



(12) PATENT

(19) NO

(11) 329976

(13) B1

NORGE

(51) Int Cl.

C12N 15/62 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C07K 14/715 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20011513	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1999.09.22 PCT/US1999/22045
(22)	Inng.dag	2001.03.23	(85)	Videreføringsdag	2001.03.23
(24)	Løpedag	1999.09.22	(30)	Prioritet	1998.09.25, US, 101858 1999.05.19, US, 313942
(41)	Alm.tilgj	2001.05.25			
(45)	Meddelt	2011.01.31			
(73)	Innehaver	Regeneron Pharmaceuticals Inc, 777 Old Saw Mill River Road, US-NY10591 TARRYTOWN, USA George D Yancopoulos, 1519 Baptist Church Road, US-NY10598 YORKTOWN HEIGHTS, USA Neil Stahl, Carmel, NY, USA			
(72)	Oppfinner				
(74)	Fullmektig				Oslo Patentkontor AS, Postboks 7007 Majorstua , 0306 OSLO, Norge
(54)	Benevnelse	Reseptor-baserte antagonist samt fremgangsmåte ved fremstilling og anvendelse derav			
(56)	Anførte publikasjoner	EP 0835939 A2, WO 9611213 A1, WO 9511303 A1, EP 0835939 A2			
(57)	Sammendrag				

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer et fusjonspolypeptid som er i stand til å binde et cytokin for å danne et ikke-funksjonelt kompleks. Den tilveiebringer også en nukleinsyresekvens som koder fusjonspolypeptidet, samt fremstillingsmetoder og anvendelser av fusjonspolypeptidet.

Foreliggende oppfinnelse vedrører et nukleinsyremolekyl som koder for et fusjonspolypeptid mellom IL-1-reseptorkomponenter og en multimeriserende komponent som angitt i krav 1, samt multimeren ifølge krav 9, ekspresjonsvektor ifølge krav 12, vektorsystem ifølge krav 13 og fremgangsmåte for fremstilling av fusjonspolypeptidet ifølge krav 16.

BAKGRUNNEN FOR OPPFINNELSEN

Skjønt de ble oppdaget på grunn av forskjellige biologiske aktiviteter, utgjør den ciliare neurotrofiske faktor (CNTF), den leukemi-inhibitoriske faktor (LIF), onkostatin M (OSM) og interleukin-6 (IL-6) en klart definert familie av cytokiner (omtalt heri som "CNTF-familien" av cytokiner). Disse cytokiner er gruppert sammen på grunn av sine fjerne strukturelle likheter [Bazan, J. Neuron 7: 197-208 (1991); Rose og Bruce, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 8641-8645 (1991)], og, kanskje enda viktigere, fordi de deler "β"-signal-transduserende reseptorkomponenter [Baumann, et al., J. Biol. Chem. 265:19853-19862 (1993); Davis, et al., Science 260: 1805-1808 (1993); Gearing et al., Science 255:1434-1437 (1992); Ip et al., Cell 69: 1121-1132 (1992); Stahl, et al., J. Biol. Chem. 268: 7628-7631 (1993); Stahl og Yancopoulos, Cell 74: 587-590 (1993)]. Reseptoraktivering av denne familie av cytokiner er et resultat av enten homo- eller hetero-dimerisering av disse β-komponenter [Davis, et al. Science 260: 1805-1808 (1993), Murakami, et al., Science 260: 1808-1810 (1993); Stahl og Yancopoulos, Cell 74: 587-590 (1993)]. IL-6-reseptoraktivering krever homodimerisering av gp130 [Murakami, et al. Science 260: 1808-1810 (1993), Hibi, et al., Cell 63: 1149-1157 (1990)], et protein opprinnelig identifisert som IL-6-signaltransduseren [Hibi, et al., Cell 63: 1149-1157 (1990)]. CNTF, LIF og OSM-reseptoraktivering er et resultat av heterodimerisering mellom gp130 og et annet gp130-kognatisk protein kjent som LIFRβ [Davis, et al., Science 260: 1805-1808 (1993)], hvilket opprinnelig ble identifisert ved sin evne til å binde LIF [Gearing et al., EMBO J. 10: 2839-2848 (1991)].

I tillegg til β-komponentene krever noen av disse cytokiner også spesifisitetsbestemmende "α"-komponenter som er mer begrenset i sin vevsdistribusjon enn β-komponentene, og de bestemmer således de cellulære mål for de individuelle cytokiner [Stahl og Yancopoulos, Cell 74: 587-590 (1993)]. Således er LIF og OSM bredt virkende faktorer som muligens bare krever nærvær av gp130 og LIFRβ på reagerende celler, mens CNTF krever CNTFRα [Stahl og Yancopoulos, Cell 74: 587-590 (1993)], og IL-6 krever IL-6Rα [Kishimoto, et al.,

Science 258: 593-597 (1992)]. Både CNTFR α (Davis et al., Science 259:1736-1739 (1993) og IL-6R α [Hibi, et al. Cell 63:1149-1157, Murakami, et al., Science 260:1808-1810 (1990); Taga, et al., Cell 58:573-581 (1989)] kan fungere som løselige proteiner, i samsvar med den forestilling at de ikke samhandler med
 5 intracellulære signaliserende molekyler, men at de tjener til å hjelpe sine ligander til å samhandle med de formålstjenlige signaltransduserende β -underenheter [Stahl og Yancopoulos, Cell 74: 587-590 (1993)].

Ytterligere bevis fra andre cytokinsystemer støtter også den formodning at dimerisering tilveiebringer en felles mekanisme ved hvilken alle cytokinreseptorer
 10 initierer signaltransduksjon. Veksthormon (GH) tjener som kanskje det beste eksempel i denne henseende. Krystallografiske studier har røpet at hvert GH-molekyl inneholder to forskjellige reseptorbindingssteder, av hvilke begge gjenkjennes av det samme bindingsdomene i reseptoren, hvilket gjør det mulig for et enkelt GH-molekyl å oppta to reseptormolekyler [de Vos, et al., Science 255:
 15 306-312 (1992)]. Dimerisering opptrer sekvensielt, ved at sete 1 på GH-molekylet først bindes til ett reseptormolekyl, etterfulgt av binding av sete 2 til et andre reseptormolekyl [Fuh, et al., Science 256: 1677-1680 (1992)]. Studier med erythropoietin-reseptoren (EPO) bekrefter også at dimeriseringen i reseptor-aktiveringen er viktig, idet EPO-reseptorer kan konstitutivt aktiveres ved en enkelt
 20 aminosyreforandring som introduserer en cysteinrest og resulterer i disulfidbundne homodimerer [Watowich, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:2140-2144 (1992)].

I tillegg til homo- eller hetero-dimerisering av β -underenheter som det kritiske trinn for reseptoraktivering, er et annet viktig trekk at dannelse av det endelige reseptor-kompleks av CNTF-familien av cytokiner opptrer via en mekanisme hvorved
 25 liganden suksessivt bindes til reseptorkomponenter på ordnet måte [Davis, et al. Science 260:1805-1818 (1993); Stahl og Yancopoulos, Cell 74: 587-590 (1993)]. Således bindes CNTF først til CNTFR α for å danne et kompleks som deretter binder gp130 for å danne et mellomprodukt (her kalt $\alpha\beta$ 1-mellomproduktet) som ikke er signalkompetent fordi det har bare en enkelt β -komponent, før det til slutt
 30 rekrutterer LIFR β for å danne en heterodimer av β -komponenter som deretter initierer signaltransduksjon. Selv om et lignende mellomprodukt inneholdende IL-6 bundet til IL-6R α , og et enkelt molekyl av gp130 ikke er blitt direkte isolert, har vi postulert at det virkelig eksisterer analogt med sin fjerne slektning, CNTF, samt det faktum at det endelige aktive IL-6-reseptorkompleks rekrutterer to gp130-
 35 monomerer. Alt i alt førte disse funn til et forslag for strukturen for et generisk cytokinreseptorkompleks (Figur 1) i hvilket hvert cytokin kan ha opp til 3

reseptorbindingssteder: ett sete som bindes til en eventuell α -spesifisitetsbestemmende komponent (α -sete), ett sete som bindes til den første β -signal-transduserende komponent (β_1 -sete), og ett sete som bindes til den andre β -signal-transduserende komponent (β_2 -sete) [Stahl og Yancopoulos, Cell 74: 587-590 (1993)]. Disse 3 seter anvendes på sekvensiell måte, hvor det siste trinn i kompleksdannelsen – hvilket resulterer i β -komponentdimerisering – er kritisk for initiering av signaltransduksjon [Davis, et al. Science 260:1805-1818 (1993)]. Kjennskap til detaljene i reseptoraktivering og forekomsten av det ikke-funksjonelle β_1 -mellomprodukt for CNTF har ført til det funn at CNTF er en høyaffinitets-antagonist for IL-6 under visse omstendigheter og tilveiebringer det strategiske grunnlag for utforming av ligand- eller reseptorbaserte antagonister for CNTF-familien av cytokiner, som beskrevet mer detaljert nedenfor.

Straks cytokinbinding induserer reseptorkompleksdannelse, aktiverer dimeriseringen av β -komponenter intracellulær tyrosinkinaseaktivitet som resulterer i fosforylering av mange forskjellige substrater [Ip, et al. Cell 69:121-1132 (1992)]. Denne aktivering av tyrosinkinase synes å være kritisk for nedstrøms foreteelser, siden inhibitorer som blokkerer tyrosinfosforyleringene, også forhindrer senere foreteelser, så som geninduksjoner [Ip, et al., Cell 69:121-1132 (1992); Nakajima og Wall, Mol. Cell. Biol. 11:1409-1418 (1991)]. I den senere tid har vi påvist at en nylig oppdaget familie av ikke-reseptortyrosinkinaser som omfatter Jak1, Jak2 og Tyk2 (omtalt som Jak/Tyk-kinasene) [Firmbach-Kraft, et al., Oncogene 5:1329-1336 (1990); Wilks, et al., Mol. Cell. Biol. 11: 2057-2065 (1991)] og som er involvert i signaltransduksjon med andre cytokiner [Argetsinger, et al., Cell 74:237-244 (1993); Silvennoinen, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:8429-8433 (1993); Velazquez, et al., Cell 70: 313-322 (1992); Witthuhn, et al., Cell 74:227-236 (1993)], forhåndbindes med de cytoplasmiske domener av β -underenheterne gp130 og LIFR β i fravær av en ligand, og blir tyrosinfosforylert og aktivert ved ligandaddisjon [Stahl et al., Science 263:92-95 (1994)]. Derfor synes disse kinaser å være det mest proksimale trinn i intracellulær signaltransduksjon aktivert inne i cellen som et resultat av ligandbinding utenfor cellen. Assay-systemer for klassifisering av ansamlinger av små molekyler for spesifikke agonist- eller antagonistaktiviteter basert på dette system er beskrevet nedenfor.

CNTF-familien av cytokiner spiller viktige roller i mange forskjellige fysiologiske prosesser som gir potensielle terapeutiske anvendelser for både antagonister og agonister.

Fra EP patent 0835939 A2 er det kjent fusjonsproteiner bestående av det ekstracellulære domenet av et membranospennende protein, spesielt cytokinreseptorer som IL-4- og IL-7-reseptorene, koplet til ulike deler av den konstante regionen av tung eller lett kjede i et immunoglobulin.

- 5 Fra WO 9611213 A1 er det kjent dimerer inneholdende frag-menter av IL-4-reseptorer som binder til IL-4 og fungerer som effektive inhibitorer av IL-4. Fra WO 9511303 A1 er det kjent heterodimerer som virker som antagonister av cytokiner. Dimerene omfatter det ekstracellulære domenet av den spesifisitetsbestemmende komponenten av cytokinets reseptor bundet til det
- 10 ekstracellulære domenet av den signaltransduserende komponenten av cytokinets reseptor.

OPPSUMMERING AV OPPFINNELSEN

Et formål for foreliggende oppfinnelse er å produsere cytokinantagonister som er nyttige i behandlingen av cytokinrelaterte sykdommer eller forstyrrelser.

- 15 Et annet formål med oppfinnelsen er å utvikle klassifiseringssystemer som er nyttige for å identifisere nye agonister og antagonister av cytokinreseptorer.

Et annet formål med oppfinnelsen er å utvikle klassifiseringssystemer som er nyttige for å identifisere små molekyler som virker som agonister eller antagonister av cytoine.

- 20 Et annet formål med oppfinnelsen er å utvikle klassifiseringssystemer som er nyttige for å identifisere nye agonister og antagonister av medlemmer av CNTF-familien av cytokiner.

- Et annet formål med oppfinnelsen er å utvikle klassifiseringssystemer som er nyttige for å identifisere små molekyler som virker som agonister eller antagonister
- 25 av CNTF-familien av cytokiner.

KORT BESKRIVELSE AV FIGURENE

- FIGUR 1: Ordnet binding av reseptorkomponenter i en modell av en generisk cytokinreseptor. Modellen indikerer at cytokiner inneholder opp til 3 reseptorbindingssteder og samhandler med sine reseptorkomponenter ved å binde
- 30 først den eventuelle α -komponent, etterfulgt av binding til $\beta 1$ og deretter $\beta 2$. β -

komponentene for mange cytokinreseptorer samhandler via proksimale membranområder (skraverse firkanter) med Jak/Tyk-familien av cytoplasmiske proteintyrosinkinaser. Bare ved dimerisering av β -komponenter initieres signaltransduksjon, som vist skjematisk ved tyrosinfosforyleringene (P) av β -komponentene og Jak/Tyk-kinasene.

FIGUR 2A-2E: Nukleotidsekvenskoding og avledet aminosyresekvens av fusjonspolypeptid betegnet 569 som er i stand til å binde cytokinet IL-1 for å danne et ikke-funksjonelt kompleks.

FIGUR 3: Viser at fellen 1SC569 (beskrevet i Figurene 2A-2E) er i stand til å antagonisere virkningene av IL-1 og blokkerer IL-6-produksjonen fra MRC 5-celler ved behandling med IL-1.

FIGUR 4: Human IL-1-felle blokkerer virkningene *in vivo* av eksogent administrert huIL-1. BALB/c mus ble gitt subkutan injeksjon av huIL-1 (0,3 μ g/kg) ved tidspunkt 0. Tjuefire timer før huIL-1-injeksjonen ble dyrene forhåndsbehandlet med enten vehikkel eller 150 ganger det molare overskudd av av huIL-1-fellen. To timer før avlivning (26 timer) ble musene igjen utsatt for en andre injeksjon av huIL-1 (0,3 μ g/kg, s.c.). Blodprøver ble tatt ved forskjellige tidspunkt, og serumet ble undersøkt med hensyn til IL-1-nivåene (uttrykt som middelerdi $\pm$ SEM; n=5 pr. gruppe).

20 DEATALJERT BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer et isolert nukleinsyremolekyl som koder et fusjonspolypeptid som er i stand til å binde et cytokin for å danne et ikke-funksjonelt kompleks omfattende:

- 25 (a) en interleukin-1 (IL-1) –bindende del av de ekstracellulære domene av den spesifisitetsbestemmende komponent av en IL-1-reseptor;
- (b) en IL-1-bindende del av et ekstracellulært domene av den signaltransduserende komponent av nevnte IL-1-reseptor; og
- (c) en multimeriserende komponent;

hvilken multimeriserende komponent (c) multimeriserer med en multimeriserende komponent (c) omfattet i en annen av nevnte fusjonspolypeptid for å danne en multimer av nevnte fusjonspolypeptider;

hvilken multimer binder til og fanger inn IL-1 og således virker som en antagonist for IL-1.

Med "cytokinbindende del" menes den minste del av det ekstracellulære domene som er nødvendig for å binde IL-1. Det er anerkjent av fagkyndige personer at en
 5 definerende karakteristikk av en cytokinreseptor er at det foreligger to
 fibronektinlignende domener som inneholder kanoniske cysteiner og av WSXWS-
 boksen (Bazan, J.F., 1990, PNAS 87: 6934-6938). Sekvenser som koder de
 ekstracellulære domener av den bindende komponent av IL-1-reseptor og av den
 signaltransduserende komponent av IL-1-reseptor, kan også anvendes til å
 10 opprette fusjonspolypeptidet ifølge oppfinnelsen. På lignende måte kan lengre
 sekvenser som koder større deler av komponentene av IL-1-reseptor, anvendes.
 Imidlertid tenker man seg at fragmenter som er mindre enn det ekstracellulære
 domene, vil funksjonere for å binde IL-1, og derfor omfatter oppfinnelsen fusjons-
 polypeptider omfattende den minste andel av det ekstracellulære domene som er
 15 nødvendig for å binde IL-1, som den cytokinbindende del slik som angitt i krav 9.

Oppfinnelsen omfatter en "spesifisitetsbestemmende komponent" av IL-1-reseptor og en "signaltransduserende komponent" av IL-1-reseptor. Til tross for nomenkla-
 turen som er anvendt for å betegne en spesiell komponent eller underenhet av en
 cytokinreseptor, vil en fagkyndig person *kunne* gjenkjenne hvilken komponent eller
 20 underenhet av en reseptor som er ansvarlig for å bestemme det cellulære mål i IL-
 1 og vil således vite hvilken komponent utgjør den "spesifisitetsbestemmende
 komponent".

På lignende måte, uavhengig av den anvendte nomenklatur, vil en fagkyndig
 person vite hvilken komponent eller underenhet av en reseptor som utgjør den
 25 "signaltransduserende komponent". Anvendt heri er den "signaltransduserende
 komponent" en komponent av den native reseptor som ikke er den
 spesifisitetsbestemmende komponent, og som ikke binder eller svakt binder IL-1 i
 fravær av den spesifisitetsbestemmende komponent. I den native reseptor kan den
 "signaltransduserende komponent" delta i signaliseringen.

30 Noen ytterligere eksempler på reseptorkomponenter som kan anvendes for å
 fremstille cytokinantagonister er angitt i Tabell 1. Tabell 1 angir, som et eksempel,
 noe av den ulike nomenklatur som anvendes i den vitenskapelige litteratur for å
 beskrive de komponenter som fungerer som spesifisitetsbestemmende

komponenter og de som fungerer som signaltransduserende komponenter av visse cytokinreseptorer.

TABELL 1

<u>Cytokin</u>	<u>Spesifisitetsbestemmende komponent</u>	<u>Signaltransduserende komponent</u>
Interleukin-1 (IL-1)	Type I IL-1R (ref. 8) Type II IL-1R (ref. 8) IL-1RI (ref. 11) IL-1RII (ref. 11)	IL-1R AcP (ref. 8, 11)
Interleukin-2 (IL-2)	-underenhet (ref. 2) -kjede (ref. 3) IL-2Ra (ref. 1)	(-kjede (ref. 3) (-underenhet (ref. 2) γ -kjede (ref. 3) IL-2R (ref. 1, 10) IL-2M γ (ref. 1, 10)
Interleukin-3 (IL-3)	IL-3R (ref. 1) -underenhet (ref. 2) -reseptorkomponent (ref. 5)	ϵ (ref. 1) ~ underenhet (ref. 2) -kjede (ref. 3) -reseptorkomponent (ref. 5)
Interleukin-4 (IL-4)	IL-4R (ref. 1)	γ -kjede (ref. 3) IL-2R γ (ref. 1)
Interleukin-5 (IL-5)	IL-5R (ref. 1) -underenhet (ref. 2) -reseptorkomponent (ref. 5)	ϵ (ref. 1) -underenhet (ref. 2) -kjede (ref. 3) -reseptorkomponent (ref. 5)
Granulocytisk makrofagkoloni-stimulerende faktor (GM-CSF)	-reseptorkomponent (ref. 5) -underenhet (ref. 2) GMR (ref. 1, 2)	(-reseptorkomponent (ref. 5) ~ underenhet (ref. 2) -kjede (ref. 3) ϵ (ref. 1) GMR (ref. 1, 2)

Cytokin	<u>Spesifisitetsbestemmende komponent</u>	<u>Signaltransduserende komponent</u>
Leukemi-inhiberende faktor (LIF)	LIFBP (ref. 1) -reseptorkomponent (ref. 5)	gp130 (ref. 1, 3) - reseptorkomponent (ref. 5)
Interleukin-11 (IL-11)	-kjede (ref. 4) NR1 (ref. 4)	gp130 (ref. 4)
Interleukin-15 (IL-15)	IL-15R (ref. 10)	IL-2R (ref. 10) IL-2R γ (ref. 10)
Interferon- γ (IFN γ)	IFN- γ R (ref. 7) IFN- γ RI (ref. 7)	AF-1 (ref. 7) IFN- γ R2 (ref. 7)
TGFO	Type II (ref. 6, 9)	Type I (ref. 6, 9)

Bare noen få av de mangfoldige referenser er angitt i Tabell 1, og de opplistes som følger:

1. Sato og Miyajima, Current Opinions in Cell Biology 6: 174-179 (1994) - Se side 176, linjene 9-16;
2. Miyajima, et al., Annual Review of Immunology 10: 295-331 (1992) - Se side 295, linje 4 til side 296, linje 1; side 305, siste avsnitt;
3. Kondo, et al, Science 262: 1874-1877 (1993) - Se side 1874, kolonne 1 & 2;
4. Hilton, et al, EMBO Journal 13: 4765-4775 (1994) - Se side 4766, kolonne 1, linjene 20-24;
5. Stahl og Yancopoulos, Cell 74: 587-590 (1993) - Se side 587, kolonne 2, linjene 15-22;

6. Bassing, et al, Journal of Biological Chemistry 269: 14861-14864 (1994) -
Se side 14861, kolonne 2, linjene 1-9 og 21-28;
 7. Kotenko, et al, Journal of Biological Science 270: 20915-20921 (1995) - Se
side 20915, linjene 1-5 av sammendraget;
 - 5 8. Greenfeder, et al., Journal of Biological Chemistry 270: 13757-13765 (1995)
- Se side 13757, kolonne 1, linje 6 til kolonne 2, linje 3 og kolonne 2, linjene 10-
12; side 13764, kolonne 2, siste 3 linjer og side 13765, kolonne 1, linjene 1-7;
 9. Lebrun og Vale, Molecular Cell Biology 17: 1682-1691 (1997) - Se side
1682, sammendraget linjene 2-6;
 - 10 10. Kennedy og Park, Journal of Clinical Immunology 16: 134-143 (1996) - Se
side 134, linjene 1-7 av sammendraget; side 136, col 2., linjene 1-5;
 11. Wesche, et al., Journal of Biological Chemistry 272: 7727-7731 (1997) Se
side 7731, linjene 20-26.
- Kotenko, et al. identifiserte nylig IL-10R2 (IL-10R β)-kjeden som rapporteres å
 15 skulle tjene som en tilleggskjede som er essensiell for det aktive IL-10-
 reseptorkompleks og for å initiere IL-10-induserte signaltransduksjonsforeteelser
 (S.V. Kotenko, et al., The EMBO Journal, 1997, Vol. 16: 5894-5903). Ytterligere
 cytokiner og deres reseptorer er beskrevet i Appendix II, side A:9 av
Immunobiology, The Immune System in Health and Disease, 2. utgave, av Charles
 20 A. Janeway, Jr. og Paul Travers, publisert av Current Biology Ltd./Garland
 Publishing Inc., copyright 1996.

Ved fremstilling av nukleinsyresekvensen som koder fusjonspolypeptidet ifølge
 oppfinnelsen, kodes de første, andre og tredje komponenter av fusjonspolypeptidet
 i en enkelt kjede av nukleotider som, når de uttrykkes av et vertsvektorsystem,
 25 produserer et monomert eksemplar av fusjonspolypeptidet. De således uttrykte
 monomerer multimeriserer deretter på grunn av vekselvirkningene mellom de
 multimeriserende komponenter (de tredje fusjonspolypeptidkomponenter). Ved å
 fremstille fusjonspolypeptidene på denne måte er det ikke nødvendig å rense de
 heterodimere blandinger som vil oppstå hvis de første og andre komponenter ble
 30 fremstilt som separate molekyler og deretter multimerisert. For eksempel beskriver
 U.S. Patent No. 5,470,952 utstedt 28. november 1995, fremstillingen av

heterodimere proteiner som fungerer som CNTF- eller IL-6-antagonister. Heterodimerene renses for cellelinjer som er ko-transfisert med vedkommende alfa- (α) og beta- (β) komponenter. Heterodimerene separeres deretter fra homodimerene under anvendelse av metoder, så som passiv eluering fra preparative, ikke-denaturerende polyakrylamidgeler eller under anvendelse av høytrykkskationebyttekromatografi. Behovet for dette rensetrinn unngås ved metodene ifølge foreliggende oppfinnelse.

I tillegg hevder PCT International Application WO 96/11213 publisert 18. april 1996 med tittelen "Dimeric IL-4 Inhibitors" at søkeren har fremstilt homodimerer hvori to IL-4-reseptorer er bundet ved et polymert distansestykke, og de har fremstilt heterodimerer hvori en IL-4-reseptor forbindes med et polymert distansestykke til en IL-2-reseptorgammakjede. Det polymere distansestykke som er beskrevet, er polyetylenglykol (PEG). De to reseptorkomponentene, IL-4R og IL-2R γ , uttrykkes separat og renses. PEG-behandlede homodimerer og heterodimerer fremstilles deretter ved å binde komponentene sammen under anvendelse av bifunksjonelle PEG-reagenser. Det er en fordel ved foreliggende oppfinnelse at man unngår behovet for slike tidkrevende og kostbare rense- og PEG-behandlingstrinn.

I en utførelsesform av oppfinnelsen er nukleotidfrekvensen som koder den første komponent, oppstrøms for nukleotidfrekvensen som koder den andre komponent. I en annen utførelsesform av oppfinnelsen er nukleotidfrekvensen som koder den første komponent, nedstrøms for nukleotidfrekvensen som koder den andre komponent. Ytterligere utførelsesformer av oppfinnelsen kan fremstilles hvori rekkefølgen av den første, andre og tredje fusjonspolypeptidkomponent er omordnet. Hvis for eksempel nukleotidfrekvensen som koder den første komponent, er betegnet 1, er nukleotidfrekvensen som koder den andre komponent betegnet 2, og nukleotidsekvensen for den tredje komponent er betegnet 3, deretter kan rekkefølgen av komponentene i den isolerte nukleinsyre ifølge oppfinnelsen lest fra 5' til 3', være en av de følgende seks kombinasjoner: 1,2,3; 1,3,2; 2,1,3; 2,3,1; 3,1,2; eller 3,2,1.

I foretrukne utførelsesformer av oppfinnelsen omfatter den multimeriserende komponent et immunoglobulinavledet domene. Nærmere bestemt kan det immunoglobulin-avlede domene være valgt fra gruppen bestående av Fc-domenet av IgG, den tunge kjede av IgG, og den lette kjede av IgG. I en annen utførelsesform kan den multimeriserende komponent være et Fc-domene fra hvilket de første fem aminosyrer (inklusive et cystein) er blitt fjernet for å fremstille en

multimeriserende komponent omtalt som Fc(Δ C1). Alternativt kan den multimeriserende komponent være et Fc-domene hvori et cystein innenfor de første fem aminosyrer er blitt utbyttet med en annen aminosyre, så som for eksempel serin eller alanin.

5 Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer også et fusjonspolypeptid kodet av de isolerte nukleinsyremolekyler ifølge oppfinnelsen. Fortrinnsvis er fusjonspolypeptidene i multimer form, på grunn av funksjonen av den tredje multimeriserende komponent. I en foretrukken utførelsesform er multimeren en dimer. Egnede multimeriserende komponenter er sekvenser som koder et
10 immunoglobulinholdig tungkjedet hengselområde (Takahashi et al., 1982, Cell 29:671-679); immunoglobulinholdige gensekvenser og deler derav. I en foretrukken utførelsesform av oppfinnelsen, anvendes immunoglobulinholdige gensekvenser, spesielt en som koder Fc-domenet, for å kode den tredje multimeriserende komponent.

15 Foreliggende oppfinnelse omfatter også en vektor som omfatter nukleinsyremolekylet ifølge oppfinnelsen, som beskrevet heri.

Det tilveiebringes også en ekspresjonsvektor omfattende et nukleinsyremolekyl ifølge oppfinnelsen som beskrevet heri, hvori nukleinsyremolekylet er operativt forbundet til en ekspresjonkontrollsekvens. Det tilveiebringes også et verts-
20 vektorsystem for fremstilling av et fusjonspolypeptid som omfatter ekspresjonsvektoren ifølge oppfinnelsen som er blitt innført i en vertscelle som er egnet for ekspresjon av fusjonspolypeptidet. En egnet vertscelle kan være en bakteriecelle, så som E. coli, en gjærcelle, så som Pichia pastoris, en insektcelle, så som Spodoptera frugiperda, eller en pattedyrceelle, så som en COS-, CHO-, 293-,
25 BHK- eller NS0-celle.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer også metoder for å fremstille fusjonspolypeptidene ifølge oppfinnelsen ved å dyrke celler av vertsvektorsystemene beskrevet heri, under betingelser som muliggjør fremstilling av fusjonspolypeptidet og utvinning av det således fremstilte fusjonspolypeptid.

30 Teknologien beskrevet heri kan anvendes til å utvikle en cytokinfelle for ethvert cytokin som utnytter en α -komponent som tildeler spesifisitet, samt en β -komponent som, når den er bundet til α -spesifisitetskomponenten, har en høyere affinitet for cytokinet enn noen av komponentene alene. Følgelig omfatter

antagonister i henhold til oppfinnelsen antagonist av interleukin 1[IL-1, Greenfeder, et al. J. Biol. Chem. 270:13757-13765 (1995); Guo, et al. J. Biol. Chem. 270:27562-27568 (1995)],

5 Farmasøytiske sammensetninger for anvendelse i henhold til oppfinnelsen omfatter antagonistene beskrevet ovenfor i en farmakologisk akseptabel væske, en fast eller halvfast bærer, forbundet til en bærer eller et målmolekyl (f.eks. antistoff, hormon, vekstfaktor etc.) og/eller innlemmet i liposomer, mikrokapsler og preparater med regulert frigivelse (inklusive antagonistuttrykkende celler) før administrasjon *in vivo*. For eksempel kan den farmasøytiske sammensetning omfatte en eller flere av
10 antagonistene i en vandig oppløsning, så som sterilt vann, saltvann, fosfatbuffer eller dekstroseløsning. Alternativt kan de aktive midler være innlemmet i en fast (f.eks. voks) eller halvfast (f.eks. gelatinholdig) formulering som kan implanteres i en pasient i behov av slik behandling. Administrasjonsruten kan være enhver administrasjonsmåte som er kjent i faget, inklusive, men ikke begrenset til intra-
15 venøs, intratekal, subkutan injeksjon inn i det aktuelle vev, intraarterielt, intranasalt, oralt eller via en implantert anordning.

Administrasjonen kan resultere i fordeling av det aktive middel ifølge oppfinnelsen i hele legemet eller i et lokalisert område. For eksempel i noen tilstander som involverer fjernere områder av nervesystemet, kan intravenøs eller intratekal
20 administrasjon av et passende middel være ønskelig. I noen situasjoner kan et implantat inneholdende det aktive middel anbringes i eller nær lesjonsområdet. Passende implantater omfatter, men er ikke begrenset til, gelskum, voks eller mikropartikkelbaserte implantater.

EKSEMPLER

25 KLONING AV FUSJONSPOLYPEPTIDKOMPONENTENE

De ekstracellulære domener av de humane cytokinreseptorer ble oppnådd ved hjelp av standard PCR-teknikker under anvendelse av vevs-cDNA-stoffer (CLONTECH), klonet til ekspresjonsvektoren, pMT21 (Genetics Institute, Inc.) og sekvensener ble sekvensert ved standard teknikker under anvendelse av en ABI 373A DNA-
30 sekvenser og "Taq Dideoxy Terminator Cycle Sequencing Kit" (Applied Biosystemer, Inc., Foster City, CA). For IL-1RAcP ble nukleotidene 1 til 1074 (tilsvarende aminosyrene 1-358) fra Genbank-sekvensen, AB006357, klonet. For IL-1RI ble

nukleotidene 55 til 999 (tilsvarende aminosyrene 19-333) fra Genbank-sekvensen, X16896, klonet.

FREMSTILLING AV FUSJONSPOLYPEPTIDER (CYTOKINFELLER)

Nukleotidsekvenser som koder cytokinfeller, ble konstruert fra de individuelle
 5 klonede DNA-stoffer (beskrevet *supra*) ved standard klonings- og PCR-teknikker. Sekvensene ble konstruert i ramme slik at sekvensen som koder den første fusjonspolypeptidkomponent, ble fusjonert til sekvensen som koder den andre fusjonspolypeptidkomponent etterfulgt av et Fc-domene (hengsel-, CH2- og CH3-område av humant IgG1) som den multimeriserende komponent. I noen tilfeller ble
 10 ekstra nukleotider innsatt i ramme mellom sekvenser som koder de første og andre fusjonspolypeptidkomponenter for å addere et bindingsområde mellom de to komponenter (Se Figur 2A - Figur 2E - felle 569).

For IL-1-fellene 569 (Figur 2A - Figur 2E) er IL-1RacP-komponenten 5' etterfulgt av IL-1RI-komponenten og deretter Fc-domenet. De endelige konstrukter ble klonet i
 15 pattedyrsekspresjonsvektoren pCDNA3.1 (STRATAGENE).

I 569-sekvensen (Figur 2A - Figur 2E) koder nukleotidene 1-1074 IL1RacP-komponenten, nukleotidene 1075 -1098 koder et bindingsområde, nukleotidene 1099-2043 koder IL1RI-komponenten og nukleotidene 2044-2730 koder Fc-domenet.

20 DNA-konstrukter ble transfisert enten transient til COS-celler eller transfisert stabilt til CHO-celler ved hjelp av standard teknikker som er velkjent for en fagkyndig person. Supernatanter ble oppsamlet og rensset ved hjelp av Protein A-affinitetskromatografi og størrelsesseksklusjonskromatografi ved hjelp av standard teknikker. (Se for eksempel Harlav og Lane, Antibodies - A Laboratory Manual, Cold
 25 Spring Harbor Laboratory, 1988).

MRC5-BIOUNDERSØKELSE FOR IL1-FELLER

Humane MRC5-lungefibroblastceller reagerer på IL-1 ved å utskille IL-6, og således ble de benyttet til å undersøke IL-1-fellenes evnen til blokkere IL-1-avhengig produksjon av IL-6. IL1-fellen 1SC569 (Figur 2A - Figur 2E) ble testet i forhold til
 30 IL-1-RI.Fc som er det ekstracellulære domene av IL-1 Type I-reseptoren fusjonert til et Fc-domene.

MRC5-celler suspenderes i en konsentrasjon av 1×10^5 celler pr. ml i medium, og 0,1 ml av cellene utsås (10000 celler pr. brønn) i brønnene av en 96 brønners vevskulturplate. Platene inkuberes i 24 timer ved 37°C i en fuktet 5% CO₂-inkubator.

- 5 IL-1-felle og rekombinant humant IL-1 i varierende doser forhåndsinkuberes i en 96 brønners vevskulturskål og inkuberes i 2 timer ved 37°C. 0,1 ml av denne blanding tilsettes deretter til 96 brønners platen inneholdende MRC5-cellene slik at sluttkonsentrasjonen av IL-1-felle er 10nM og sluttkonsentrasjonene av IL-1-områdene fra 2,4 pM til 5nM. Kontrollbrønnene inneholder bare felle eller ingenting.
- 10 Platene inkuberes deretter ved 37°C i 24 timer i en fuktet 5% CO₂-inkubator. Supernatanten oppsamles og undersøkes med hensyn til nivåer av IL-6 under anvendelse av "R&D Systems Quantikine Immunoassay Kit" i henhold til produsentens instruksjoner.

RESULTATER

- 15 Figur 30 viser at fellen 569 (Figur 2A - Figur 2E) er i stand til å antagonisere virkningene av IL-1 og blokkere IL-6-produksjonen fra MRC 5-celler ved behandling med IL-1. I en konsentrasjon av 10nM er fellen 569 i stand til å blokkere produksjonen av IL-6 opp til en IL-1-konsentrasjon av 3nM. I motsetning til dette er IL-1RI.Fc en meget dårligere antagonist av IL-1. Det er bare i stand til å
- 20 blokkere virkningene av IL-1 opp til ca. 10-20 pM. Således er fellen 569 tilnærmelsesvis 100x bedre til å blokkere IL-1 enn IL1RI.Fc.

BLOKKERING AV INJISERT IL-1 VED HJELP AV IL-1-FELLE *IN VIVO*

- IL-1 er et pro-inflammatorisk cytokin. Systemisk administrasjon av IL-1 har vist seg å kunne utløse akutte responser i dyr, inklusive transient hyperglykemi, hypo-
- 25 insulinemi, feber, anoreksi og økede serumnivåer av interleukin-6 (IL-6) (Reimers, 1998). Siden mus reagerer på både murint og humant IL-1, kan humant IL-1 anvendes, og virkningen av binding av humane spesifikke IL-1-antagonister *in vivo* kan evalueres. Denne akutte musemodell ble anvendt for å bestemme en human IL-1-felles evne til å antagonisere effektiviteten av eksogent administrert humant
- 30 IL-1 *in vivo*. Modellen tilveiebringer en rask indikasjon på effektiviteten av den humane IL-1-felle *in vivo* og kan anvendes som en undersøkelse for å underlette molekylvalget.

Eksperimentets utforming:

Mus ble gitt subkutane injeksjoner av humant IL-1 (0,3 µg/kg). Tjuefire timer før injeksjonen av humant IL-1 ble dyrene forhåndsbehandlet med enten vehikkel eller 150 ganger det molare overskudd av human IL-1-felle (0,54 mg/kg). To timer før
5 avlivning (26 timer) ble musene gitt en andre injeksjon av humant IL-1 (0,3 µg/kg). Blodprøver ble tatt ved forskjellige tidspunkt, og serum ble undersøkt med hensyn til IL-6-nivåer.

RESULTATER

Eksogen administrasjon av humant IL-1 resulterte i en dramatisk induksjon av IL-
10 6-nivåene i serum. Ved 150 ganger det molare overskudd blokkerte den humane IL-1-felle fullstendig IL-6-økningen (Figur 4). Videre ble effektiviteten av den humane IL-1-felle værende i minst ytterligere 24 timer og forhindret en IL-6-økning også når IL-1 ble administrert på nytt (Figur 4). Slik langvarig effektivitet antyder at daglig injeksjon av en IL-1-felle kanskje ikke er nødvendig for kroniske tilfeller.

Patentkrav

1. Isolert nukleinsyremolekyl som koder et fusjonspolypeptid, hvilket fusjonspolypeptid omfatter de følgende fusjonspolypeptid-komponenter:

- 5 (a) en interleukin-1 (IL-1) -bindende del av de ekstracellulære domene av den spesifisitetsbestemmende komponent av en IL-1-reseptor;
- (b) en IL-1-bindende del av et ekstracellulært domene av den signaltransduserende komponent av nevnte IL-1-reseptor; og
- (c) en multimeriserende komponent;

10 hvilken multimeriserende komponent (c) multimeriserer med en multimeriserende komponent (c) omfattet i en annen av nevnte fusjonspolypeptid for å danne en multimer av nevnte fusjonspolypeptider;

hvilken multimer binder til og fanger inn IL-1 og således virker som en antagonist for IL-1.

15 2. Isolert nukleinsyremolekyl ifølge krav 1, hvori komponent (a) av nevnte fusjonspolypeptid omfatter en IL-1-bindende del av det ekstracellulære domene av Type I IL-1R og komponent (b) omfatter en IL-1-bindende del av et ekstracellulært domene av IL-1R AcP.

20 3. Isolert nukleinsyremolekyl ifølge krav 1, hvori komponent (a) av nevnte fusjonspolypeptid omfatter en IL-1-bindende del av det ekstracellulære domene av Type II IL-1R og komponent (b) omfatter en IL-1-bindende del av et ekstracellulært domene av IL-1R AcP.

4. Isolert nukleinsyremolekyl ifølge ethvert av de foregående krav, hvor nevnte multimer er en dimer.

25 5. Isolert nukleinsyremolekyl ifølge ethvert av de foregående krav, hvor den multimeriserende komponent omfatter et immunoglobulin-avledet domene.

6. Isolert nukleinsyremolekyl ifølge krav 5, hvor det immunoglobulin-avledete domene er valgt fra Fc-domenet av IgG, den tunge kjede av IgG og den lette kjede av IgG.

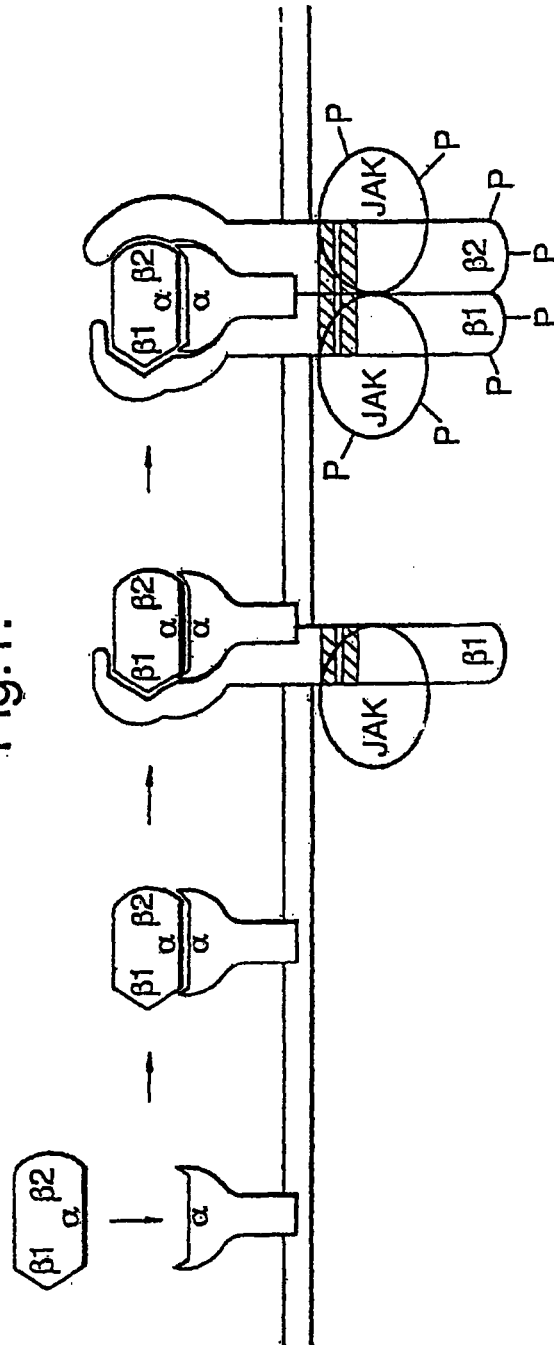
7. Isolert nukleinsyremolekyl ifølge ethvert av de foregående krav, hvor nukleinsyresekvensen som koder for komponent (a) ligger oppstrøms for nukleotidsekvensen som koder for komponent (b).
8. Nukleinsyremolekyl ifølge ethvert av kravene 1 til 6, hvor
5 nukleotidsekvensen som koder for komponent (a) ligger nedstrøms for nukleotidsekvensen som koder for komponent (b).
9. Multimer omfattende to eller flere fusjonspolypeptider kodet av nukleinsyremolekylene ifølge ethvert av de foregående krav, hvilken multimer binder til og innfanger IL-1 og virker som en antagonist for IL-1.
10. Multimer ifølge krav 9, som er en dimer omfattende to av nevnte fusjonspolypeptider.
10
11. Vektor som omfatter nukleinsyremolekylet ifølge ethvert av kravene 1 til 8.
12. Ekspresjonsvektor omfattende et nukleinsyremolekyl ifølge ethvert av kravene 1 til 8, hvori nukleinsyremolekylet er operativt forbundet til en
15 ekspresjonskontrollsekvens.
13. Vertsvektorsystem for produksjon av et fusjonspolypeptid, hvilket omfatter ekspresjonsvektoren ifølge krav 12 i en egnet vertscelle.
14. Vertsvektorsystem ifølge krav 13, hvori vertscellen er en bakteriecelle, gjærceelle, insektcelle eller pattedyrceelle.
15. Vertsvektorsystem ifølge krav 13, hvori vertscellen er E. coli, en COS-celle, en CHO-celle, en 293-celle, en BHK-celle eller en NS0-celle.
20
16. Fremgangsmåte for å fremstille et fusjonspolypeptid, hvilken fremgangsmåte omfatter å dyrke celler av vertsvektorsystemet ifølge krav 13, 14 eller 15 under betingelser som tillater fremstilling av fusjonspolypeptider og utvinning av
25 fusjonspolypeptidene således fremstilt.
17. Fremgangsmåte ifølge krav 16 ytterligere omfattende å tillate nevnte fusjonspolypeptider å danne multimerer av fusjonspolypeptider som angitt i krav 9.

18. Fremgangssåte ifølge krav 17, hvor nevnte multimerer er dimerer som angitt i krav 10.

19. Farmasøytisk sammensetning omfattende en multimer ifølge krav 9 eller en dimer ifølge krav 10 i en farmasøytisk akseptabel væske, faststoff eller semi-fast bæremiddel, tilknyttet et bæremiddel eler målrettende molekyl og/eller inkorporert i liposomer, mikrokapsler eller et kontrollert frigjøringspreparat.

1/8

Fig.1.



2/8

Fig. 2A.

```

      10      20      30      40
      *      *      *      *
ATG GTG CTT CTG TGG TGT GTA GTG AGT CTC TAC TTT TAT GGA ATC CTG
Met Val Leu Leu Trp Cys Val Val Ser Leu Tyr Phe Tyr Gly Ile Leu>

50      60      70      80      90
      *      *      *      *      *
CAA AGT GAT GCC TCA GAA CGC TGC GAT GAC TGG GGA CTA GAC ACC ATG
Gln Ser Asp Ala Ser Glu Arg Cys Asp Asp Trp Gly Leu Asp Thr Met>

100     110     120     130     140
      *      *      *      *      *
AGG CAA ATC CAA GTG TTT GAA GAT GAG CCA GCT CGC ATC AAG TGC CCA
Arg Gln Ile Gln Val Phe Glu Asp Glu Pro Ala Arg Ile Lys Cys Pro>

150     160     170     180     190
      *      *      *      *      *
CTC TTT GAA CAC TTC TTG AAA TTC AAC TAC AGC ACA GCC CAT TCA GCT
Leu Phe Glu His Phe Leu Lys Phe Asn Tyr Ser Thr Ala His Ser Ala>

200     210     220     230     240
      *      *      *      *      *
GGC CTT ACT CTG ATC TGG TAT TGG ACT AGG CAG GAC CGG GAC CTT GAG
Gly Leu Thr Leu Ile Trp Tyr Trp Thr Arg Gln Asp Arg Asp Leu Glu>

250     260     270     280
      *      *      *      *
GAG CCA ATT AAC TTC CGC CTC CCC GAG AAC CGC ATT AGT AAG GAG AAA
Glu Pro Ile Asn Phe Arg Leu Pro Glu Asn Arg Ile Ser Lys Glu Lys>

290     300     310     320     330
      *      *      *      *      *
GAT GTG CTG TGG TTC CGG CCC ACT CTC CTC AAT GAC ACT GGC AAC TAT
Asp Val Leu Trp Phe Arg Pro Thr Leu Leu Asn Asp Thr Gly Asn Tyr>

340     350     360     370     380
      *      *      *      *      *
ACC TGC ATG TTA AGG AAC ACT ACA TAT TGC AGC AAA GTT GCA TTT CCC
Thr Cys Met Leu Arg Asn Thr Thr Tyr Cys Ser Lys Val Ala Phe Pro>

390     400     410     420     430
      *      *      *      *      *
TTG GAA GTT GTT CAA AAA GAC AGC TGT TTC AAT TCC CCC ATG AAA CTC
Leu Glu Val Val Gln Lys Asp Ser Cys Phe Asn Ser Pro Met Lys Leu>

440     450     460     470     480
      *      *      *      *      *
CCA GTG CAT AAA CTG TAT ATA GAA TAT GGC ATT CAG AGG ATC ACT TGT
Pro Val His Lys Leu Tyr Ile Glu Tyr Gly Ile Gln Arg Ile Thr Cys>

490     500     510     520
      *      *      *      *
CCA AAT GTA GAT GGA TAT TTT CCT TCC AGT GTC AAA CCG ACT ATC ACT
Pro Asn Val Asp Gly Tyr Phe Pro Ser Ser Val Lys Pro Thr Ile Thr>

530     540     550     560     570
      *      *      *      *      *
TGG TAT ATG GGC TGT TAT AAA ATA CAG AAT TTT AAT AAT GTA ATA CCC
Trp Tyr Met Gly Cys Tyr Lys Ile Gln Asn Phe Asn Asn Val Ile Pro>

```

3/8

Fig. 2B.

```

      580      590      600      610      620
      *      *      *      *      *
GAA GGT ATG AAC TTG AGT TTC CTC ATT GCC TTA ATT TCA AAT AAT GGA
Glu Gly Met Asn Leu Ser Phe Leu Ile Ala Leu Ile Ser Asn Asn Gly>

      630      640      650      660      670
      *      *      *      *      *
AAT TAC ACA TGT GTT GTT ACA TAT CCA GAA AAT GGA CGT ACG TTT CAT
Asn Tyr Thr Cys Val Val Thr Tyr Pro Glu Asn Gly Arg Thr Phe His>

      680      690      700      710      720
      *      *      *      *      *
CTC ACC AGG ACT CTG ACT GTA AAG GTA GTA GGC TCT CCA AAA AAT GCA
Leu Thr Arg Thr Leu Thr Val Lys Val Val Gly Ser Pro Lys Asn Ala>

      730      740      750      760
      *      *      *      *
GTG CCC CCT GTG ATC CAT TCA CCT AAT GAT CAT GTG GTC TAT GAG AAA
Val Pro Pro Val Ile His Ser Pro Asn Asp His Val Val Tyr Glu Lys>

770      780      790      800      810
*      *      *      *      *
GAA CCA GGA GAG GAG CTA CTC ATT CCC TGT ACG GTC TAT TTT AGT TTT
Glu Pro Gly Glu Glu Leu Leu Ile Pro Cys Thr Val Tyr Phe Ser Phe>

      820      830      840      850      860
      *      *      *      *      *
CTG ATG GAT TCT CGC AAT GAG GTT TGG TGG ACC ATT GAT GGA AAA AAA
Leu Met Asp Ser Arg Asn Glu Val Trp Trp Thr Ile Asp Gly Lys Lys>

      870      880      890      900      910
      *      *      *      *      *
CCT GAT GAC ATC ACT ATT GAT GTC ACC ATT AAC GAA AGT ATA AGT CAT
Pro Asp Asp Ile Thr Ile Asp Val Thr Ile Asn Glu Ser Ile Ser His>

      920      930      940      950      960
      *      *      *      *      *
AGT AGA ACA GAA GAT GAA ACA AGA ACT CAG ATT TTG AGC ATC AAG AAA
Ser Arg Thr Glu Asp Glu Thr Arg Thr Gln Ile Leu Ser Ile Lys Lys>

      970      980      990      1000
      *      *      *      *
GTT ACC TCT GAG GAT CTC AAG CGC AGC TAT GTC TGT CAT GCT AGA AGT
Val Thr Ser Glu Asp Leu Lys Arg Ser Tyr Val Cys His Ala Arg Ser>

1010      1020      1030      1040      1050
*      *      *      *      *
GCC AAA GGC GAA GTT GCC AAA GCA GCC AAG GTG AAG CAG AAA GTG CCA
Ala Lys Gly Glu Val Ala Lys Ala Ala Lys Val Lys Gln Lys Val Pro>

      1060      1070      1080      1090      1100
      *      *      *      *      *
GCT CCA AGA TAC ACA GTG TCC GGT GGC GCG CCT ATG CTG AGC GAG GCT
Ala Pro Arg Tyr Thr Val Ser Gly Gly Ala Pro Met Leu Ser Glu Ala>

      1110      1120      1130      1140      1150
      *      *      *      *      *
GAT AAA TGC AAG GAA CGT GAA GAA AAA ATA ATT TTA GTG TCA TCT GCA
Asp Lys Cys Lys Glu Arg Glu Glu Lys Ile Ile Leu Val Ser Ser Ala>

      1160      1170      1180      1190      1200
      *      *      *      *      *

```

4/8

Fig. 2C.

```

AAT GAA ATT GAT GTT CGT CCC TGT CCT CTT AAC CCA AAT GAA CAC AAA
Asn Glu Ile Asp Val Arg Pro Cys Pro Leu Asn Pro Asn Glu His Lys>

      1210      1220      1230      1240
      *        *        *        *
GGC ACT ATA ACT TGG TAT AAG GAT GAC AGC AAG ACA CCT GTA TCT ACA
Gly Thr Ile Thr Trp Tyr Lys Asp Asp Ser Lys Thr Pro Val Ser Thr>

1250      1260      1270      1280      1290
      *        *        *        *        *
GAA CAA GCC TCC AGG ATT CAT CAA CAC AAA GAG AAA CTT TGG TTT GTT
Glu Gln Ala Ser Arg Ile His Gln His Lys Glu Lys Leu Trp Phe Val>

      1300      1310      1320      1330      1340
      *        *        *        *        *
CCT GCT AAG GTG GAG GAT TCA GGA CAT TAC TAT TGC GTG GTA AGA AAT
Pro Ala Lys Val Glu Asp Ser Gly His Tyr Tyr Cys Val Val Arg Asn>

      1350      1360      1370      1380      1390
      *        *        *        *        *
TCA TCT TAC TGC CTC AGA ATT AAA ATA AGT GCA AAA TTT GTG GAG AAT
Ser Ser Tyr Cys Leu Arg Ile Lys Ile Ser Ala Lys Phe Val Glu Asn>

      1400      1410      1420      1430      1440
      *        *        *        *        *
GAG CCT AAC TTA TGT TAT AAT GCA CAA GCC ATA TTT AAG CAG AAA CTA
Glu Pro Asn Leu Cys Tyr Asn Ala Gln Ala Ile Phe Lys Gln Lys Leu>

      1450      1460      1470      1480
      *        *        *        *        *
CCC GTT GCA GGA GAC GGA GGA CTT GTG TGC CCT TAT ATG GAG TTT TTT
Pro Val Ala Gly Asp Gly Gly Leu Val Cys Pro Tyr Met Glu Phe Phe>

1490      1500      1510      1520      1530
      *        *        *        *        *
AAA AAT GAA AAT AAT GAG TTA CCT AAA TTA CAG TGG TAT AAG GAT TGC
Lys Asn Glu Asn Asn Glu Leu Pro Lys Leu Gln Trp Tyr Lys Asp Cys>

      1540      1550      1560      1570      1580
      *        *        *        *        *
AAA CCT CTA CTT CTT GAC AAT ATA CAC TTT AGT GGA GTC AAA GAT AGG
Lys Pro Leu Leu Leu Asp Asn Ile His Phe Ser Gly Val Lys Asp Arg>

      1590      1600      1610      1620      1630
      *        *        *        *        *
CTC ATC GTG ATG AAT GTG GCT GAA AAG CAT AGA GGG AAC TAT ACT TGT
Leu Ile Val Met Asn Val Ala Glu Lys His Arg Gly Asn Tyr Thr Cys>

      1640      1650      1660      1670      1680
      *        *        *        *        *
CAT GCA TCC TAC ACA TAC TTG GGC AAG CAA TAT CCT ATT ACC CGG GTA
His Ala Ser Tyr Thr Tyr Leu Gly Lys Gln Tyr Pro Ile Thr Arg Val>

      1690      1700      1710      1720
      *        *        *        *        *
ATA GAA TTT ATT ACT CTA GAG GAA AAC AAA CCC ACA AGG CCT GTG ATT
Ile Glu Phe Ile Thr Leu Glu Glu Asn Lys Pro Thr Arg Pro Val Ile>

1730      1740      1750      1760      1770
      *        *        *        *        *
GTG AGC CCA GCT AAT GAG ACA ATG GAA GTA GAC TTG GGA TCC CAG ATA
Val Ser Pro Ala Asn Glu Thr Met Glu Val Asp Leu Gly Ser Gln Ile>

```

5/8

Fig. 2D.

```

1780      1790      1800      1810      1820
*         *         *         *         *
CAA TTG ATC TGT AAT GTC ACC GGC CAG TTG AGT GAC ATT GCT TAC TGG
Gln Leu Ile Cys Asn Val Thr Gly Gln Leu Ser Asp Ile Ala Tyr Trp>

1830      1840      1850      1860      1870
*         *         *         *         *
AAG TGG AAT GGG TCA GTA ATT GAT GAA GAT GAC CCA GTG CTA GGG GAA
Lys Trp Asn Gly Ser Val Ile Asp Glu Asp Asp Pro Val Leu Gly Glu>

1880      1890      1900      1910      1920
*         *         *         *         *
GAC TAT TAC AGT GTG GAA AAT CCT GCA AAC AAA AGA AGG AGT ACC CTC
Asp Tyr Tyr Ser Val Glu Asn Pro Ala Asn Lys Arg Arg Ser Thr Leu>

1930      1940      1950      1960
*         *         *         *         *
ATC ACA GTG CTT AAT ATA TCG GAA ATT GAG AGT AGA TTT TAT AAA CAT
Ile Thr Val Leu Asn Ile Ser Glu Ile Glu Ser Arg Phe Tyr Lys His>

1970      1980      1990      2000      2010
*         *         *         *         *
CCA TTT ACC TGT TTT GCC AAG AAT ACA CAT GGT ATA GAT GCA GCA TAT
Pro Phe Thr Cys Phe Ala Lys Asn Thr His Gly Ile Asp Ala Ala Tyr>

2020      2030      2040      2050      2060
*         *         *         *         *
ATC CAG TTA ATA TAT CCA GTC ACT AAT TCC GGA GAC AAA ACT CAC ACA
Ile Gln Leu Ile Tyr Pro Val Thr Asn Ser Gly Asp Lys Thr His Thr>

2070      2080      2090      2100      2110
*         *         *         *         *
TGC CCA CCG TGC CCA GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC TTC
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe>

2120      2130      2140      2150      2160
*         *         *         *         *
CTC TTC GCC CCA AAA CCC AAG GAC ACC CTC ATG ATC TCC CGG ACC CCT
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro>

2170      2180      2190      2200
*         *         *         *         *
GAG GTC ACA TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAC GAA GAC CCT GAG GTC
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val>

2210      2220      2230      2240      2250
*         *         *         *         *
AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GCC GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA
Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr>

2260      2270      2280      2290      2300
*         *         *         *         *
AAG CCG CGG GAG GAG CAG TAC AAC AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val>

2310      2320      2330      2340      2350
*         *         *         *         *
CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAT GGC AAG GAG TAC AAG TGC
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys>

2360      2370      2380      2390      2400

```

6/8

Fig. 2E.

```

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
AAG GTC TCC AAC AAA GCC CTC CCA GCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser>

      2410      2420      2430      2440
      *      *      *      *      *      *      *      *
AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAA CCA CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro>

2450      2460      2470      2480      2490
      *      *      *      *      *      *      *      *
TCC CGG GAG GAG ATG ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC
Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val>

      2500      2510      2520      2530      2540
      *      *      *      *      *      *      *      *
AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly>

      2550      2560      2570      2580      2590
      *      *      *      *      *      *      *      *
CAG CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp>

      2600      2610      2620      2630      2640
      *      *      *      *      *      *      *      *
GGC TCC TTC TTC CTC TAT AGC AAG CTC ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp>

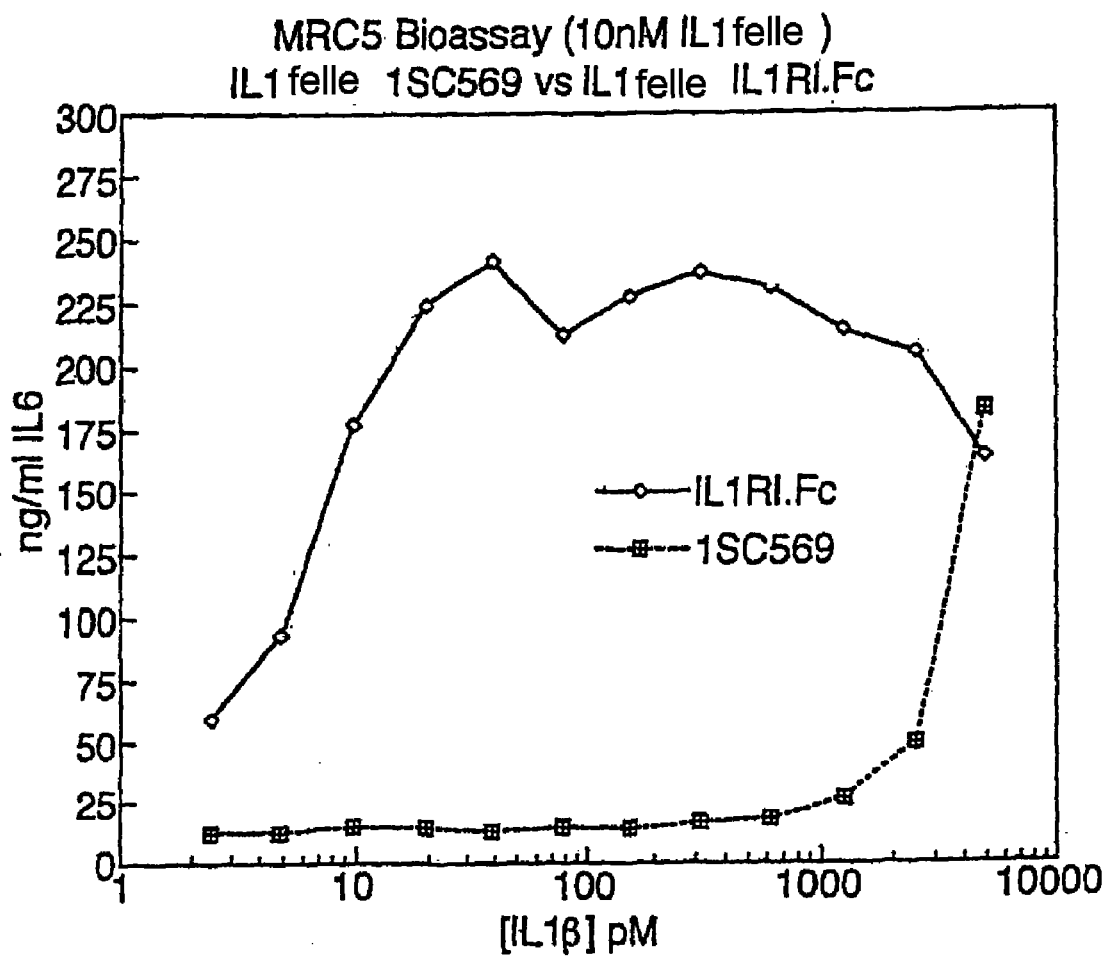
      2650      2660      2670      2680
      *      *      *      *      *      *      *      *
CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His>

2690      2700      2710      2720      2730
      *      *      *      *      *      *      *      *
AAC CAC TAC ACG CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CCG GGT AAA TGA
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys ***>

```

7/8

Fig. 3.



8/8

Fig. 4.

