된 백분율을 위해 표준화시켰다:

$$\text{결합백분율} = \frac{((\text{돌연변이체 결합\%} - \text{모크 결합\%}) / \text{돌연변이체 CL203 균주\%}) \times 100}{(\text{야생형 결합\%} - \text{모크 결합\%}) / \text{야생형 CL203 염색\%}}$$

특이적 선형 형광 강도(Specific Linear Fluorescence Intensity: SLFI)를 이용하여, RR1, R6.5 및 LB-2

mAb의 결합은 CL203 mAb의 결합으로 표준화시킨다:

$$\%CL203 = (mAb\ SLFI) \times 100 / CL203\ mAb\ SLFI$$

LFA-1에 결합한 COS 세포들을 발현시키는 야생형 ICAM-1의 백분율은 11 내지 63%(평균=33%)로 다양하다; 모크-형질감염된 COS 세포들의 결합 백분율은 0 내지 1%이다. 야생형 ICAM-1을 발현시키는 COS 세포에 결합된 [<sup>35</sup>S] 메티오닌-표지된 HRV-14의 백분율은 6 내지 43%로 다양하고(평균 21%); 모크-형질감염시킨 COS 세포의 결합 백분율은 0 내지 4%로 다양하다.

ICAM-1의 피복된 플라스틱에 대한 [<sup>35</sup>S] HRV14 결합은 HRV 완충액을 변형시켜 사용한 것을 제외하고 스타운튼(Staunton) 등[참조: Staunton, D.E. et al., Cell 56: 849-853(1989), 이 문헌은 본원에 참고로 인용됨]에 기술된 바와 같은 방법대로 실시했다. 35°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 회전시키면서 1시간 동안 배양한다.

RR1/1, R6.5, LB-2 또는 CL 203과 같은 항-ICAM-1 항체가 동정된 바 있다. 만일 이들 항체들이 ICAM-1 작용을 억제할 수 있다면, 또한 ICAM-1 작용에 중요한 ICAM-1 분자내의 특정한 부위에 이들이 결합할 수 있어야 한다. 따라서, 상기 기술된 ICAM-1의 결실 돌연변이체를 제조하고, 항-ICAM-1 항체가 결실 돌연변이체에 결합할 수 있는 정도를 결정함으로써 결실된 도메인이 기능을 나타내는데 중요한지의 여부를 측정할 수 있다.

[실시예 6]

[전자 현미경에 의한 ICAM-1의 가시화]

ICAM-1 분자는 전자 현미경에 의해 조사되었다. 전자 현미경으로 ICAM-1 분자를 가시화하기 위해, ICAM-1 돌연변이체 작제물 pCDsD1-5를 사용하여 형질감염시킨 COS 세포의 배양 배지로부터 모두 다섯 개의 세포와 Ig-유사 도메인(제4도)을 갖는 ICAM-1의 가용성 단편을 정제한다.

ICAM-1은 다음의 방법에 의해 COS 세포로부터 제조한다. 50%의 유착 상태(confluent)에서 COS 세포들을, 약 0(모크) 내지 4mg의 플라스미드/10cm 플레이트를 이용한 DEAE-덱스트란 방법에 의해[참조: Kingston, R.E., In Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates, pp. 9.0.1-9.9.6(1987), 이 문헌은 본원에 참고로 인용됨] 형질감염시켰다.

Marlin과 Springer[참조: Marlin, S.D. et al., Cell 51: 813-819(1987)]의 방법을 아래와 같이 약간 변형시켜 전술한 바와 같이 pCDsD1-5로 형질감염시킨 COS 세포들을 상층(청)액으로부터 분리된 ICAM-1을 정제한다. 상층액은 형질감염후 4 내지 12일 사이에 수거한다(여과하여 0.5ml/분으로 RR1/1-세파로스(5 ml, 5µg/ml)에 통과시킨 200ng/ml sICAM-1 0.22µ). 이 칼럼을 각각 pH 10 및 pH 12.5에서 50mM 트리에탄올아민 HCl, 0.15M NaCl로 세척 및 용출시키고, 분획물을 즉시 중화시킨다.

가용성 ICAM을 0.2M 중탄산암모늄, 30%의 글리세롤로 투석시키고, 회전 투영(rotary shadowing) 처리하여 전자 현미경용으로 제조한다[참조: Fowler, W.E. et al., J. Molec. Biol. 134: 241-249(1979)]. 다른 한편으로, 가용성 ICAM을 0.2M 중 탄산암모늄중의 15-40% 글리세롤 구배를 통해 침전시키고, ICAM 분획물을 회전 투영법에 직접 사용한다. 침강 계수는 다른 구배중의 표준 단백질과 비교하여 평가한다(키탈라제의 경우는 11.3S에서부터 소 혈청 알부민인 경우는 4.6S부터 추정된 곡선). ICAM에 대해 계산된 3.5S는 ±0.5S내에서 정확해야만 한다. 길이 측정은, 금속 껍질의 계산된 두께를 양단으로부터 1nm씩 뺀, 25만배로 확대한 프리트로부터 측정한다[참조: Fowler, W.E. et al., J. Molec. Biol. 134: 241-249(1979)].

ICAM 분자들은, 이들을 0.2M 중탄산암모늄중의 글리세롤 구배를 통한 침전에 의해 분석한다. 구배의 상단 근처에 잔존하는 ICAM 분자들은 약 3.5S로 추정되는 침강 계수 위치에 존재한다. 92kD의 분자 질량에 있어서, 이는 고도로 신장된 분자를 지칭하는  $f/f_{min}=2.0$ 의 값을 나타낸다[참조: Erickson, H.P., Biophys. J. 37: 96a(1982)].

회전 투영된 ICAM 분자는 가느다란 막대 모양으로 나타나는데, 이는 직선이거나 단일 굴곡부를 갖는다. 간혹 일정한 굴곡 또는 두 개의 굴곡부를 갖는 분자를 볼 수 있는데, 이는 하나의 힌지점을 갖는 골은 막대 구조임을 암시한다. 비록 굴곡부의 각도는 어느 정도 다양한 편이지만, 확실히 굴곡된 분자의 대부분에 있어서 각도는 90° 에 근접한다.

직선상 분자에 대한 길이 측정값은  $16.6 \pm 0.24\text{nm}$ (평균±표준편차, n=25)이었다. 굴곡된 분자에 있어서, 긴 팔은  $11.8 \pm 0.12\text{nm}$ 이고, 짧은 팔은  $6.9 \pm 0.15\text{nm}$ (n=21)이었다. 굴곡된 분자의 총 길이 18.7nm는 직선상 분자에 대해 측정된 길이 보다 약간 길었다. 직선상 분자의 모집단은 짧은 팔이 관찰자를 향해 굴곡되어 있는 일부를 함유할 수 있는데, 이는 완전한 프로파일을 증가하는 것이다. 따라서, 굴곡된 분자들은 길이 측정에 필요한 보다 신빙성있는 집단을 제공한다. 막대형은 2 내지 3nm 정도의 균일한 직경을 갖는다.

ICAM 분자는,  $4 \times 2.5 \times 2\text{nm}$ 의 부피를 갖는 IgG-유사 도메인의 5개 반복체를 함유하고 있음이 밝혀졌다. ICAM 분자의 총 길이 18.7nm는 IgG 반복체당 3.7nm임을 나타내고 있으며, 이는 도메인이 막대(rod)의 축에 대해 그들의 장축을 작은 각도 범위내에서 정렬시키고 있음을 시사한다. 2개 또는 4개의 IgG-유사 도메인이 서로 쌍을 이루고 있는 모델에서는 너무 짧다. 따라서, 굴곡부는 막대를 따라 약 2/5 지점에 존재하며, 이것은 굴곡부가 도메인 2와 3사이 또는 도메인 3과 4사이에 존재하고 막대를 긴 팔과 짧은 팔로 나누고 있음을 나타낸다.

[실시예 7]

[LFA-1 및 HRV에 대한 ICAM-1 결실 돌연변이체의 결합]

ICAM-1은, 세포외 도메인이 5개의 Ig-유사 C-도메인으로 이루어진 것으로 추정되는, 필수 막 단백질이다. LFA-1 및 HRV가 특정한 ICAM-1 Ig-유사 도메인(들)과 접촉하는 부위(들)을 한정하기 위해, 올리고뉴

클레오타이드 유도된 돌연변이 유발을 이용하여 전체 도메인을 결실시키고, COS 세포들 내에서 발현되는 기능을 시험한다. 또한, 세포질 도메인을 결실시켜 점착에 대한 잠재적 기여도를 측정한다.

도메인 1 내지 5를 포함한 ICAM-1의 분비형 막은 가장 세포 바깥쪽의 카복실잔기 Y452 및 E453을 각각 F 및 해독 종결 코돈으로 돌연변이시켜 제조한다(pCDsD1-5). ICAM-1의 전체 세포질 영역은, 카복시 말단 트랜스막 잔기 Y476에 대한 코돈을 해독 종결 코돈으로 전파시켜 결실(Dcyt<sup>-</sup>)시킨다. D3 및 D4, D5는 멀리 떨어진 ICAM-1 서열까지 달하는 긴(48bp) 돌연변이 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 결실시킴으로써 F185와 p284(D3<sup>-</sup>) 및 P284와 R451(D4<sup>-</sup>)가 결함하도록 했다(제4도). 목적하는 결실 돌연변이는 DNA 서열화로 확인한다.

형질감염시킨 다음, 세포질(Y476/\* 또는 Dcyt<sup>-</sup>), 세번째(D3<sup>-</sup>), 네번째 및 다섯 번째(D4<sup>-</sup>5<sup>-</sup>) 도메인의 결실을 갖는 ICAM-1 돌연변이체는 유사하게 특징적인 넓은 수준으로 50-60%의 COS 세포들중에서 발현된다(제5도). 야생형과 비교하여 COS 세포들로부터의 Dcyt<sup>-</sup>, D3<sup>-</sup> 및 D4<sup>-</sup>5<sup>-</sup> ICAM-1에 대한 면역침전과 SDS-PAGE 결과는 각각 3.24 및 23kD 감소를 입증해주고 있다. COS 세포내에서 발현되는 경우 약 92kD의 야생형 ICAM-1은 55kD의 코어 단백질(core protein)을 지니고 있기 때문에, 8개의 연결된 글리코실화 부위 각각은 평균 4kD의 올리고당을 가질 수 있다. 각 도메인의 예상된 글리코실화(반응)에 근거하여(제4도). 관찰된 질량의 감소는 각각 예상된 3, 19 및 27kD의 감소와 상당히 일치하고 있다.

본 연구에서 돌연변이체 ICAM-1의 발현 효율은 4개 ICAM-1 MAb의 패널(panel)을 사용하여 검사한다. 이들 4개 MAb인 RR1/1, R6.5, LB-2 및 CL203은 비오틴화 MAb에서 본 바와 같이 ICAM-1의 세포 표면에 서로 결합하는 것을 억제하지 않기 때문에, 앞서의 결과들을 입증시키고 있다[참조: Marlin, S.D. et al., Cell 51: 813-819(1987), 이 문헌은 본원에 참고로 인용됨]. 그러므로, 이들은 4개의 독특한 에피토프(epitope)와 결합한다. 형질감염에 이어, ICAM-1 결실 돌연변이체는 COS 세포에서 특징적인 넓은 수준으로 발현된다(제5도). 모든 MAb은 야생형의 경우와 동일한 수준으로 Dcyt 돌연변이체에 결합한다(제6도). CL203의 결합은 D23의 제거에 의해 감소되고, D4 및 D5의 제거에 의해 배제되게 된다. 다른 3개의 MAb 결합은 CL203이 D3 돌연변이체에 미치는 경우 보다는 작지만 D45 돌연변이체의 결합에 영향을 미치지 않고 감소했다. 그러므로, RR1/1, R6.5 및 LB-2에 대한 에피토프는 D1 또는 D2내에 위치하고 있으며, CL203의 에피토프는 D4 또는 D5내에 위치하고 있다. Dcyt 및 D45 돌연변이체는 효과적으로 발현되고 있는 반면에, D3 돌연변이체는 야생형의 약 절반 수준으로 발현되는 것으로 나타났다.

3개의 모든 결실 돌연변이체는 발현시키는 COS 세포는 플라스틱-결합된 LFA-1에 특이적으로 정착한다(제7도, ■). 3개의 모든 결실 돌연변이체는 LFA-1에 대한 야생형 수준의 정착도를 입증한다. D4 및 D5의 결실은 LFA-1의 결합에 현저한 영향을 미치지 않으나, D3의 결실은 D3의 발현 감소에 상당하는 정도로 LFA-1 결합을 감소시킨다. 그러므로, D1 및 D2는 LFA-1에 결합하기 위해 충분한 것이다.

도메인 1, 2 및 3에 있어서 예상된 β-턴중의 아미노산 치환이 또한 생성되었으며, COS 세포에서의 후속 발현이 작용적인 면에서 시험되었다. 결국 R6.5 에피토프는 도메인 2 내의 서열 E111GGA에 위치되어 있으며 또한 도메인 1 내의 E39를 포함하는 반면, RR1/1 및 LB-2 모두는 도메인 1 내의 R13에 의존한다(표 3). 또한, RR1/1 결합은 서열 D71GQS내의 돌연변이에 의해 감소한다. N103 및 N165에서 N-연결된 글리코실화 부위를 제외한 돌연변이는 RR1/1, R6.5 및 LB-2, LFA-1 HRV 결합이 감소된다. 이들 돌연변이는, ICAM-1 이량체가 생성되도록 하는 것과 같이, 진행 과정에 영향을 미친다.

도메인 2 또는 3중에서의 다른 돌연변이는 LFA-1 정착 또는 HRV 결합을 변경시키지 않는다(표 3). 게다가, 잔기 V4 및 E90은 또한 HRV 결합에 작용할 수 있다.

따라서, LFA-1 및 HRV 결합은 ICAM-1의 아미노 말단 Ig-유사 도메인의 작용인 것으로 나타났다. 제3도는 ICAM 아미노 말단 도메인의 정렬을 나타내고 있다.

ICAM-1 도메인 결실 돌연변이체에 의한 HRV14의 결합은 D1 내지 2가 또한 당해 상호작용에 충분함을 입증해 주고 있다(제7도, □). 도메인 3 및 세포질 도메인 결실 돌연변이는 또한 야생형 수준의 [<sup>35</sup>S]HRV-14 결합을 입증해 주고 있는 반면, 도메인 4 및 5의 결실은 야생형에 대한 약 30%의 결합 감소를 나타낸다(제7도). D3<sup>-</sup> 돌연변이체에 대한 결합 감소의 원인은 상기 언급된 LFA-1 결합에서의 이유와 같다. 그러나, D4 및 5의 결실은, LFA-1에서는 발견되지 않았던, HRV14 결합의 일정한 감소로 나타난다. 그러므로, ICAM-1 상의 결합 부위는, D4 및 5가 결실되는 경우 예상됐던 8nm 만큼 줄어들어, 점차 세포성 글로코켈릭스내로 침지되거나 이와 달리 좀 더 유연해지게 되어 결합 부위는 HRV에 약간 더 접근하게 된다.

D1 및 2에 대한 LFA-1 및 HRV14의 결합과 상기 보고된 mAb 에피토프 위치 데이터는 앞서의 mAb 차단 데이터와 관련되어 있다. 그러므로, RR1/1, R6.5 및 LB-2와 상호작용하는 ICAM-1 부위는 도메인 1 및 2에 위치하여 HRV 결합을 차단하는 반면, CL203과 상호작용하는 ICAM-1 부위는 도메인 4 및 5에 위치한다. CL203은 세포 정착 또는 바이러스 정착 어느것도 차단하지 않는다[참조: Maio, M. et al., J. Immunol. 143: 181-1488(1989); Staunton, D.E. et al., Cell 52: 925-933(1988), 이 문헌은 본원에 참고로 인용됨].

[실시예 8]

[ICAM-1 아미노산 치환 돌연변이체]

ICAM-1의 가설적인 Ig-유사 도메인의 특성은 상기 서술된 결실 실험 뿐만 아니라 아미노산 치환의 지표로도 이용된다. ICAM-1의 3개의 아미노 말단 Ig-유사 도메인은 각각이 7(염기) 본체를 지니고 있는 것으로 예상된다. 이들 본체들은 샌드위치를 형성하기 위해 도메인내 디설파이드 결합에 의해 연결된 2개의 시이트(sheet)내에 정렬해 있는 것으로 예상된다. 면역글로불린내의 염기 본체를 연결하는 루프들은 항체-결합 부위를 형성하고, 다른 Ig 상과 구성원 내에서 분자간 접촉에 이용되는 것으로 가정되고 있다[참조: Williams, A.F. et al., Ann. Rev. Immunol. 6: 381-405(1988), 이 문헌은 본원에 참고로 인용됨]. 다음의 전략(strategy)은 도메인 1 내지 3내에서 루프(loop)당 2 내지 4개의 아미노산 치환체

를 첫번째 도입하고자 하는 것이다. 만일, 효과가 나타난다면, 이어서 단일 치환체를 제조한다. 결국, 관련된 일부 영역에서 치환체는 염기 본쇄 안으로 도입되게 된다.

ICAM-1의 돌연변이체는 다음과 같은 방법으로 생성된다. ICAM-1 결실 아미노산 치환을 발생시키기 위해, 쿤켈의 방법[참조: Kunkel, T.A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488-492(1985); 및 Peterson A 및 Seed B에 의한 변형[참조: Nature 329: 842-946(1987)], 이 두 문헌은 본원에 참고로 인용됨]에 의해 올리고뉴클레오타이드-지시된 돌연변이를 이용한다. 돌연변이체는 발현 벡터 CDM8(pCD1.8)로 아클로된 ICAM-1 cDNA의 단쇄 우라실-함유 주형을 이용하여 제조한다(이는 앞서 기술되었다)[참조: Staunton, D.E. et al., Cell 56: 849-853(1989)]. 독특한 제한 부위를 제공하는 돌연변이체 ICAM-1 올리고뉴클레오타이드들을 2번째 본쇄의 합성 반응을 개선시키는데 사용한다. 이, 콜라이로의 형질전환에 이어, 독특한 제한 부위에 대한 스크리닝에 대해 돌연변이체를 분리한다. 보통, 각 돌연변이체의 둘 또는 그 이상의 분리체들을 COS 세포의 형질감염에 이은 결합 연구에서 시험한다.

본 실험 결과는 표 3에 요약되어 있다. 표 3에서, 돌연변이의 표시는 야생형 서열에 대해 1문자 코드를 사용하고, 그 뒤에 슬레쉬한 후 이에 상응하는 돌연변이 서열에 대한 1문자 코드로 나타냈다. 서열내에서 첫번째 아미노산의 위치를 나타냈다. 슬레쉬 앞쪽에 나타낸 야생형 잔기뒤에 돌연변이체 대신에 치환된 잔기들을 나타냈다. ICAM-1 돌연변이체를 발현시키는 COS 세포는 LFA-1 피복된 플라스틱에 대한 정착성 및 <sup>35</sup>S 메티오닌-표지된 HRV14에 대한 결합을 시험한다. LFA-1과 HRV14 결합은 돌연변이체 ICAM-1을 발현하는 세포의 % 및 야생형 발현 세포의 결합으로 표준화시켰다. 결합은 다중 실험(n)에 대한 평균 및 표준오차(SE)로 나타냈다. LFA-1, HRV 및 mAb 결합 분석에 두배 이상의 효과가 생겨날 수 있는 경우를 유의성이 있다고 간주한다(굵게 밑줄침). 각 돌연변이체에 대한 CL203의 특이적 선형 형광강도(specific linear fluorescence intensity ; SLFI)는 상기에서 기술된 바와 같이 야생형 CL203 SLFI(중량%)에 대해 표준화시켰다. RR1/1의 SLFI, R6.5 및 LB-2 SLFI는, 상기에서 기술된 바와 같이, 돌연변이의 CL203 SLFI(중량%)에 대해 표준화시켰다.

[표 3a]

ICAM-1 아미노산 치환 돌연변이의 LFA-1 및 HRV14에 대한 결합

| 돌연변이        | LFA-1<br>결합 |       | HRV<br>결합 |       | CL203 |       | SLFI<br>(% CL203) |      |      |
|-------------|-------------|-------|-----------|-------|-------|-------|-------------------|------|------|
|             | %           | ±SE   | %         | ±SE   | %WT   | ±SE   | RR/1              | R6.5 | LB-2 |
| D1          |             |       |           |       |       |       |                   |      |      |
| Q1I/KA      | 119         | 23(2) | 11        | 4(2)  | 230   | 61(2) | 94                | 115  | 113  |
| Q1/E        | 175         | 53(3) | 149       | 57(3) | 135   | 21(3) | 154               | 145  | 136  |
| Q1/K        | 97          | 20(2) | 78        | 23(2) | 168   | 17(3) | 109               | 121  | 106  |
| S3VS/AGL    | 18          | 5(3)  | 61        | 32(2) | 121   | 21(2) | 5                 | 31   | 9    |
| S3/T        | 149         | 38(3) | 196       | 72(3) | 224   | 32(3) | 111               | 114  | 117  |
| V4/G        | 64          | 17(3) | 30        | 13(4) | 111   | 39(3) | 47                | 73   | 58   |
| S5/T        | 104         | 12(2) | 125       | 38(3) | 251   | 24(3) | 107               | 107  | 120  |
| K8/E        | 84          | 6(2)  | 132       | 18(2) | 111   | 11(2) | 104               | 121  | 110  |
| R13G/EA     | 2           | 2(4)  | 3         | 1(2)  | 132   | 4(2)  | 0                 | 31   | 0    |
| R13/E       | 1           | 1(3)  | 10        | 5(3)  | 202   | 34(3) | 4                 | 48   | 4    |
| R13/K       | 98          | 16(3) | 123       | 13(2) | 189   | 45(4) | 133               | 117  | 121  |
| R13/Q       | 78          | 23(3) | 60        | 0(2)  | 161   | 36(3) | 73                | 73   | 47   |
| G15/SA      | 120         | 17(3) | 164       | 23(2) | 172   | 44(2) | 89                | 88   | 89   |
| T20CS/ACT   | 91          | 22(3) | 130       | 36(3) | 148   | 24(3) | 86                | 95   | 86   |
| S24/A       | 80          | 8(2)  | 99        | 7(2)  | 158   | 4(2)  | 125               | 115  | 125  |
| D26QPK/ALPE | 30          | 13(3) | 13        | 7(3)  | 126   | 10(3) | 52                | 89   | 80   |
| Q27/L       | 37          | 6(3)  | 57        | 26(4) | 33    | 5(4)  | 75                | 75   | 125  |
| E24/A       | 0           | 0(3)  | 66        | 22(4) | 132   | 23(4) | 142               | 150  | 142  |
| K39KE/ERQ   | 99          | 25(4) | 61        | 4(3)  | 84    | 6(3)  | 47                | 93   | 87   |
| K40/A       | 124         | 4(2)  | 89        | 20(2) | 146   | 4(2)  | 123               | 106  | 106  |
| G46NN/ASI   | 49          | 15(4) | 9         | 5(2)  | 151   | 24(4) | 140               | 107  | 113  |
| N48/H       | 88          | -     | 81        | 2(2)  | 164   | 21(2) | 123               | 94   | 100  |
| R49KV/EKL   | 123         | 20(2) | 49        | 22(2) | 233   | 21(2) | 103               | 97   | 52   |
| K50V/EL     | 29          | 8(2)  | 10        | 8(2)  | 103   | 22(2) | 23                | 69   | 23   |
| Y52/F       | 72          | 0(2)  | 174       | 46(3) | 152   | 10(2) | 90                | 95   | 119  |
| Y52/FA      | 138         | 35(2) | 125       | 33(2) | 100   | 0(2)  | 141               | 133  | 117  |
| N56V/HM     | 121         | 13(2) | 101       | 42(2) | 121   | 21(2) | 106               | 125  | 125  |
| Q58EDS/AKDI | 3           | 3(3)  | 0         | 0(2)  | 98    | 10(3) | 10                | 22   | 7    |
| Q58/H       | 109         | 13(2) | 1         | 1(2)  | 135   | 35(2) | 93                | 107  | 93   |
| E59/K       | 134         | 50(2) | 105       | 20(2) | 130   | 1(2)  | 127               | 109  | 136  |
| E59/Q       | 84          | 38(2) | 92        | -     | 195   | 25    | 112               | 106  | 125  |
| D60S/KL     | 1           | 1(3)  | 1         | 0(2)  | 105   | 17(2) | 0                 | 21   | 0    |
| D60/K       | 14          | -     | 4         | 0(2)  | 89    | 8(2)  | 0                 | 31   | 0    |
| D60/N       | 92          | 33(4) | 89        | 14(3) | 127   | 14(3) | 100               | 138  | 108  |
| D60/Q       | 18          | 6(2)  | 20        | 8(2)  | 80    | 1(2)  | 30                | 54   | 31   |
| S61/I       | 59          | 18(3) | 111       | 4(2)  | 140   | 18(5) | 82                | 100  | 100  |

[표 3b]

| 돌연변이           | LFA-1<br>결합 |       | HRV<br>결합 |       | CL203 |       | SLF1<br>(% CL203) |      |      |
|----------------|-------------|-------|-----------|-------|-------|-------|-------------------|------|------|
|                | %           | ±SE   | %         | ±SE   | %WT   | ±SE   | RR/1              | R6.5 | LB-2 |
| Q62PM/API      | 104         | 48(3) | 182       | 61(2) | 200   | 29(4) | 59                | 81   | 73   |
| M64/I          | 111         | 13(2) | 107       | 3(2)  | 183   | 40(2) | 83                | 111  | 116  |
| Y66/T          | 135         | -     | 204       | -     | 144   | -     | 109               | 104  | 113  |
| N68/K          | 101         | 1(2)  | 137       | 23(2) | 153   | 8(2)  | 97                | 96   | 102  |
| D71GQS/NGEL    | 1           | 1(4)  | 21        | 12(3) | 161   | 54(3) | 0                 | 48   | 26   |
| D71/E          | 118         | 28(2) | 140       | 7(2)  | 124   | 6(2)  | 89                | 100  | 82   |
| DZ1/N          | 79          | 3(3)  | 62        | 1(2)  | 109   | 26(4) | 44                | 94   | 83   |
| QZ3/H          | 12          | 10(4) | 117       | 31(5) | 139   | 27(5) | 21                | 80   | 80   |
| QZ3/L          | 40          | 12(4) | 133       | 46(2) | 218   | 48(2) | 71                | 86   | 114  |
| S74/A          | 70          | 6(2)  | 156       | 35(2) | 129   | 29(2) | 119               | 119  | 113  |
| T73/A          | 59          | 28(2) | 119       | 8(2)  | 153   | 10(2) | 94                | 94   | 115  |
| KZ7Z/ES        | 87          | 22(4) | 42        | 14(4) | 151   | 38(3) | 88                | 80   | 84   |
| Y83/S          | 42          | 9(2)  | 86        | 64(2) | 125   | -     | 60                | 70   | 50   |
| E87/K          | 65          | 10(5) | 27        | 10(3) | 94    | 12(3) | 64                | 64   | 79   |
| R88V/EA        | 95          | 1(2)  | 152       | 1(2)  | 113   | 14(3) | 74                | 100  | 121  |
| E90/Q          | 122         | 45(3) | 157       | 57(2) | 152   | 17(2) | 90                | 92   | 112  |
| E90/K          | 34          | 11(2) | 50        | 22(4) | 29    | 5(4)  | 100               | 123  | 108  |
| D2             |             |       |           |       |       |       |                   |      |      |
| L91/A          | 87          | 7(2)  | 105       | -     | 15    | -     | 79                | 142  | 133  |
| G101K/AN       | 97          | 55(3) | 140       | 60(2) | 142   | 21(3) | 85                | 85   | 85   |
| N103/K         | 12          | 6(2)  | 13        | -     | 91    | 9(2)  | 17                | 60   | 22   |
| E111GGA/KAGS   | 103         | 35(3) | 162       | 73(2) | 122   | -     | 81                | 0    | 89   |
| N118/Q         | 54          | 22(3) | 110       | -     | 139   | 9(3)  | 93                | 85   | 93   |
| R125/E         | 81          | 27(3) | 157       | 15(2) | 145   | 37(2) | 181               | 133  | 104  |
| E127/R         | 82          | 29(2) | 131       | 4(2)  | 191   | 22(2) | 100               | 119  | 106  |
| K128/R         | 109         | 52(3) | 137       | 37(2) | 190   | 35(2) | 100               | 118  | 109  |
| V136GE/GVK     | 92          | 53(3) | 117       | 1(2)  | 171   | 42(2) | 220               | 172  | 138  |
| R149RD/EEG     | 81          | 40(2) | 139       | 56(2) | 159   | 47(2) | 166               | 189  | 166  |
| H152HGA/EEGS   | 85          | 52(2) | 82        | 20(2) | 94    | -     | 103               | 94   | 112  |
| A155N/SV       | 0           | 6(3)  | 12        | 8(2)  | 60    | 6(2)  | 0                 | 0    | 0    |
| N156/E         | 60          | 4(2)  | 107       | -     | 182   | 57(2) | 84                | 95   | 95   |
| R166PQ/EPA     | 75          | 8(2)  | 25        | 8(3)  | 94    | 10(3) | 100               | 109  | 64   |
| N175TSA/QTIG   | 26          | 10(4) | 40        | 8(3)  | 75    | 16(3) | 19                | 50   | 44   |
| N175/A         | 67          | 3(3)  | 129       | 46(2) | 80    | 9(2)  | 162               | 175  | 150  |
| S177/G         | 59          | 1(2)  | 66        | 6(2)  | 87    | 6(3)  | 136               | 118  | 90   |
| A178/G         | 39          | 3(2)  | 102       | -     | 304   | -     | 63                | 69   | 74   |
| D3             |             |       |           |       |       |       |                   |      |      |
| A189T/SI       | 91          | 3(2)  | 168       | -     | 138   | 38(2) | 175               | 166  | 166  |
| D203TQ/TAD     | 91          | 53(2) | 111       | 8(2)  | 125   | -     | 178               | 116  | 86   |
| D213GL/HGV     | 90          | 52(3) | 99        | 13(2) | 128   | 28(2) | 231               | 175  | 107  |
| D229QR/HLE     | 90          | 37(3) | 106       | 11(2) | 210   | 59(2) | 94                | 92   | 100  |
| N240DS/KNA     | 147         | 29(3) | 82        | 32(2) | 142   | -     | 113               | 125  | 132  |
| E254DE/KEK     | 122         | 33(2) | 99        | 23(2) | 180   | 63(2) | 178               | 129  | 81   |
| N269QSQ1/IQAeq | 101         | 9(2)  | 108       | 45(2) | 95    | 15(3) | 162               | 150  | 150  |

mAb CL203의 에피토프는 D4 또는 5에 위치해 있는 반면 D 내지 D는 아미노산 치환되기 쉽기 때문에, CL203을 사용하여 형질감염된 COS 세포내에서 ICAM-1 아미노산 치환 돌연변이체의 발현 수준을 측정한다. LFA-1 및 HRV에 대한 ICAM-1 돌연변이체의 결합은 mAb CL203 결합 및 야생형 ICAM-1으로 수득한 결합으로 표준화시켰다. 게다가, mAb RR1/1, R6.5 및 LB-2가 독특한 에피토프에 결합하기 때문에, 이들 에피토프의 둘 이상의 결실을 전체 구조상의 분열을 나타내며, 이에 상응하여 LFA-1 및 HRV 결합에 미치는 영향은 감소된다. CL203에 대해 측정했을 때 특이적으로 감소된 발현 수준을 입증한 후 두 돌연변이 Q27/L 및 E90/K도 역시, 보다 낮은 발현이 이들 돌연변이가 발생하는 D1 폴딩의 가소성 효율을 반영하는 것과 같이, 감소한다.

단지 하나의 ICAM-1 mAb의 결합에 있어서 감소를 입증하는 아미노산 치환 돌연변이체는 상응하는 야생형 잔기가 mAb 에피토프에 기여하고 있음을(표 3) 암시하고 있다. 아미노산 치환 돌연변이체에 대한 mAb의 결합 감소는 RR1/1에 대한 에피토프가 잔기 D71 및 Q73 및 D26, K39 및 Q62에 있는 서열들을 포함하고 있음을 입증한다. R6.5에 대한 에피토프는 D2중의 E111에 있는 서열의 돌연변이에 의해 완전하게 및 특이적으로 분열하게 된다. LB-2 결합은 D1중의 R49 및 D2중의 R166에 있는 서열내의 돌연변이에 의해 특이하게 영향받는다.

도메인 1 및 2는 구조상으로 연결되어 있는 것처럼 보인다. D1중의 53개 돌연변이체중 12개 D2중의 유사한 비율(18개중 4개)은 RR1/Q, R6.5 및 LB-2 mAb, LFA-1 및 HRV의 결합을 간섭한다. 이들 리간드들이 다른 부위(mAb) 또는 단지 부분적으로 중첩된 영역(LFA-1 및 HRV, 아래 참조)에만 결합하기 때문에 보통의 효과를 갖기 위해 D1 및 D2 모두에 광범위하게 퍼져 있는 돌연변이의 능력은 D1의 배열이 D2의 배열에 의존하며 그 역도 가능함을 암시한다. 대조적으로, D3내의 돌연변이체중 어느것도 이들 리간드의 결합에 영향을 끼치지 않으며, 이들 돌연변이체중 어떤것도 D4 또는 D5에 위치해 있는 CL203의 결합에 영향을 미치지 않는다. 이것은, D1 및 D2 사이에 실질적인 접촉이 존재하지만, D1 및 D2는 배열상 D3와 독립해 있다; 즉, D2와 D3 사이에 힌지가 존재할 것이라는 점을 지시하고 있다. 대부분의 불연성 돌연변이는 잔기 R13 및 D60을 포함하며, 이는 D2중의 잔기에 아주 근접하게 되는 Ig-모델(아래 참조)에서 예견될 수 있다. D2중의 잔기 결실(잔기 P95-A189)은 세포 표면 발현 부족의 결과로 나타나며, 더욱이 ICAM-1의 적절한 폴딩은 D1 및 D2 상호작용에 의존함을 나타내고 있다.

2개의 돌연변이에 있어서 배열상의 분열은 과다한 디설파이드 결합 형성으로 반영된다. 12 D1 및 D2 돌연변이체의 면역침전 및 비환원 SDS-PAGE는 이들 둘(N103/K 및 A155N/SV)이 ICAM-1 디설파이드로 연결된 이량체임을 나타내 주었다. 잔기 N103 및 N156은 C108 및 C159 근처에서 발생되는데, 이는 D2의 도메인 내 디설파이드 브릿지를 형성하는 것으로 예상된다.

LFA-1 결합에 가장 강한 영향을 미치는 돌연변이는 D1에 위치해 있다. 가장 현저한 돌연변이는 E34/A(이는 LFA-1 결합을 완전히 제거)와 Q73/H(이는 결합을 10배 감소시킴)이다(표 3). Q73, Q73/T에서의 서로 다른 치환은 2배의 감소를 입증한다. D26QPK/ALPE 및 G46NN/ASI의 돌연변이는 LFA-1 결합을 2-3배 감소시킨다. 두번째 도메인에서 돌연변이체 N118/Q, N156/E, N175/A 및 S177/G는 LFA-1 결합을 약 2배 정도

특이적으로 감소시킨다. 이들 4개 돌연변이체는 D2중의 N-연결된 글리코실화 부위 4개중 3개에 영향을 미치는 것으로 밝혀졌다; D1에는 N-연결된 글리코실화 부위가 없다(제4도). 따라서, N-연결된 탄수화물은 작지만 LFA-1 결합에 결정적인 역할을 하고 있진 않은 것 같다. 이들 돌연변이의 영향은 보다 간접적이다. D2 N-연결된 글리코실화 반응이 가진 한가지 간접적인 영향은 한지의 유연성을 변화시키는 것이다. D3중의 어떤 돌연변이도 LFA-1 결합에 영향을 주지 못하며, 이는 결실된 D3의 영향의 결여와 일치하는 것이다.

여러 가지 돌연변이는 HRV 결합에 있어 D1이 D2보다 더 중요하며 HRV 및 LFA-1의 결합 부위가 부분적으로 중첩되어 있음을 입증해준다. 7개의 돌연변이체는 HRV14 결합을 감소시키지만, LFA-1 결합에 영향을 미치지 않는다. 가장 큰 효과를 입증하는 2가지 돌연변이는 D1중의 아미노산 치환을 포함한다. Q58/H는 실제로 HRV14 결합이 없으며, Q1T/K는 10배의 감소를 낳게 된다. D1중의 다른 4가지 돌연변이는 HRV 결합, K39KE/ERQ, R49KV/EKL, D71/N 및 K77T/ES에 특이적인 2배의 효과를 입증하고 있다. D2중의 한가지 돌연변이, R155PQ/EPA는 HRV14 결합에 있어 4배 감소로 나타난다. D3 돌연변이는 HRV 결합에 아무런 영향을 주지 않는다.

LFA-1 결합에 영향을 미치는 상술된 2개의 D1 돌연변이중 3개는 물론 HRV 결합에 영향을 미친다. 돌연변이체 D26QPK/ALPE 및 G46NN/ASI는 HRV14 결합에 10배, LFA-1 결합에 2 내지 3배의 영향을 미친다. LFA-1 결합이 전적으로 없는 E34/A는 HRV 결합을 2배 감소시킨다. LFA-1 결합을 감소시키는 D2중의 4가지 돌연변이는 HRV 결합에 약간 또는 전혀 영향을 미치지 않는다.

그러므로, LFA-1 또는 HRV 결합에 결정적(10배 또는 그 이상의 영향)인 것으로 확인된 잔기들은 기능상의 분리를 입증해 준다. LFA-1 결합을 현저하게 감소시키는 돌연변이 E34/A 및 Q73/H는 HRV 결합에 미약하거나 또는 측정할 수 없는 영향을 미친다. 역으로, HRV 결합에 상당한 영향을 미치는 것으로 상술된 돌연변이는 LFA-1 결합에 영향을 전혀 미치지 않는다. 그러나, 결합 부위내의 중첩은 LFA-1 및 HRV 결합 모두에 영향을 미치는 두가지 돌연변이에 의해 입증된다. 또한, 결합부위의 근접성(proximity)은 여전히 LFA-1 또는 HRV 결합에 영향을 미치는 서열 위치에 인접해 있는 돌연변이에 의해 제시된다(하기에서 추가로 논의됨).

D2중의 한 개의 서열 및 잠재적으로 3개의 N-연결된 글리코실화 반응과 대조적으로, LFA-1 및 HRV14 결합에 중요한 10개의 서열/잔기들을 D1중에 한정되었다. 결합에 중요한 잔기 또는 서열은 D1 중에서 동정되어 있고, D2 내에서는 동정되어 있지 않다. 더욱이, D3중의 치환중 어느것도 LFA-1 또는 HRV14에의 결합을 변경시키지 않는데, 이는 D3의 결실 결과를 확신시키는 것이다. 따라서, LFA-1 및 HRV14 접촉의 주요 부위는 D1중에 위치한다.

LFA-1 및 HRV14의 상호작용은 2가 양이온에 대한 요건과 관련하여 더욱 비교했다. 세포 표면 또는 플라스틱에 결합된 ICAM-1은 Mg 의존성 방법으로 세포 표면 또는 정제된 LFA-1에 결합한다는 것이 앞서 입증된 바 있다[참조: Marlin, S.D., et al., Cell 51: 813-819(1987); Staunton, D.E. et al., Nature 339: 61-64(1989)]. T 임파종 라인 SKW3 및 HRV를 발현시키는 LFA-1의 정제된 ICAM-1에 대한 결합은 플라스틱 기질위에서 비교된 바 있다. 플라스틱에 결합한 정제된 ICAM-1을 이용하였으며, LFA-1을 발현시키는 T-세포주는 Mg의 존재하에서만 ICAM-1에 결합하는 것으로 밝혀졌다(제8도). 대조적으로, ICAM-1에 대한 HRV14의 결합은 10mM Mg 또는 5mM EDTA의 존재하에 현저하게 다르지 않았다. 이런 결과는 기질위에서 ICAM-1의 밀도 범위에 걸쳐 확인했다. 따라서, LFA-1: ICAM-1 및 HRV: ICAM-1의 상호작용은 2가 양이온 요구성에 있어서 뚜렷이 상이하다.

상기의 실험은 ICAM-1의 세포와 영역이 20nm 길이의 한지된 막대로 존재함을 입증했다. 이는, 5개의 예상된 Ig-유사 도메인들이 확장되고 상을 이루지 않았으며, 또 나란히 정렬해 있기 보다는 오히려 끝과 끝이 정렬되어 있다는 것을 지시하고 있다. 그러므로, ICAM-1은 전체적인 구조에 있어서 NCAM과 유사하다[참조: Beckers, A., et al., Immunochem. 11: 605-609(1974)]. 세포의 ICAM-1의 총 길이는 18.7nm이기 때문에, Ig 도메인당 3.7nm가 된다. 다섯 개의 Ig-유사 도메인을 포함하는 NCAM의 긴 팔은 길이가 17.6 내지 18.7nm로서 근본적으로 ICAM 분자의 총 길이와 동일하다[참조: Beckers, A., et al., Immunochem. 11: 605-609(1974)].

ICAM과 NCAM의 구조에 있어서 다른 놀랄만한 유사성은 두가지 분자 모두 굴곡부를 가지며 전형적으로 90° 이나, 다른점은 유연성(flexibility)을 나타낸다는 것이다. ICAM에서 이 굴곡부는 아마도 두 Ig-유사 도메인 사이에 존재하는 것 같으며, 그로 인해 긴 팔은 3개 도메인을 갖고, 짧은 팔은 2개의 도메인을 갖게 한다. D1 및 D2의 형태가 서로 의존적이라는 발견은 한지가 D2와 D3 사이에 존재함을 나타낸다. D2-D3 경계선 사이에 있는 서열은 ICAM-1 내의 프롤린이 가장 풍부한 영역을 입증하는 것이다(10개 잔기 내에 4개의 프롤린). 이것은 특징적으로 프롤린이 풍부한 Ig 한지 서열과 일치한다. 실제로, 이 영역의 4개의 모든 프롤린은 마우스 IgG3의 한지 영역에 있는 4개의 프롤린과 동일하게 자리잡고 있다.

NCAM에 있어서는 5개의 IgG-유사 도메인내에 굴곡부가 없다(이들은 ICAM에 총 길이와 같은 뚜렷하게 곧은 긴 팔을 형성한다); 오히려 굴곡부는 IgG-유사 도메인의 서열에 바로 뒤따라 존재한다. NCAM의 짧은 팔은 두 개의 피브로넥틴-유사 도메인, 막 횡단 단편 및 세포질 도메인을 포함하고 있다[참조: Beckers, A., et al., Immunochem. 11: 605-609(1974)].

놀랍게도, IgG-유사 도메인을 갖고 있지 않고 ICAM 또는 NCAM과 관련되어 있지 않은 세포 점착 분자 LCAM도 역시 90°의 굴곡부를 갖고 있다[참조: Beckers, A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86: 1088-1092(1989)].

그러므로, 세포 점착 분자의 이런 일반적 측면은, 단지 말단을 신장시키기 보다, 이 분자의 신장된 단편이 이의 수용체와 마주하고 그 사이에 끼어들게 하는데 기능적으로 중요한 것으로 보인다. 이것은, 격리되고 유연한 단편상에 위치한 결합 부위가 다른 각도로 배향되고 있고 ICAM-1 분자를 포함하는 세포막에 비해 상이한 거리에 위치해 있는 수용체와 결합하도록 한다. 더욱이, 한지에 의해 제공된 단편의 유연성, 막 범위에 의해 제한되는 세포 표면보다 큰 용매의 용적내에서 결합 부위의 확산 속도를 증가시키며, 이에 의해 점착 수용체 또는 바이러스에 대한 결합 동역학을 증가시키고, 이들 상호작용의 효율성을

증가시킨다.

그러므로, 막대-형태의 쌍을 이루지 않는 ICAM-1의 도메인 구성은 세포 표면위의 결정적인 거리까지 결합 부위를 끌어올림으로써 정착을 촉진한다. 결실 도메인 4 및 5에 대한 리노바이러스 결합은 LFA-1의 결합보다 더 민감한데, 이는 ICAM-1이 7.4nm 단축되어 이것이 유연성에 영향을 미치는 것으로 예상된다. 이같은 사실은 리노바이러스와 LFA-1 사이의 2가지 차이점과 관련된 듯하다. 첫째, HRV 상의 결합 부위는, 비리온(virion)의 5배 중첩된 축의 둘레에 외호(moat)를 형성하는 캐년 내부에 2.5nm 깊이의 틈사이 에 묻혀 있을 것이라고 가정됐다[참조: Rossmann, M.G. et al., Nature 317: 145-153(1985)]. 반면, 인테그린에 대한 전자현미경 연구는, 세포 표면위에 존재하는 18nm-길이의 대(stalk)에 의해 지지되고 있는 10×8nm의 구상 결합 도메인을 제안하고 있다[참조: Carrell, N.A. et al., J. Biol. Chem. 260: 1743-1749(1985); Nermut, M.V. EMBO J. 7: 4093-4099(1988)]. ICAM-1이 단축에 의해 묻혀 있는 세포 글리코클릭스(glycocalyx)[참조: Williams, A.F. et al., Ann. Rev. Immunol. 6: 381-405(1988)]는 LFA-1 보다 거대한 리노바이러스를 더 배척한다. 둘째, 리노바이러스에 대한 다수의 ICAM-1 분자의 결합[참조: Colonna, R.J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85: 5449-5453(1988)]은 ICAM-1 분자들간의 근접성을 필요로 하며, 이러한 충전(packing)은 유연성의 감퇴 또는 상실에 의해 방해될 수 있다. ICAM-1 과 LFA-1의 상호작용도 역시 다가의 상호작용을 필요로 하지만, 각각의 알파 및 베타 아단위의 함량에 근거하여 LFA-1 분자는 서로 더 잘 분리될 것으로 여겨지며 각각 하나의 결합 부위를 갖는 것으로 예상된다.

ICAM-1의 쌍을 이루지 않은 도메인 특성 및 D1과 결합하는데 관련된 서열/잔기의 위치는 제안된 HRV 캐년 결합 부위의 깊은 틈(cleft)내의 ICAM-1 D1 결합과 일치한다. ICAM-1 및 HRV의 접촉면은 적어도 2개의 서로 다른 모델에서 상상된 바있다. 예상된 2차 구조에 근거하여, ICAM-1 서열은 Ig 폴드 모델에 위치시켰다(제9도). HRV 접촉에 관련된 6개의 D1 서열중의 4개 Q1T, D26QP, G46NN 및 R49KV는 이 모델에서 D1의 중심에서 중간쯤 떨어져 위치한다. 깊은 틈의 크기(3 내지 1.2nm의 폭 및 2.5nm의 깊이)는 Ig-유사 도메인(길이 4nm 및 폭 2.5 내지 2nm)이 삽입될 수 있는 크기보다 약간 더 크다. 그러므로, 중심에서 중간쯤 떨어진 ICAM-1 D1은 틈의 내부에 있는 잔기와 결합하여 D1의 긴 축이 비리온의 주변 표면에 거의 수직으로 있게 된다. 각각의 깊은 틈의 경계 사이의 거리 약 4nm는 ICAM-1이 5배 중첩된 비리온의 축 주변에 있는 5개의 틈 모두를 차지하도록 충분히 크다. HRV 접촉에 연루된 다른 서열, 즉 K39KE, Q58 및 R116PQ는 캐년의 가장자리에 있는 HRV 잔기와 상호작용한다. 이와 달리, D1 및 D2중의 이들 잔기는 HRV 잔기들과 결합을 형성하지 않으나, 결합 형태에 중요한 도메인간 또는 도메인내 결합에 관여한다. ICAM-1 : HRV 상호작용의 두번째 모델은 틈의 ICAM-1 D1 접촉 잔기일 것이며, 이로 인해 D1의 긴 축은 주변의 비리온 표면에 대해 정확한 각을 형성할 것이다. 그러므로, D1은 캐년과 좀더 평행 및 수평이 될 것이다. 이는 5배 중첩된 축 주변에 있는 일부 부위의 입체적 방해에 의한 차단으로 나타날 것이다.

3개의 비-가교결합 차단하는 ICAM-1 mAb이 LFA-1 및 리노바이러스 14결합을 차단하기 때문에, ICAM-1상의 LFA-1 및 리노바이러스-14 접촉부는 아주 근접해 있다고 이미 제시되었다[참조: Staunton, D.E. et al., Cell 56: 849-853(1989)]. 현재의 우리 연구는 리노바이러스-14에 대한 결합 부위를 보여주고 있다. 비록, 쌍을 이루지 않은 도메인을 갖는 Ig과 구성원에 대해 Ig 폴드는 몇가지 중요한 면에서 서로 다르 겠지만, 우리들은 Ig 도메인 구조를 가정하여 ICAM-1 도메인 1 및 2(제9도)상에서 이들 서열의 위치를 모델화했다[참조: Williams, A.F. et al., Ann. Rev. Immunol. 6: 381-405(1988)]. 돌연변이체 G46NN/AS1, D26QPK/ALPE 및 E34/A의 특성화는 LFA-1 및 리노바이러스-14 결합에 있어서 ICAM-1 서열의 일반 용도를 보여주었다. Ig 도메인 모델내에서 접촉 서열의 예측된 위치는 LFA-1 및 리노바이러스-14 부위의 근접 또는 중첩과 일치한다. Q73 및 G46과 같이 LFA-1 결합에 관련된 잔기들은 리노바이러스-14 결합에 관련된 잔기 D17 및 R49와 근접하였다. 그러므로, 리노바이러스-14는 LFA-1 결합부위와 중첩되어 있는 ICAM-1 상의 부위를 결합시키기 위해 생긴 것으로 보인다. 그러나, 두 결합 부위는 각각 LFA-1 및 리노바이러스 결합을 현저하게 및 선택적으로 파괴할 수 있는 E34 및 Q58의 돌연변이에 의해 분명하게 구분할 수 있다. 4개의 D1 서열중 3개가 LFA-1 접촉에 연루되어 있고, 9개중 6개의 서열이 이 모델에서 D1의 막쪽에서 중간쯤 떨어진 곳에 위치한 리노바이러스-14 접촉에 연루되어 있다; 그러나, 돌연변이가 가장 현저한 영향을 미치는 일부 부위는 가까운 쪽에 위치하고 있다. 도메인 1에서 리노바이러스 및 LFA-1 결합 부위의 중첩은 상기에서 약속한 바와 같이 정착성 상호작용 부위로서 당해 도메인의 적합성의 결과로 인한 것이다. 이와 달리, ICAM-1은 항원-존재 세포내에서 자극 작용을 갖는 수용체이다. 이런 계획하에서, 도메인 1에 대한 결합은 리노바이러스에게 유리할 수 있는 반응을 ICAM-1을 통해 유발할 것이다(예를 들면: 비강 분비를 자극함으로써 바이러스를 다른 사람에게 전파하는 것을 돕는다). 이는 아마 진화상의 의태일 것이다.

서열 및 구조에 있어서, ICAM-1상의 접촉 부위는 다른 많은 인테그린 리간드와 다르다. 세포외 매트릭스 단백질에 결합하는 많은 인테그린은 그들의 리간드중에서 RGD 또는 RGD-유사 서열에 결합한다.[참조: Ruoslahti, E., et al., Cell 44: 517-518(1986); Hynes, R.O., Cell 48: 549-554(1987)], 사람의 ICAM-1은 RGD 서열을 없고 여러 가지 RGD-유사 서열이 갖고 있다[참조: Simmons, D. et al., Nature 331: 624-627(1988); Staunton, D.E. et al., Cell 52: 925-933(1988)]; 쥐의 ICAM-1의 RGD 서열을 함유하고 있다. 그러나, 이들 부위중의 어느 것도(ICAM-1에 대한 LFA-1의 결합에서 중요한) 우리들의 돌연변이 연구에 의해서 한정된 잔기와 상응하지 않았다. RGD와 같은 연속 서열 대신에, ICAM-1중의 많은 불연속 서열이 인지된 것으로 나타났다. 이것은 단백질 항원에 대한 Ig의 결합과 유사한데, 이 경우 3개의 불연속 상보성-결정 영역의 잔기가 인지 특이성을 부여한다[참조: Alzari, P.M. et al., Ann. Rev. Immunol. 6: 555-580(1988)].

ICAM-1은 다른 백혈구 인테그린, 즉 MAC-1과 결합할 수 있으며, 또한 RGD 의존성 방식으로 iC3b와 같은 리간드 및 피브리노겐과 결합할 수 있다. 그러나, MAC-1과 결합하는 ICAM-1상의 부위는 LFA-1에 결합하는 ICAM-1 상의 부위와 다른 것으로 나타났다. 그러므로, MAC-1은 ICAM-1상의 RGD-유사 서열에 결합하는데, MAC-1은 그의 다른 결합 특이성과 보다 일치할 것이다.

LFA-1 결합에 중요한 것으로서 상기에서 정의된 ICAM-1 잔기는 다른 ICAM에 보존되어 있다. 사람의 ICAM-1은 쥐의 ICAM-1과 50%, 사람의 ICAM-2와 35%가 동일하다[참조: Staunton, D.E. et al., Nature 339: 61-64(1989)]. LFA-1 결합에 가장 중요한 잔기, 즉 E34 및 Q73은 마우스 ICAM-1 및 사람 ICAM-2 모

두에 보존되어 있다. 이같은 사실은 사람 LFA-1과 결합하는 마우스 ICAM-1 및 사람 ICAM-2 모두[참고: Staunton, D.E. et al. Nature 339: 61-64(1989)]의 능력과 일치한다. LFA-1 결합에 영향을 미치는 N156에 있는 하나의 D2 N-연결된 글리코실화 부위가 또한 ICAM-2에 보존되어 있다. 리노바이러스-14 결합에 중요한 Q58, G46, D71, K77 및 R166 등 몇몇 잔기는 마우스 ICAM-1 또는 사람 ICAM-2에 보존되어 있지 않은데, 이것은 마우스 세포[참조: Colonno, R.J. et al., J. Virol. 57: 7-12(1986)] 및 ICAM-2가 리노바이러스-14에 결합할 수 없다는 사실과 일치한다.

LFA-1 및 HRV 접촉에 중요한 서열은 또한 RR1/1 및 LB-2의 차단 mAb 에피토프에 상응하지만, R6.5 에피토프는 입체 장애를 통해 결합하여 그로 인한 차단을 나타내진 않는다.

ICAM-1에 대한 LFA-1의 결합은 2가 양이온에 의존한다. 모든 인테그린  $\alpha$  아단위는 EF 핸드-유사 2가 양이온 결합 부위의 3 또는 4개의 연접한(tandem) 반복체를 갖고 있다[참조: Kishimoto, T.K. et al., Adv. Immunol. 46: 149-182(1989)], 그러나, 이들 부위들은 이들이 2가 양이온과 배워된 하나의 보존된 글루탐산이 결여되어 있다는 점에서 고전적인 EF-핸드 동기와 상이하다[참조: Corbi, A.L. et al., EMBO J. 6: 4023-4028(1987)]. 인테그린으로부터 결실된 이 잔기는 리간드중의 잔기에 의해 대체되며, 이에 따라 금속이 수용체 및 리간드 모두에 배워될 수 있는 것으로 가정되어 왔다[참조: Corbi, A.L. et al., EMBO J. 6: 4023-4028(1987)]. LFA-1의 결합에 가장 중요한 ICAM-1 잔기(글루탐산 34(E34))는 2가 양이온과의 가상적인 배위를 제공한다. ICAM-1에 대한 리노바이러스-14 결합에서는 유사한 메카니즘이 존재하지 않는데, 이는 2가 양이온 독립적인 것으로 밝혀졌다. 리노바이러스 결합에 2가 양이온이 요구된다는 앞서의 제안[참조: Rueckert, R.R., In: Fields Virology, Fields, B.N. et al. (eds.), Raven Press, NY, (1985) pp 705-738]]은 독특한 수용체에 결합하는 소 그룹 혈청형을 이용한 연구에 근거한 것으로 여겨진다. 결합에 반하는 안전성은, 리노바이러스의 5배 중첩된 축에 아스파라긴 141과 배워된 양이온에 의해 영향받는 것으로 생각된다[참조: Rossman, M.G. et al., Nature 317: 145-153(1985)].

Ig 상과(superfamily)의 구성원인 ICAM-1 및 CD4는, 세포 및 바이러스 점착에서 그들이 기능상 놀라만한 대등관계를 입증해 보인다. MHC 부류 II 분자에 결합하는 CD4는 T 세포상의 점착 수용체이고, HIV 바이러스에 의해서도 또한 수용체로 활용된다. CD4는 4개의 세포의 도메인을 지닌다. CD4에 대한 최근 연구는 아미노-말단 Ig-유사 도메인중의 돌연변이가, 두번째 도메인내에서 보다 낮은 영향을 미치며, MHC 부류 II 및 HIV의 결합에 가장 강력한 영향을 갖는다는 것이 밝혀졌다. MHC 부류 II 및 HIV에 대한 결합 부위는 중첩되어 있으나 별개이다[참조: Peterson, A. et al., Cell 54:65-72(1988); Clyton, L.K. et al., Nature 339: 548-551(1989); Lamarre, D. et al., Science 245: 743-746(1989); Landau, N.R. et al., Nature 334: 159-167(1988)]. 이 모든 문헌은 본원에 참고로 인용됨]. 일부 CD4 mAb 에피토프는 D1 및 2 모두로부터 잔기를 포함하고 있는 듯이 보이는데, 이는 이들 도메인들이 물리적으로 밀접하게 연관되어 있음을 증명해주는 것이다[참조: Landau, N.R. et al., Nature 334: 159-167(1988)]. 이들 모든 관점에서, 세포 점착 및 ICAM-1 및 CD4의 바이러스 결합 부위에 대한 발견은 비슷하다.

리노바이러스 케년중의 추정된 수용체 부위에 대한 ICAM-1 도메인 1의 결합에 대해서 적어도 두가지의 다른 모델이 상정될 수 있다. 상기에서 언급한 바와 같이, 리노바이러스-14 접촉에 연류된 D1 서열의 대다수(9개중 6개)는 D1의 중심으로부터 중간쯤 떨어진곳에 위치하는 것 같다(제9도). 리노바이러스 케년중의 수용체 결합 부위는 깊은 틈에 존재하는 것으로서 연관시켜 왔다(상부에서의 폭 3nm, 기저에서의 폭 1.2nm 및 깊이 2.5nm)[참조: Rossmann, M.G. et al., Nature 317: 145-153(1985); Colonno, R.J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85: 5449-5453(1988); Rossmann, M.G. et al., Ann. Rev. Biochem. 58: 533-573(1989)]. 이 틈새의 크기는 Ig-유사 도메인에 비해 약간 큰 것(길이 4nm 및 폭 2 내지 2.5nm)이 삽입될 수 있는 정도이다. 그러므로, ICAM-1 D1의 중심에서 중간쯤 떨어진 곳에 있는 접촉 서열은 틈새내에 있는 잔기와 결합을 형성하여 D1의 긴 축은 케년의 바닥과 거의 수직으로 되게 한다. 5배 중첩된 축 주변에 있는 각각의 깊은 틈의 중심사이의 거리 약 5nm는 ICAM-1 분자가 모든 5개의 틈새를 차지하기에 충분히 크다. D1의 중심에서 중간쯤 떨어져 위치하지 않는, 리노바이러스-14 접촉에 연류된 나머지 서열 K39DE, Q58 및 R166PQ는 케년 가장자리의 리노바이러스-14 잔기와 상호작용할 것이다.

ICAM-1/리노바이러스-14 상호작용의 두번째 모델은 다음과 같다. 즉, ICAM-1 D1이 틈의 잔기와 접촉하여 D1의 긴 축이 케년의 바닥과 보다 정확한 각도를 형성함으로써, 케년내에서 D1 및 D2가 보다 길게 위치하도록 한다는 것이다. 이것은, 일부 이웃한 리노바이러스-14 결합 부위는 입체 장애에 의한 차단을 발생시킬 것이다.

그러므로, 본 발명은 ICAM-1 및 LFA-1 또는 HRV간 접촉의 주요 요점을 해결하고 있다. ICAM-1 접촉 서열 동정은 LFA-1 및/또는 HRV 결합을 방해하는 ICAM-1 단편 및 합성 펩타이드의 설계에 대한 부가적 정보를 제공한다. 예를들어, 데이터는 D1 한가지 만으로 구성된 ICAM-1 단편이 LFA-1 및 HRV 상호작용 모두를 억제하기에 충분하다는 것을 보여준다; 그러나, 여기에 주어진 결과들은 보다 더 효율적인 형태는 D1 및 D2 모두를 포함하고 있을 것이라고 시사하고 있다. 불연속 ICAM-1 서열이 접촉에 관련된 것으로 여겨지기 때문에, 다수의 접촉 서열에 걸쳐 있는 긴 펩타이드 단편 또는 여러 가지 더 짧은 펩타이드들이 LFA-1 및 HRV 상호작용을 비교하기 위해 사용될 것이다.

그러므로, 여기에서 ICAM-1의 첫번째 2 도메인 내부에 있는 중용한 결합 부위를 동정하는 것은 ICAM-1의 가용성 단편이 리노바이러스 감염의 예방과 염증 질환 및 상태(재관류 손상, 이식 등과 같은)은 치료에 잠재적인 치료상의 유용성을 지니고 있음을 입증하는 것이다. 이런 제재들은, 리노바이러스의 주요 그룹이 유발시키는 일반적인 감기 증세의 50%에 해당하는 경우 치료학상의 치료에 효과적일 수 있다[참조: Sperber, S.J. et al., Antimicrob. Agents Chemo. 32: 409-419(1988)]. 재관류 손상의 경우, 백혈구들이 조직으로 이동하여 일시적으로 혈류를 저지하여 조직을 손상시킨다. 심근경색에서의 재관류 손상 및 허혈성 쇼크에 따른 심각한 손상은 LFA-1 및 다른 백혈구 인테그린에 대한 mAb에 의해 차단될 수 있음이 밝혀졌다[참조: Vedder, N.B. et al., J. Clin. Invest. 81: 939-944(1988); Simpson, P.J. et al., J. Clin. Invest. 81: 624-629(1988)], 이 문헌은 본원에 참고로 인용됨].

그러므로, 요약한다면, 임파구상의 LFA-1(CD11a/CD18)은, 면역 및 염증 반응 동안에 중요한 세포-세포접착을 촉진시키기 위해 다른 세포상의 ICAM-1(CD54)에 결합한다; 더욱이 사람 리노바이러스(HRV)의 주요

글부는 ICAM-1을 그들의 세포 수용체로서 이용한다. 전자 현미경사진은 ICAM 분자가 약 19nm 길이의 막대(rod) 형상임을 보이고 있다. 이 막대는 종종 90도의 굴곡부를 갖는데, 긴 팔이 12nm이고 짧은 팔이 7nm이다. 이런 크기는, 3개 영역은 긴 팔쪽에 2개 영역은 짧은 팔쪽에 존재하는 5개의 Ig-유사 도메인이 막대 속에 대해 작은 각도로 배향되어 있는 모델을 가정하고 있다. LFA-1, HRV 및 4개의 모노클로날 항체(mAb)와의 결합에 중요한 ICAM-1 서열은 Ig-유사 도메인의 결실 및 예상된 b턴(turn)에서의 아미노산 치환을 갖는 ICAM-1 돌연변이체의 특성화를 통해 동정된다. ICAM-1의 아미노말단의 두 Ig-유사 도메인(D1 및 D2)은 구조적으로 상호작용하는 것 같으며, D2 내의 N-연결된 글리코실화 반응 부위는 구조적 통합성에 중요하며 LFA-1 결합에 미약한 영향을 미치는 것으로 보인다. ICAM-1의 아미노 말단 Ig-유사 도메인(D1)은 LFA-1 및 HRV 모두에 대한 주요 접촉 부위를 포함하고 있다. 결합 부위는 중첩된 것으로 보이거나 서로 별개이다; HRV 결합도 역시 2가 양이온 의존성이 부재하여 LFA-1과 다르다. 비록 LFA-1이 인테그린인지만, ICAM-1 중의 RGD 또는 RGD-유사 서열을 인지하지 못한다. 전반적으로, 분석 결과는 결합 부위 ICAM-1을 선택함에 있어서 리노바이러스가 LFA-1을 의태함으로써, 이것이 진화상 적응 부위로서의 가능성을 증가시킨다는 것을 암시하고 있다.

[실시예 9]

[리노바이러스 감염을 억제하는 ICAM-1의 가용성 작용성 유도체]

상기에서 논의된 바와 같이, 리노바이러스는 피코나바이러스과에 속하며, 일반적인 감기의 원인이다[참조: Sperber, S.J. et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* 32: 409-419(1988)]. 리노바이러스 및 콕사키바이러스의 대다수(피코나바이러스 역시)가 사람 세포상에서 일반적인 세포 표면 수용체 역할을 하며[참고: Staunton, D.E. et al. *Cell* 56: 849-853(1989); Greve, J. M. et al., 56: 839-847(1989)]. 항-ICAM-1 항체는 주요 그룹 리노바이러스가 세포에 결합하는 것을 차단할 수 있다. 이런 발견의 관점에서, 주요 그룹 리노바이러스가 세포에 결합하는 것을 차단하는 가용성 ICAM-1 작용성 유도체의 능력이 조사됐다.

상기에서 논의된 바와 같이, 세포질 도메인이 결여된 ICAM-1의 절단된 가용성 유도체를 제조하기 위해, 쿨켈의 방법에 근거한 올리고뉴클레오타이드-지시된 돌연변이 유발을 이용하여 프레임내 정지 코돈(Dcyt 및 D5 사이)에 발생(생성)시켰다[참조: Kunkel, T.A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 488-492(1985)], 이는 피터슨(Peterson) 및 시이드(Seed)가 변형시킴(Peterson, A. et al., *Cell* 53: 65-72(1987))]. 이 실험에서, Y451 E/F TAG로 명명된 돌연변이체 ICAM-1의 유전자의 형성이 이루어졌으며, 이는 결국 발현으로 돌연변이체가 잘려지고 분비된 형태의 ICAM-1(sICAM-1)을 생성하는 결과로 이어졌다(실시예 8 참고).

햄스터 DHFR 유전자, 및 프로모터, 스플라이싱 시그널 및 SV40 초기 영역으로부터의 폴리아데닐화 시그널에 의해 조절되는 상기-기술된 돌연변이체 ICAM-1 cDNA의 암호화 영역으로 구성된 발현 벡터가 작성되었다. 햄스터 DHFR 유전자는 플라스미드 pBR322DHFR을 위해 FspI 및 Hind III로 분해하여 분리했고[참조: Mulligan, R.C. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 2072-2076(1981)], 이어서 pSV2gpt내로 평활-말단 연결하여[참조: Mitchell, P.J. et al., *Mol. Cell. Biol.* 6: 425-440(1986)] BamHI/Hind III로 절단한다. 돌연변이체 sICAM-1(가용성 ICAM-1) cDNA는 NotI로 분해하여 분리한다. 말단은 클레나우(Klenow)를 사용하여 충전시키고, 분자들은 Hind III로 분해시킨다. 분자들은 다시 pBR322DHFR 발현벡터내로 연결한다(Apal로 분해하여 제조하고, 말단은 다시 클레나우(Klenow)로 충전시키고, gpt 유전자를 제거하기 위해 Hind III로 분해시킨다). 그러므로, sICAM-1 유전자는 SV40-근거한 발현 벡터내에서 햄스터 DHFR 유전자와 물리적으로 연결된다.

완성된 벡터는, 인산칼슘 공침전 방법을 사용하여 차이니스 햄스터 난소(CHO) K1 DUX-B11 세포에 형질감염시킨다[참조: Graham, F.L. et al., *Virology* 52: 456-467(1973)]. 비선택 배지에서 이틀간 성장시킨 후, 세포들은 0.05 내지 2  $\mu$ M의 메토트렉세이트를 함유하고 있으나 하이포크산틴 및 티미딘이 결핍된 선택배지에서 계대배양시킨다. 그후 클론을 분리하고, 아클론한 다음 엘리사(ELISA)에 의해 sICAM-1 생성을 검사한다. 가장 많은 양의 sICAM-1을 분비한 콜로니를 다시 추가로 2회 유전자 증폭시켜, CHO 118A로 명명된 안정한 세포주를 유도한다. 이 세포주(이는 sICAM-1의 바람직한 공급원)는 sICAM-1을 배양 상층액으로 약 1  $\mu$ g/ml를 분비한다.

sICAM-1은, 항-ICAM-1 모노클로날 항체 R6.5를 사용하여 CHO 118A의 상층액으로부터 면역친화성 크로마토그래피에 의해 정제한다. 이를 위해서, R6.5는, 제조자의 지시에 따라서, 포장된 수지 ml당 5mg의 최종 농도에 달하도록 CNBr-활성화된 세파로스 4B(Pharmacia LKB)에 공유결합으로 커플링된다. 모든 크로마토그래피 단계는 4°C에서 실시하고, 모든 완충액은 0.2U/ml 아프로티닌 및 1mM 페닐메틸설포닐 플루마이드를 함유한다. 약 1mg의 sICAM-1을 함유한 1ℓ의 여과된 상층액을 유동속도 1mg/분에서 R6.5-세파로스의 30ml의 컬럼에 부하한다. 그런 후, 이 컬럼을 200ml의 10mM 트리스/0.15M NaCl로 2.5ml/분의 유동속도로 세척하여 비결합된 물질을 제거한다. 결합된 sICAM-1은, 50mM 트리에틸아민/0.15M NaCl/pH 11.0으로 유동속도 1ml/분으로 용출시킨다. 분획물을 수거하고, 1M 트리스, pH 6.0의 첨가에 의해 즉시 중화시켜 최종농도가 20mM이 되게 한다.

용출된 ICAM-1을 함유하는 분획물은 10% 내지 15%의 폴리아크릴아미드 구배겔상에서 SDS-PAGE로 동정하고(확인하고), 이어 은 염색한다. 파마시아 파스트겔(Pharmacia Phastgel) 시스템 및 제조자의 지시에 따라 은 염색 키트를 이용하여 전기용동 및 염색을 실시한다. sICAM-1을 포함하는 분획물을 모으고 센트리콘-30 미세농축기(Centricon-30 microconcentrators; Amicon, Danvers, MA)를 사용하여 약 10배까지 농축한다.

정제된 sICAM-1의 한 배치의 단백질 함량은 제조자의 지시에 따라 바이오-라드 단백질 분석(Bio-Rad Protein Assay)을 사용하여 결정하고[참조: Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA], 참고 표준물로 쓰기 위해 이 물질을 분취량으로 냉동시킨다. 이어서, 샘플내의 sICAM-1의 농도는 이들 참고 표준물 및 두가 지 항-ICAM-1 모노클로날 항체, 즉 R6.5 및 R6.1[이들은 비중첩성 에피토프와 결합(참조: Marlin, 미발표 데이터)]을 사용하여 샌드위치 타입의 엘리사내에서 측정되었다[참조: Rothlein, R. et al., *J. Immunol.* 141: 1665-1669(1998)]. R6.1은 10  $\mu$ g/ml 용액의 100  $\mu$ l를 37°C에서 1시간 동안 배양하여 96-웰

플레이트(Nunc Immuno-plate)중의 플라스틱에 결합시킨다. 하기의 각 단계는 37℃에서 20분간 배양한 100 $\mu$ l의 시약을 사용하여 실시하고, 이어서 인산염으로 완충시킨 생리식염수로 세척한다: (1) 참고 표준 sICAM-1 또는 미지의 물질의 연속 희석액에 대한 결합, (2) 바이오틴화된 R6.5(1 $\mu$ g/ml)의 결합 및 (3) 제조사의 추천 농도에서, 고추 냉이 퍼옥시다제-접합된 스트렙타아비딘(Zymed Laboratories, South San Francisco, CA)의 결합. 기질 ABTS(Zymed)의 첨가 및 실온에서 20분간 배양후, 410nm에서의 흡광도를 측정한다. sICAM-1의 농도는 참조 표준 곡선과 비교하여 결정한다.

방사선 표지된 리노바이러스 결합 분석은 아브라함 및 콜로노의 방법을 변형시켜 수행한다[참조: Abraham, G. et al., J. Virol. 51: 340-345(1984)]. 간단하게, 헬라(Hela) 세포를 HRV14로 20mM MgCl 및 2mM 글루타민으로 보충된 메티오닌이 없는 RPMI 1640중에서 4 내지 6시간 동안 감염시키고, 이어서 통상의 세포병리 효과(cytopathic effect)가 관찰될 때까지 2% 태아 송아지 혈청 및 100 $\mu$ Ci/ml[S]-메타오닌을 함유하는 동일한 배지에서 배양한다(통상 감염후 18시간). 동결과 해동의 3주기후, 상층액중의 바이러스를 폴리에틸렌 글리콜로 침전시키고, 원심분리시켜 회수한다. 공지된 방법의 변형에서, 방사선 표지된 바이러스는 30% 수크로즈 단계 구배를 통한 펠렛화로 회수한다(Beckman SW41 회전기중에서 34,900rpm으로 2시간 동안). 헬라 세포에 대한 방사선 표지된 바이러스(1 $\times$ 10cpm)의 결합(융합성 24-웰 플레이트)은 전술한 아브라함 및 콜로노[참조: Abraham, G. et al., J. Virol. 51: 340-345(1984)]의 방법에 따라 실시했으나, 단 신틸레이션 계수를 하기전에 세포 및 결합된 바이러스를 용해시키기 위해 1% 트리톤 X-100 및 뜨거운 9M 우레아를 사용한 연속 세척을 사용한다. 전형적인 실험에서는 투입된 cpm의 약 25% 내지 30%가 세포와 결합한다.

상술한 첫번째 정제 과정을 사용하여 sICAM-1의 밀리그램 상당량을 95% 이상의 순도로 정제한다. 정제된 sICAM-1은 뚜렷한 상대적 분자량(Mr) 82,000을 갖고 있으며, 다섯 개의 세포외 Ig-유사 도메인을 모두 함유하는 분자의 예상된 크기와 일치한다. 세가지 서로 다른 모노클로날 항체에 결합한 정제된 sICAM-1은 막-결합 ICAM-1(mICAM-1)인 RR1/1, R6.5 및 CL203에 대해서 생겨된 것이다. 이들 항체들은 경쟁 결합 분석에 의해 평가된 것과 같은 표상학적으로 뚜렷한 부위에 결합하며, sICAM-1에 대한 이들의 결합은 이것이 천연 mICAM-1과 비슷한 전체적인 형상을 유지하고 있음을 암시하는 것이다.

리노바이러스 감염의 억제제로서 작용하는 정제된 sICAM-1의 능력은 시험관 내에서 바이러스 세포병리 효과(CPE) 분석을 통해 정량적으로 측정된다[참조: Staunton, D.E. et al., Cell 56: 849-853(1989)].

이 실험을 위하여, sICAM-1의 지정된 농도의 존재하에서(또는 동일한 정제작업으로부터 동량의 완충액 대조군의 희석액) 주요 그룹 혈청액 HRV54(100 TCID<sub>50</sub>)을 헬라 세포에 플레이팅시키고, 전술한 바와 같이 4일후에 세포병리 효과를 측정한다[참조: Staunton, D.E. et al., Cell 56: 849-853(1989)].

제10도에 나타난 것과 같이, sICAM-1은 주요 그룹 사람 리노바이러스 군주 54(HRV54)의 효능있는 억제제이다: 1 $\mu$ g/ml의 sICAM-1은 현저하게 CPE를 억제하며(약 50%), 90% 이상의 억제는 10 $\mu$ g/ml의 농도에서 수득된다. 대조적으로, sICAM-1 피크에 근접한 칼럼 분획으로부터 유래된 완충액 대조군은 전혀 효과가 없다.

sICAM-1에 의한 억제 특이성은, 리노바이러스의 대표적인 2개의 주요 및 소아그룹, 다른 피코나바이러스, 전혀 관련이 없는 봉입된 DNA 바이러스인 헤르페스심플렉스 바이러스 타입-1(HSV-1)을 사용하여 시험한다.

이 실험을 위해서, 지정된 바이러스(100 TCID<sub>50</sub>)과 함께 정제된 sICAM-1(5 $\mu$ g/ml)을 헬라 세포상에 플레이팅시키고, 4일후에 세포병리 효과를 측정한다: HRV54(주요 그룹 리노바이러스), HRV2(TH 그룹 리노바이러스), Cox. A13(콕사키 A13, 주요 그룹 수용체를 사용하는 피코나바이러스), Cox. B1(콕사키 B1, 주요 그룹 수용체를 사용하지 않음), 폴리(폴리오바이러스 1), HSV-1(헤르페스 심플렉스 바이러스, 타입-1).

제11도에 나타난 것과 같이, sICAM-1은 HRV54를 억제하지만, 세포 수용체로서 ICAM-1을 이용하지 않는 소 그룹 군주인 HRV2에는 현저한 효과를 전혀 갖지 않는다. 또한, sICAM-1은, 수용체로서 ICAM-1을 사용하는 것으로 알려진 또다른 피코나바이러스인 콕사키 A13에 의한 감염을 억제한다[참조: Colonno, R.J. et al., p. 93-102, Positive Strand RAN Viruses, (Alan R. Lis, Inc.)]. 이와 달리, sICAM-1은 폴리오바이러스, 콕사키 B1(ICAM-1을 통해 결합하지 않는 피코나바이러스) 또는 HSV-1을 억제하지 않는다.

바이러스 억제의 특이성은 sICAM-1이, 바이러스 복제를 보조하는 세포의 능력에 미치는 통상의 효과를 통해 감염을 방해하는 것이 아니라, 비리온결합의 억제를 통해 억제한다는 점을 지시하고 있다. 이같은 사실은 S-메티오닌-표지된 바이러스 결합 분석을 이용한 바이러스 결합에 미치는 sICAM-1의 영향을 측정함으로써 결정할 수 있다.

이 실험을 위해서, [S]-메티오닌 표지된 HRV14를 200 $\mu$ g/ml에서 크로마토그래피 완충액 대조군인 지정된 농도의 sICAM-1 또는 항-ICAM-1 모노클로날 항체 CL203 또는 R6.5와 혼합한다. 앞서 제시한 바와 같이, 항체 R6.5는 ICAM-1이 LFA-1이 HRV54와 상호작용하는 것을 억제하지만, 항체 CL203은 그렇지 않다[참조: Staunton, D.E. et al., Cell 56: 849-853(1989)]. 4℃에서 30분간 예비배양한 후, 혼합물을 헬라 세포에 플레이팅하고, 세척후 결합된 cpm을 측정한다.

제12도에 나타난 바와 같이, sICAM-1은 투여-의존 방식으로 HRV14(주요 리노바이러스 아그룹)의 결합을 억제하지만, 완충액 대조군은 아무런 효과도 갖지 않았다. 양상 대조군 항-ICAM-1 Mab R6.5 역시 효과적이었으나, 음성 대조군 Mab CL203(이것은 ICAM-1에 결합하지만, 작용을 억제하지 않는다)은 전혀 효과를 갖지 않았다[참조: Staunton, D.E. et al., Cell 56: 849-853(1989)]. 바이러스 결합분석은 CPE 분석보다 실질적으로 고농도의 바이러스 입자를 사용한다는 점에 주목해야만 하며, 이는 CPE에 비해 보다 낮은 정보의 결합 억제를 설명할 수 있다.

다량의 정제된 sICAM-1을 제조할 수 있는 능력은 X-선 결정학적 연구 및 분자의 3차원 구조의 분석을 가능케 한다. 정제된 sICAM-1의 사용은 항-리노바이러스 제제의 설계 및 검출의 촉진을 위한 분석법을 발전시킬 수 있다.

이들 실험들은 sICAM-1이 주요 그룹 리노바이러스 감염의 잠재적 및 특이적 억제제임을 보여주고 있다.

sICAM-1은 주요 바이러스인 HRV54를 억제할 수 있는 것으로 밝혀졌으나, ICAM-1을 수용체로서 사용하지 않는 리노바이러스의 소그룹의 한 구성원인 HRV2는 억제하지 못한다. sICAM-1의 항-바이러스 활성도는 sICAM-1 또는 이의 작용성 유도체중 하나가 항-바이러스 치료법에 사용될 수 있음을 보여주고 있다. 바이러스상의 ICAM-1 결합 부위는 고도로 보존되어 있으며[참조: Rossman, M.G., J. Biol. Chem. 264: 14587-14590(1989)], 돌연변이를 일으킬 수 있는 그들의 능력이 기능상 억제되어 있는 듯 하다. 그러므로, ICAM-1-바이러스 상호작용의 부위에서 지시된 약제는 바이러스 감염의 민감한 첫번째 단계에 간섭하고, 약재 내성 변이체의 생성을 통해 중화작용을 피하려 하는 바이러스의 한정된 능력과 결합한다는 2가지 이점의 가질 수 있다.

데이터는 sICAM-1이 시험관내에서 리노바이러스 주요 그룹의 감염성을 차단할 수 있음을 입증해 보이고 있으며, sICAM-1이 리노바이러스 감염의 악독화 또는 억제하는 결과로 치료상의 효용을 갖고 있음을 나타내고 있다.

본 발명이 본 발명의 특정 양태들과 관련하여 기술되었으나, 그것은 더욱 변형시킬 수 있음을 이해하게 될 것이며, 본 출원은 일반적으로 본 발명의 원리 및 본 발명이 속해있는 분야내에서 공지 또는 통상 시행되거나, 첨부한 특허청구범위의 범주내에 드는 상기 내용중에서 중요한 측면을 응용하는 바와 같은 본 발명의 변형, 용도 또는 적용을 포함하는데 그 의도를 두고 있다.

### (57) 청구의 범위

#### 청구항 1

활성 성분으로서 (1) ICAM-1의 도메인 1,2,3,4 및 5, (2) ICAM-1의 도메인 1,2,3 및 4, (3) ICAM-1의 도메인 1,2 및 3, (4) ICAM-1의 도메인 1 및 2 및 (5) ICAM-1의 도메인 1로 이루어진 그룹중에서 선택되는 ICAM-1의 도메인을 포함하는 리노바이러스 결합 부위를 갖는 폴리펩타이드를 포함하는, 피코나비리데(Picornaviridae)속의 주요 혈청형의 리노바이러스 및 그룹 A 콕사키바이러스(Coxsackievirus)로 이루어진 그룹중에서 선택되는 바이러스 감염 치료용 항-바이러스제.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 바이러스가 피코나비리데 속의 주요 혈청형의 리노바이러스인 항-바이러스제.

#### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 폴리펩타이드가 가용성인 항-바이러스제.

#### 청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 폴리펩타이드가 아미노산 Q1T, R13, D26QPK, Q27, K39KE, G46NN, R49KV, Q58, D60, D71, K77T, N103, A115N, 및 R166PQ 중 하나 이상을 함유하는 항-바이러스제.

#### 청구항 5

제1항에 있어서, 폴리펩타이드가 아미노산 A3GL, L27, A34, H73, T73 및 Q118중 하나 이상을 함유하는 항-바이러스제.

#### 청구항 6

a) 바이러스를 함유하는 것으로 추정되는 생물학적 샘플을 (1) ICAM-1의 도메인 1,2,3,4 및 5, (2) ICAM-1의 도메인 1,2,3 및 4, (3) ICAM-1의 도메인 1,2 및 3, (4) ICAM-1의 도메인 1 및 2 및 (5) ICAM-1의 도메인 1로 이루어진 그룹중에서 선택되는 ICAM-1의 도메인을 포함하는 리노바이러스 결합 부위를 갖는 검정가능하게 되는 표지된 폴리펩타이드와 함께 항온처리한 후, b) 검정가능하게 표지된 폴리펩타이드가 바이러스에 결합되었는지를 측정함을 특징으로 하여, 피코나비리데속의 주요 혈청형의 리노바이러스 및 그룹 A 콕사키바이러스로 이루어진 그룹중에서 선택되는 바이러스의 감염 여부를 진단하는 방법.

#### 청구항 7

제6항에 있어서, 바이러스가 피코나비리데 속의 주요 혈청형의 리노바이러스인 방법.

#### 청구항 8

제6항 또는 제7항에 있어서, 폴리펩타이드가 가용성인 방법.

#### 청구항 9

제6항에 있어서, 표지된 폴리펩타이드가 아미노산 Q1T, R13, D26QPK, Q27, K39KE, G46NN, R49KV, Q58, D60, D71, K77T, N103, A115N, 및 R166PQ 중 하나 이상을 함유하는 방법.

#### 청구항 10

제6항에 있어서, 표지된 폴리펩타이드가 아미노산 A3GL, L27, A34, H73, T73 및 Q118중 하나 이상을 함유하는 방법.

#### 청구항 11

제9항 또는 제10항에 있어서, 표지된 폴리펩타이드가 가용성인 방법.

#### 청구항 12

(1) ICAM-1의 도메인 1,2,3,4 및 5, (2) ICAM-1의 도메인 1,2,3 및 4, (3) ICAM-1의 도메인 1,2 및 3, (4) ICAM-1의 도메인 1 및 2 및 (5) ICAM-1의 도메인 1로 이루어진 그룹중에서 선택되는 ICAM-1의 도메인을 포함하는 리노바이러스 결합 부위를 갖고, 아미노산 Q1T, R13, D26QPK, Q27, K39KE, G46NN, R49KV, Q58, D60, D71, K77T, N103, A115N 및 R166PQ중 하나 이상을 갖는 폴리펩타이드.

#### 청구항 13

제12항에 있어서, 가용성인 폴리펩타이드.

#### 청구항 14

면역글로불린의 일부에 결합된 제12항 또는 제13항에 따른 폴리펩타이드를 포함한 키메라 분자.

#### 청구항 15

(1) ICAM-1의 도메인 1,2,3,4 및 5, (2) ICAM-1의 도메인 1,2,3 및 4, (3) ICAM-1의 도메인 1,2 및 3, (4) ICAM-1의 도메인 1 및 2 및 (5) ICAM-1의 도메인 1로 이루어진 그룹중에서 선택되는 ICAM-1의 도메인을 포함하는 리노바이러스 결합 부위를 갖고, 아미노산 A3GL, L27, A34, H73, T73 및 Q118중 하나 이상을 갖는 폴리펩타이드.

#### 청구항 16

제15항에 있어서, 가용성인 폴리펩타이드.

#### 청구항 17

면역글로불린의 일부에 결합된 제15항 또는 제16항에 따른 폴리펩타이드를 포함하는 키메라 분자.

#### 청구항 18

제1항 또는 제2항에 있어서, ICAM-1의 세포막 도메인, 트랜스막 도메인 또는 이들 도메인이 모두 결실된 바이러스 감염 치료용 항-바이러스제.

#### 청구항 19

제1항 또는 제2항에 있어서, 위치 452의 아미노산 티로신(Y)이 페닐 알라닌(F)로 치환되고 위치 453의 아미노산 글루탐산(E)이 해독 종결 코돈(TAG)로 치환된 바이러스 감염 치료용 항-바이러스제.

#### 청구항 20

활성 성분으로서 (1) ICAM-1의 도메인 1,2,3,4 및 5, (2) ICAM-1의 도메인 1,2,3 및 4, (3) ICAM-1의 도메인 1,2 및 3, (4) ICAM-1의 도메인 1 및 2 및 (5) ICAM-1의 도메인 1로 이루어진 그룹중에서 선택되는 ICAM-1의 도메인을 포함하는 리노바이러스 결합 부위를 갖는 폴리펩타이드를 포함하는, 피코나비리대 속의 주요 혈청형의 리노바이러스 및 그룹 A 콕사키바이러스로 이루어진 그룹중에서 선택되는 바이러스 감염 진단용 항-바이러스제.

#### 청구항 21

제20항에 있어서, 바이러스가 피코나비리대 속의 주요 혈청형의 리노바이러스인 항-바이러스제.

#### 청구항 22

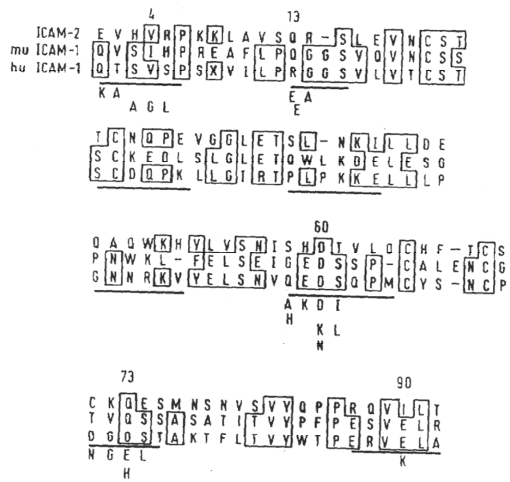
제20항 또는 제21항에 있어서, 위치 452의 아미노산 티로신(Y)이 페닐 알라닌(F)로 치환되고 위치 453의 아미노산 글루탐산(E)이 해독 종결 코돈(TAG)로 치환된 바이러스 감염 진단용 항-바이러스제.

**도면**



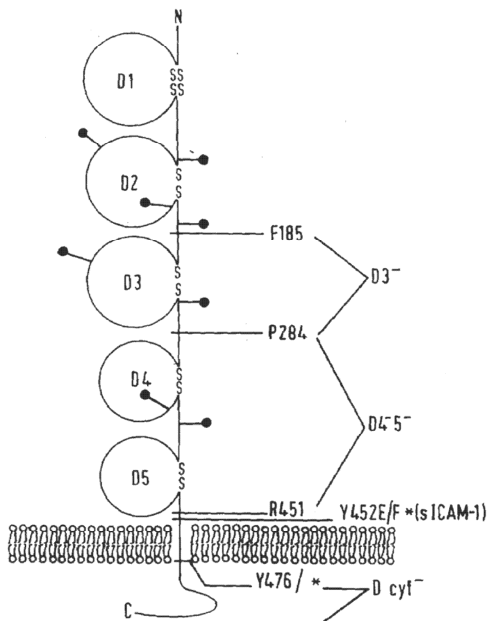
도면3

ICAM 아미노 말단 영역의 상동성

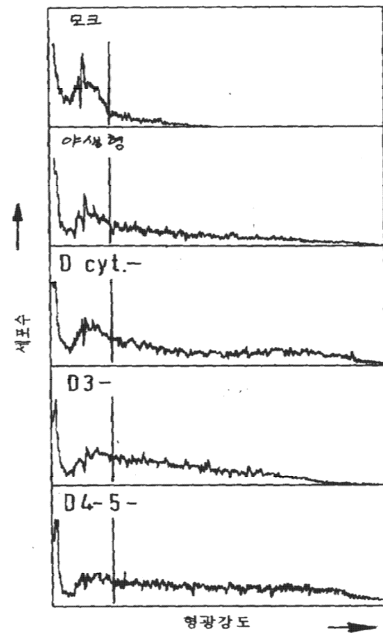


도면4

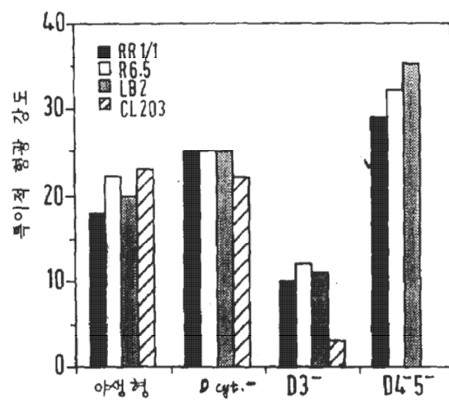
ICAM-1 결실돌연변이체



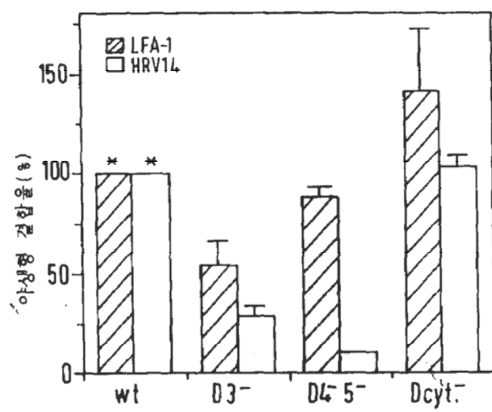
도면5



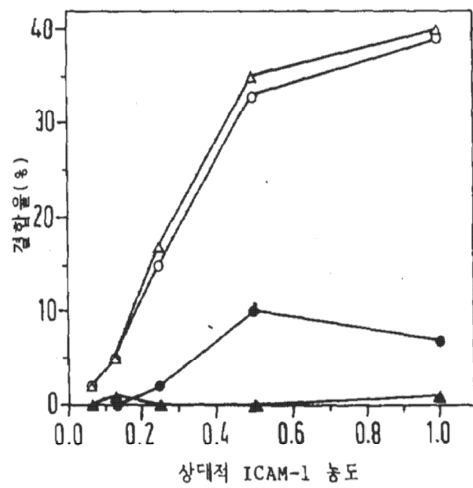
도면6



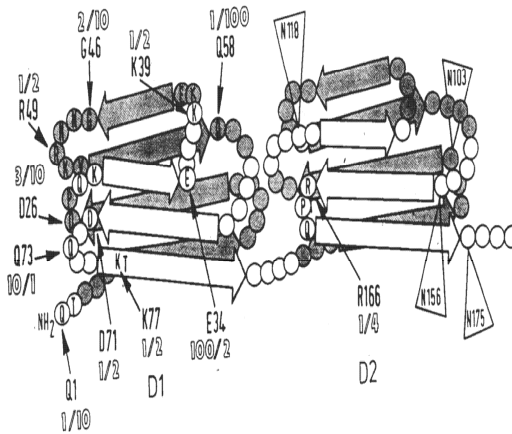
도면7



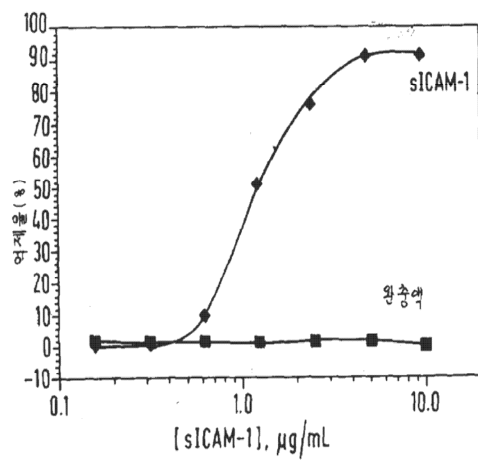
도면8



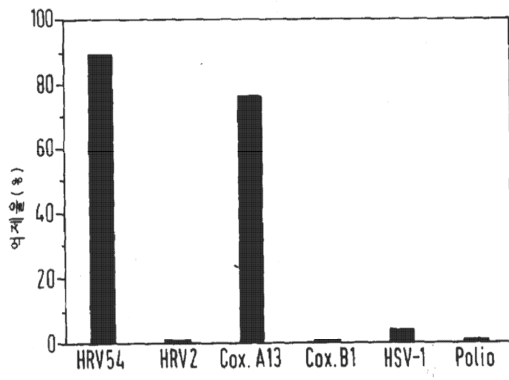
도면9



도면10



도면11



도면12

