



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **324775**

(13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.

C07K 14/715 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

G01N 33/566 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19982550	(86)	Int. inndag og søknadsnr	1996.11.07 PCT/FR96/01756
(22)	Inng.dag	1998.06.04	(85)	Videreføringsdag	1998.06.04
(24)	Løpedag	1996.11.07	(30)	Prioritet	1995.12.06, FR, 9514424
(41)	Alm.tilgj	1998.08.05			
(45)	Meddelt	2007.12.10			
(73)	Innehaver	sanofi-aventis, 174, avenue de France, 75013 PARIS, FR			
(72)	Oppfinner	Daniel Caput, Avignolet-Lauragais, FR Pascual Ferrara, Avignonet-Lauragais, FR Patrick Laurent, Auterive, FR Natalio Vita, Montgiscard, FR			
(74)	Fullmektig	JK Thorsens Patentbureau AS, Postboks 9276 Grønland, 0134 OSLO			

(54)	Benevnelse	Renset peptid, isolert nukleinsyresekvens og deres anvendelse.		
(56)	Anførte publikasjoner	Hilton et al., Proc. Natl. Acad. Sci., vol. 93, 1996, side 497-501. Lefort et al., FEBS Letter, vol. 366, 1995, side 122-126. Vita et al., Jour. Biol. Chem., vol. 270, no. 8, Feb. 1995, side 3512-3517		
(57)	Sammendrag			

Renset polypeptid omfattende en aminosyresekvens valgt fra (a) SEQ ID No. 2, og (b) enhver biologisk aktiv sekvens avledet fra SEQ ID No. 2.

Den foreliggende oppfinnelse vedrører rensede polypeptider med en reseptoraktivitet som er spesifikk for interleukin-13 (IL-13) og deres biologisk aktive fragmenter. Oppfinnelsen vedrører også deres anvendelse.

5

Oppfinnelsen vedrører også isolerte nukleinsyresekvenser og deres anvendelse, samt klonings- og/eller ekspresjonsvektor, vertscelle, nukleotid probe og antisense-sekvens.

10 Oppfinnelsen vedrører også en fremgangsmåte for å fremstille et rekombinant IL-13 reseptor polypeptid, samt et farmasøytisk preparat.

Endelig vedrører oppfinnelsen monoklonale eller polyklonale
15 antistoffer, konjugerte antistoffer eller fragmenter derav.

IL-13 er et nylig identifisert (1,2) cytokin med 112 aminosyrer utskilt ved de aktiverte T lymfocytene, B lymfocytene og mastocytene etter aktivering.

20

I kraft av sine mange biologiske egenskaper som deles med IL-4, er IL-13 blitt beskrevet som et IL-4 lignende cytokin. Dets aktiviteter er faktisk tilsvarende dem til IL-4 på B cellene (3-5), monocytene (6-10) og andre ikke-hematopoietiske celler (11-12). På den annen side, i motsetning til
25 IL-4, vil det ikke utvise en spesifikk effekt på hvilende eller aktiverte T celler (13).

Forskjellige biologiske aktiviteter av IL-13 på monocytter/-makrofager, B lymfocytter og visse hematopoietiske forløpere er blitt beskrevet detaljert av A.,J. Minty, så vel som i
30 oversiktsartikler på IL-13 (se for eksempel 14). En rekke data indikerer i tillegg at dette cytokin har en pleiotropisk effekt på andre celletyper. Disse ikke-hematopoietiske
35 celler som direkte påvirkes ved IL-13 er endotel- og mikrogliaceller, keratinocytter og nyre- og kolonkarsinomer.

De anti-inflammatoriske og immunoregulerende aktiviteter av IL-13 kan for eksempel anvendes i behandlingen av autoimmune, tumor og virale patologier.

5 En utnyttelse av disse biologiske egenskaper på et klinisk nivå krever imidlertid en inngående kunnskap om de signaler og mekanismer via hvilke disse effekter utvises, slik at man kan være i stand til å styre og modulere dem i de relevante patologier.

10

Ett av trinnene i analysen av signalet som transmitteres ved et biologisk molekyl i en celle omfatter identifikasjon av membranreseptoren derav. De studier som til nå er gjennomført på IL-13 reseptoren har vist at IL-13 og IL-4 hadde
15 felles en reseptor, eller i det minste noen av komponentene av et reseptorkompleks, så vel som signal-transduksjonselementer (15-18). Denne reseptor er til stede på overflaten av en rekke celletyper, i et variabelt antall i henhold til den celletypen som man betrakter. En sammenlignbar fordeling av
20 IL-13 og IL-14 reseptorene er blitt indikert av A.J. Minty (14).

Kondo et al. (19) har beskrevet strukturen av en reseptor med en høy affinitet for IL-4. Denne reseptor er en dimer,
25 dannet ved foreningen av et glykoprotein på 140 kDa (IL-4R) og γ kjeden i IL-2 reseptoren (γ_c). IL-4 kan binde til glykoprotein-subenheten på 140 kDa (IL-4R eller gp 140) med en høy affinitet (Kd mellom 50 og 100 pM) (15). Denne affinitet økes imidlertid med en faktor på fra 2 til 3 når γ_c
30 kjeden forenes med gp 140. Denne forening er i tillegg nødvendig for transmisjonen av visse signaler mediert ved IL-4 (19,20).

Kryss-konkurranseforsøk for binding av enten IL-13 eller IL-4
35 har vist at IL-4 normalt kan forhindre bindingen av IL-13, mens IL-13 kan generelt bare delvis forhindre bindingen av IL-4 til dets reseptor (17, 21) og binder seg ikke til noen av de to subenheter av IL-4 reseptoren eller til komplekset dannet ved foreningen derav. På grunnlag av disse observa-

sjoner, har man antatt at reseptoren som er spesifikk for IL-13 besto av reseptorkomplekset IL-4 assosiert med en annen IL-13 bindingskomponent (IL-13R β).

- 5 Forsøksstudier gjennomført på en erythro-leukemicellelinje i stand til proliferasjon som svar på IL-13 og IL-4 (TF-1 linje) har vist at disse to cytokiner ga lignende intracellulære virkninger etter binding til deres reseptor (18). Parallelt, har kryssbindingsforsøk gjort at man har kunnet
10 vise at gp 140 kan danne heterodimerer med enten γ kjeden eller med en ny subenhet med en molekylvekt på 55 til 70 kDa (17, 21).

- Forsøksstudier som nylig er gjennomført på en embryonisk
15 stamcellelinje fra mus har gjort det mulig å isolere genomisk DNA og cDNA som koder for et polypeptid med 424 aminosyrestrester (IL-13R α), noe som foreslår at IL-13 reseptoren delte en felles kjede med IL-4 reseptoren til å utgjøre en høyaffinitetsreseptor (22, 23), dvs. som har en affinitet
20 hvis konstante Kd ligger mellom verdier på mellom omtrent 10 pM og 100 pM (en lavaffinitetsreseptor har en konstant Kd som ligger mellom en verdi på 2 nM og 10 nM).

- I og med viktigheten, på et medisinsk nivå, av en nærmere
25 forståelse av fenomenet for regulering av IL-4 og av IL-13, og særlig muligheten av å kunne separere og kontrollere separat effektene som dannes ved begge disse to cytokiner, har man på den ene side vært interessert i karakteriseringen av et polypeptid som spesifikt binder IL-13 med en høy
30 affinitet og på en annen side i karakteriseringen av et annet polypeptid som alene spesifikt binder IL-13 med en lav affinitet og som, dersom det er forenet med IL-4 reseptoren, utgjør en høyaffinitetsreseptor for IL-13.

- 35 Man har nå identifisert en human karsinomcellelinje som uttrykker den IL-13 spesifikke reseptor i en mengde som er større enn andre kjente humane renale karsinomlinjer (21), og man har nå gjennomført kloning av den primære subenhet som er ansvarlig for bindingen av IL-13 til IL-4/IL-13 reseptoren,

betegnet IL-13R β , så vel som kloningen av den felles kjede som deles av IL-13 og IL-4 for å gi en høyaffinitetsreseptor som tillater kryss-konkurranse mellom de to cytokiner, betegnet IL-13R α . Den foreliggende oppfinnelse vedrører
5 således rensede polypeptider som spesifikt binder IL-13.

Mere spesielt vedrører den foreliggende oppfinnelse rensede polypeptider hvis aminosyresekvenser svarer til dem for en reseptor spesifikk for IL-13 (IL-13R β og IL-13R α), eller
10 biologisk aktive fragmenter derav.

Formålet med den foreliggende oppfinnelse er også isolerte DNA sekvenser som koder for de nevnte peptider eller deres biologisk aktive fragmenter.

15 I tillegg vedrører oppfinnelsen ekspresjonsvektorene som inneholder minst en av nukleotidsekvensene som definert i det foregående, og vertscellene som er transfektert med disse ekspresjonsvektorer under betingelser som tillater replikasjon og/eller ekspresjon av en av de nevnte nukleotidsekvenser.
20

Fremgangsmåter for fremstilling av rekombinant IL-13R β og IL-13R α eller deres biologisk aktive fragmenter ved transfekterte vertsceller utgjør også en del av oppfinnelsen.
25

Oppfinnelsen vedrører også farmasøytiske preparater omfattende IL-13R β og/eller IL-13R α eller biologisk aktive fragmenter derav for reguleringen av immunologiske og inflammatoriske mekanismer dannet ved IL-13. Den vedrører i tillegg
30 anvendelse av IL-13R β og/eller IL-13R α eller fragmenter derav for å screene midler i stand til å modulere deres aktivitet så vel som for fremstilling av nye produkter i stand til å modulere aktivitetene av IL-13 reseptoren.

35 Oppfinnelsen vedrører også antistoffer eller derivater av antistoffer som er spesifikke for IL-13R β og/eller IL-13R α .

I den etterfølgende beskrivelse av oppfinnelsen anvendes følgende definisjoner:

- polypeptid som spesifikt binder IL-13 med en høy affinitet (IL-13R β): et polypeptid omfattende aminosyresekvensen SEQ ID No. 2 eller ethvert biologisk aktivt fragment eller derivat derav,
- polypeptid som alene spesifikt binder IL-13 med en lav affinitet og som, dersom det er assosiert med IL-4 reseptoren, utgjør en høyaffinitetsreseptor (IL-13R α): et polypeptid omfattende aminosyresekvensen SEQ ID No. 4 eller ethvert biologisk aktivt fragment eller derivat derav,
- biologisk aktivt: i stand til å binde spesifikt til IL-13 og/eller delta i transduksjonene av signalet spesifikt dannet ved IL-13 på cellemembrannivået, og/eller i stand til å interagere reseptoren spesifikk for IL-4 (IL-4R/gp 140) for å danne et kompleks i stand til å binde IL-4 og IL-13, og/eller som gjenkjennes ved hjelp av antistoffer spesifikke for polypeptidet med sekvens SEQ ID No. 2 og/eller med sekvens SEQ ID No. 4, og/eller indusere antistoffer som gjenkjenner polypeptidet med sekvens SEQ ID No. 2 og/eller sekvens SEQ ID No. 4,
- derivat: ethvert polypeptid som er en variant av polypeptidet med sekvens SEQ ID No. 2 og/eller sekvens SEQ ID No. 4, eller ethvert molekyl resulterende fra en modifikasjon av en genetisk og/eller kjemisk natur av sekvensen SEQ ID No. 2 eller av sekvensen SEQ ID No. 4, dvs. som oppnås ved mutasjon, delesjon, addisjon, substitusjon og/eller ved kjemisk modifikasjon av et begrenset antall aminosyrer, så vel som enhver isoform sekvens, dvs. en sekvens som er identisk med sekvensen SEQ ID No. 2 eller med sekvensen SEQ ID No. 4, med ett av deres fragmenter eller en av deres modifiserte sekvenser, inneholdende en eller flere aminosyrer i D-enantiomerformen, idet nevnte variant, modifiserte eller isoforme sekvenser har bibeholdt minst en av egenskapene som gjør dem biologisk aktive.

Den foreliggende oppfinnelse vedrører et renset polypeptid som omfatter en aminosyresekvens valgt blant:

- a) sekvensen SEQ ID No. 2,

- b) en hvilken som helst sekvens avledet fra SEQ ID No. 2 ved mutasjon, delesjon, addisjon, substitusjon og/eller kjemisk modifikasjon av en eller av et begrenset antall aminosyrer, hvori nevnte polypeptid med sekvens avledet
5 fra SEQ ID No. 2 har den samme biologiske aktivitet som polypeptidet omfattende aminosyresekvensen SEQ ID No. 2.

Oppfinnelsen vedrører også en isolert nukleinsyresekvens som koder for et polypeptid som angitt i ett eller flere av
10 kravene 1 til 5.

Oppfinnelsen vedrører også et rensset polypeptid som omfatter sekvensen SEQ ID No. 4.

- 15 Oppfinnelsen vedrører også et rensset polypeptid som er en oppløselig form av polypeptidet med sekvens SEQ ID No. 4 som strekker seg opp til rest 343 og foretrukket opp til restene mellom 336 og 342.

- 20 Oppfinnelsen vedrører også en isolert nukleinsyresekvens som koder for et polypeptid som angitt i krav 9 eller 10.

Oppfinnelsen vedrører også en klonings- og/eller ekspresjonsvektor som inneholder en nukleinsyresekvens som angitt i ett
25 eller flere av kravene 6 til 8 og 11 til 13.

Oppfinnelsen vedrører også en vertscelle som er transfektert med en vektor som angitt i krav 14 eller 15.

- 30 Oppfinnelsen vedrører også en nukleotid probe som hybridiserer spesifikt med hvilken som helst av sekvensene som angitt i krav 6 til 8, de komplementære sekvensene derav eller de tilsvarende budbringer RNA'er, som inkluderer hele sekvensen SEQ ID No. 1 eller den komplementære tråden derav.

35

Oppfinnelsen vedrører også en nukleotid probe som hybridiserer spesifikt med hvilken som helst av sekvensene som angitt i krav 11 til 13, de komplementære sekvensene derav eller tilsvarende budbringer RNA'er, som inkluderer

hele sekvensen SEQ ID No. 3 eller den komplementære tråden derav.

Oppfinnelsen vedrører også en antisense-sekvens som er i
5 stand til å i det minste delvis inhibere produksjon av
polypeptidet som angitt i ett eller flere av kravene 1 til 5
og 9 til 10, som er valgt fra sekvensene som utgjør
leserammen som koder for et polypeptid som angitt i ett eller
flere av kravene 1 til 5 og 9 til 10 på transkripsjonsnivået.

10

Oppfinnelsen vedrører også anvendelse av en nukleinsyre-
sekvens som angitt i ett eller flere av kravene 6 til 8 og 11
til 13 for fremstilling av et rekombinant polypeptid som
angitt i ett eller flere av kravene 1 til 5 og 9 til 10.

15

Oppfinnelsen vedrører også en fremgangsmåte for å fremstille
et rekombinant IL-13 reseptor polypeptid, hvor transfekterte
celler som angitt i krav 16 eller 17 dyrkes under betingelser
som tillater ekspresjonen av et rekombinant polypeptid som
20 angitt i ett eller flere av kravene 1 til 5 og 9 til 10 og
hvor nevnte rekombinante polypeptid utvinnes.

Oppfinnelsen vedrører også monoklonale eller polyklonale
antistoffer, konjugerte antistoffer eller fragmenter derav,
25 som er i stand til spesifikt å gjenkjenne et polypeptid som
angitt i ett eller flere av kravene 1 til 5 og 9 til 10.

Oppfinnelsen vedrører også monoklonale eller polyklonale
antistoffer, konjugerte antistoffer eller fragmenter derav,
30 som er merkede antistoffer, kimære antistoffer, humaniserte
antistoffer, eller Fab eller F(ab')₂ fragmenter som er i
stand til å spesifikt gjenkjenne et polypeptid som angitt i
ett eller flere av kravene 1 til 5 og 9 til 10.

35 Oppfinnelsen vedrører også et farmasøytisk preparat som
omfatter, som aktivt prinsipp, et polypeptid som angitt i ett
eller flere av kravene 1 til 5 eller 9 til 10.

Oppfinnelsen vedrører også anvendelse av et polypeptid som angitt i ett eller flere av kravene 1 til 5 for å screene midler som er i stand til å modifisere aktiviteten av IL-13R β .

5

Oppfinnelsen vedrører også anvendelse av et polypeptid som angitt i krav 9 eller 10 for å screene midler som er i stand til å modifisere aktiviteten av IL-13R α .

10 Oppfinnelsen vedrører også anvendelse av et polypeptid som angitt i krav 4, 5 eller 10 for å syntetisere et IL-13 antagonistisk legemiddel som er egnet for å behandle tilstander som responderer på en IL-13 antagonistisk effekt.

15 Endelig vedrører oppfinnelsen anvendelse av et polypeptid som angitt i ett eller flere av kravene 1 til 5 eller 9 til 10 for å fremstille et farmasøytisk preparat som kan anvendes for å regulere immunologiske og inflammatoriske mekanismer produsert ved IL-13.

20

Fremstillingen av derivater kan ha en rekke formål inkludert spesielt økning av affiniteten av reseptoren for IL-13, modulering av kryss-konkurransen mellom IL-13 og IL-4, øking av produksjonsnivået, økning av deres resistens overfor
25 proteaser, modifikasjon av deres biologisk aktivitet eller gi dem nye farmasøytiske og/eller biologiske egenskaper.

Blant biologisk aktive varianter av polypeptidene som definert over, er fragmenter dannet ved alternerende spleising av
30 transkriptene (messenger RNAer) av genet som koder for en av aminosyresekvensene beskrevet over, foretrukne.

I en fordelaktig variant, blir de 8 C-terminale aminosyrer i polypeptiden med sekvens SEQ ID No. 2 substituert med følgende 6 aminosyrer: VRCVTL.
35

I henhold til et fordelaktig aspekt vedrører oppfinnelsen en oppløselig form av IL-13R β , betegnet IL-13 β s, omfattende særlig det ekstracellulære domenet av polypeptidet med

sekvens SEQ ID No. 2 som strekker seg opp til rest 343 og foretrukket opp til rest 337 så vel som en oppløselig form av IL-13R α , betegnet IL-13R α s, omfattende særlig det ekstra-cellulære domenet av polypeptidet med sekvens SEQ ID No. 4
5 som strekker seg opp til rest 343 og foretrukket opp til restene mellom 336 og 342.

Polypeptidet som omfatter sekvensen SEQ ID No. 2 eller sekvensen SEQ ID No. 4 representerer en spesifikk utførelses-
10 form av oppfinnelsen.

Som det vil fremgå fra eksemplene, kan polypeptidet som omfatter sekvensen SEQ ID No. 2 eller sekvensen SEQ ID No. 4 uttrykkes på overflaten av humane celler til å danne en
15 funksjonell IL-13 reseptor og/eller kombinere med IL-4 reseptoren til å danne, med γ kjeden av IL-2 reseptoren, reseptorkomplekset felles for IL-4 og IL-13.

Formålet med den foreliggende oppfinnelse er som nevnt også
20 isolerte nukleinsyresekvenser.

I en utførelsesform av oppfinnelsen er den isolerte nukleinsyresekvens valgt fra:

- a) sekvensen SEQ ID No. 1,
- 25 b) nukleinsyresekvensene i stand til å hybridisere til sekvensen SEQ ID No. 1 og som koder for et polypeptid med en IL-13 reseptor aktivitet,
- c) nukleinsyresekvensene avledet fra sekvenser a) og b) som et resultat av degenereringen av den genetiske kode.

30

I en ytterligere utførelsesform av oppfinnelsen er den isolerte nukleinsyresekvens valgt fra:

- (a) sekvensen SEQ ID No. 3,
- 35 (b) nukleinsyresekvensene avledet fra sekvens a) som et resultat av degenereringen av den genetiske koden.

Mere spesielt vedrører den foreliggende oppfinnelse en sekvens som koder for den oppløselige del av IL-13R β eller av IL-13R α og enhver variant dannet ved alternerende spleising av transkriptene av IL-13R β eller av IL-13R α , med konserv-
5 ering av minst en av de biologiske egenskaper som er beskrevet.

En foretrukket utførelsesform er representert ved en nukleinsyresekvens som omfatter eller som utgjøres av en serie av
10 nukleotider som strekker seg fra nukleotid nr. 1 opp til nukleotid 1081, og foretrukket opp til nukleotid 1063 på sekvensen SEQ ID No. 1.

En annen foretrukket utførelsesform er representert ved en
15 nukleinsyresekvens som omfatter eller som utgjøres av en serie av nukleotider som strekker fra nukleotid nr. 1 opp til nukleotid nr. 1059, og foretrukket opp til nukleotidene mellom nr. 1041 og 1056 på sekvensen SEQ ID No. 3.

20 Nukleinsyresekvensen i henhold til oppfinnelsen er fordelaktig en sekvens som koder for et protein svarende til den modne form av IL-13R β eller av IL-13R α , idet dette modne protein er resultatet av frigivelsen av signalpeptider.

25 De forskjellige nukleotidsekvenser i henhold til oppfinnelsen kan være av kunstig opprinnelse eller annet. De kan være DNA eller RNA sekvenser oppnådd ved screening av sekvensbiblioteker ved hjelp av prober dannet på grunnlag av sekvensen SEQ ID No. 1 eller av sekvensen SEQ ID No. 3. Slike biblioteker
30 kan fremstilles ved konvensjonelle biologiske molekylære teknikker som er kjent for fagkyndige på området.

Nukleotidsekvensene i henhold til den foreliggende oppfinnelse kan også fremstilles ved kjemisk syntese eller alternativt ved en kombinasjon av metoder som omfatter kjemisk eller
35 enzymatisk modifikasjon av sekvenser oppnådd ved å screene bibliotekene.

Disse nukleotidsekvenser tillater fremstillingen av nukleotidprober som koder for et polypeptid i henhold til den foreliggende oppfinnelse eller et biologisk aktivt fragment derav. De passende hybridiseringsbetingelser svarer til de temperatur- og ionestyrkebetingelser som vanlig anvendes av fagkyndige på området, foretrukket temperaturforhold mellom $T_m - 5^\circ\text{C}$ og $T_m - 30^\circ\text{C}$ og ytterligere foretrukket temperaturforhold mellom $T_m - 5^\circ\text{C}$ og $T_m - 10^\circ\text{C}$ (høy stringens), idet T_m er smeltetemperaturen, definert som den temperatur hvorved 50% av de base-parede tråder separerer. Slike prober utgjør også en del av oppfinnelsen. De kan anvendes som et in vitro diagnostisk verktøy for deteksjonen, ved hybridiseringsforsøk, av transkripter som er spesifikke for polypeptidene i henhold til oppfinnelsen i biologiske prøver eller for deteksjon av variantsynteser eller av genetiske avvik resulterende fra en polymorfisme, fra mutasjoner eller fra en dårlig spleising.

Probene i henhold til oppfinnelsen omfatter minst 10 nukleotider og omfatter høyst hele nukleotidsekvensen SEQ ID No. 1 eller hele nukleotidsekvensen SEQ ID No. 3 eller deres komplementærtråd.

Blant de korteste prober, dvs. med fra omtrent 10 til 15 nukleotider, svarer de passende hybridiseringsbetingelser til de temperatur- og ionestyrkebetingelser som vanlig anvendes av fagkyndige på området.

Probene i henhold til oppfinnelsen merkes foretrukket før bruk. For dette er det for fagkyndige tilgjengelig en rekke teknikker, som for eksempel fluorescensmerking, radioaktiv merking, kjemiluminescensmerking eller enzymatisk merking.

Nukleotidsekvensene i henhold til oppfinnelsen kan også anvendes for fremstillingen av og anvendelsen av sense- og/eller antisense- og lionukleotidprimere for sekvenseringsreaksjoner eller for spesifikke amplifikasjonsreaksjoner i henhold til den såkalte PCR (polymerasekjedereaksjon) teknikken eller enhver annen variant derav.

Nukleotidsekvensene i henhold til oppfinnelsen kan dessuten anvendes innen det terapeutiske området for fremstilling av antisense-sekvenser som er i stand til spesifikk hybridisering med en nukleinsyresekvens, inkluderende en messenger RNA, og kan anvendes innen genterapi.

De kan mere fordelaktig anvendes i behandling av allergier og av inflammasjon.

10 Nukleotidsekvensene i henhold til oppfinnelsen kan dessuten anvendes for fremstilling av de rekombinante polypeptider, som definert over, med en IL-13 reseptor aktivitet.

Disse polypeptider kan fremstilles fra nukleotidsekvensene som definert over i henhold til teknikker for fremstillingen av rekombinante produkter som er kjent for fagkyndige på området. I dette tilfellet anbringes den anvendte nukleotidsekvens under styring av signaler som tillater ekspresjon derav i en cellulær vert. Den cellulære vert som anvendes kan velges fra prokaryotiske systemer, slik som bakterier, eller fra eukaryotiske systemer, slik som gjær, insektceller, CHO celler (ovarieceller fra kinesisk hamster) eller fra ethvert annet system som fordelaktig er kommersielt tilgjengelig. En cellulær vert som er foretrukket for ekspresjonen av polypeptidene i henhold til oppfinnelsen utgjøres av fibroblastlinjen COS-7 eller COS-3.

Signalene som styrer ekspresjonen av polypeptidene, slik som promoterene, aktivatorene eller terminalsekvensene, velges i henhold til den vertscelle som anvendes. For dette formål kan nukleotidsekvensen i henhold til oppfinnelsen innføres i vektorer med autonom replikasjon i den valgte vert, eller integrerende vektorer av den valgte vert. Slike vektorer vil fremstilles i henhold til metoder som er vanlig anvendt av fagkyndige på området, og de oppnådde kloner kan innføres i en passende vert ved standardmetoder som for eksempel elektroporering.

I tilfellet av COS-7 eller COS-3 celler, kan transfeksjonen gjennomføres ved anvendelse av vektoren pSE-1, som beskrevet i (17).

- 5 Vertscellene ifølge oppfinnelsen som er transfektert med disse ekspresjonsvektorer kan oppnås ved innføring, i vertscellene, av en nukleotidsekvens innført i en vektor som definert over, etterfulgt av dyrking av de nevnte celler under betingelser som tillater replikasjon og/eller
10 ekspresjon av den transfekterte nukleotidsekvens.

- Disse celler kan anvendes i en fremgangsmåte for fremstilling av et rekombinant polypeptid med sekvens SEQ ID No. 2 eller SEQ ID No. 4 eller et derivat, hvor de transfekterte celler
15 dyrkes under betingelser som tillater ekspresjon av et rekombinant polypeptid med sekvens SEQ ID No. 2 eller SEQ ID No. 4, eller et derivat, og hvor det nevnte rekombinante polypeptid utvinnes.

- 20 Renseprosesser som anvendes er kjente for fagkyndige på området. Det rekombinante polypeptid kan renses fra cellelysater og ekstrakter, fra kultursupernatanten, ved hjelp av fremgangsmåter som anvendes individuelt eller i kombinasjon, som fraksjonering, kromatografimetoder, immunaффinitets-
25 teknikker ved anvendelse av spesifikke mono- eller polyklonale antistoffer.

- De mono- eller polyklonale antistoffer som er i stand til spesifikt å gjenkjenne IL-13R β og/eller IL-13R α i henhold til
30 den definisjon som er angitt over utgjør som nevnt også en del av oppfinnelsen. De polyklonale antistoffene kan oppnås fra serum fra et dyr som er immunisert mot IL-13R β og/eller IL-13R α i henhold til vanlig anvendte prosedyrer.

- 35 De monoklonale antistoffene kan oppnås i henhold til den konvensjonelle hybridom-dyrkingsmetode som beskrevet av Köhler og Milstein (Nature, 1975, 256, 495-497).

Fordelaktige antistoffer er antistoffer rettet mot det ekstracellulære domenet av IL-13R β og/eller IL-13R α .

Antistoffene i henhold til oppfinnelsen er for eksempel
5 kimære antistoffer, humaniserte antistoffer, Fab og F(ab')₂
fragmenter. De kan også eksistere i form av merkede antistoffer eller immunokonjugater. De kan for eksempel være assosiert med toksin som difteritoksinet eller med et radioaktivt produkt. Disse immunotoksiner kan i dette tilfelle
10 utgjøre terapeutiske midler som kan anvendes for behandling av visse patologier som involverer en overekspresjon av IL-13R β og/eller IL-13R α .

Antistoffene i henhold til oppfinnelsen, særlig de mono-
15 klonale antistoffer, kan også anvendes for immunocytokjemisk analyse av IL-13 reseptorene på spesifikke vevssnitt, for eksempel ved immunofluorescens eller ved gullmerking eller peroksidasemerking.

20 De kan fordelaktig anvendes i enhver situasjon hvor ekspresjonen av IL-13R β og/eller IL-13R α skal observeres, som for eksempel en unormal overekspresjon eller måling av reguleringen av membranekspresjon.

25 Oppfinnelsen vedrører også som nevnt et farmasøytisk preparat omfattende, som aktivt prinsipp, et polypeptid svarende til de ovennevnte definisjoner, foretrukket i en oppløselig form, eventuelt kombinert med en farmasøytisk aksepterbart vehikkel.

30 Et slikt polypeptid kan faktisk virke i konkurranse med IL-13R β og/eller IL-13R α uttrykt på celleoverflaten, og derved utgjøre en antagonist som er spesifikk for bindingen av IL-13 til dens reseptor, som fordelaktig kan anvendes for syntese av et medisinsk produkt som er egnet for å modulere
35 reaksjonene medierte ved IL-13 i patologiske situasjoner.

Tilstander som er forbundet med immunologiske reaksjoner medierte ved IL-13, kan behandles ved at det til en pasient administreres IL-13R β og/eller IL-13R α (eller ett av de

biologiske aktive fragmenter derav), eller at det administreres en forbindelse i stand til spesifikt å modulere den biologiske aktivitet derav, i kombinasjon med en farmasøytisk akseptertbar vehikkel.

5

Andre egenskaper og fordeler med den foreliggende oppfinnelse vil fremgå fra den etterfølgende beskrivelse omfattende eksemplene og figurene, hvor forklaringene er gitt i det etterfølgende.

10

Forklaring til figurene

Fig. 1: karakterisering av den humane IL-13R β reseptor tilstede i Caki-1 celler.

- a) Scatchard analyse (innføydd) av metningskurven av IL-13 merket med [125 I];
- b) binding av [125 I] [Phe43]-IL-13-GlyTyrGlyTyr i nærvær av økende konsentrasjoner av umerket IL-13 (·) og av IL-4 (o);
- c) kryssbindingsforsøk ved anvendelse av radioaktiv IL-13 i fravær (spor a) og i nærvær av ett hundre ganger overskudd av umerket IL-13 (spor b) eller av IL-4 (spor c);
- d) inhibering av sekresjonen av IL-6 induisert ved IL-13 og IL-4 i nærvær av et monoklonalt antistoff spesifikt for IL-4R kjeden og IL-4 antagonist Y124DIL-4.

20

Fig. 2: Nukleotidsekvens av cDNA av IL-13R β , og sammenligning av proteinsekvensen av IL-5R og IL-13R β .

- a) nukleotidsekvens av cDNA av IL-13R β . Aminosyrer svarende til signalpeptidet utledet av nukleinsyresekvensen er indikert i kursiv, og dem svarende til transmembrandomenet er indikert med uthevet skrift. De potensielle N-glykosyleringssteder (Asn-X-Ser/Thr) er understreket,
- b) oppstilling av aminosyrene av IL-13R β og IL-5R sekvensene. Proteinsekvensene av IL-13R og IL-5R er oppstilt som beskrevet over (24). Cysteinrestene og WSXWS motivet som er karakteristisk for denne familie av reseptorer er angitt i bokser.

30

35

Fig. 3: ekspresejonsmønster for IL-13R β mRNA.

RNA ble fremstilt fra følgende celler: Caki-1 (spor a), A431 (spor b), TF-1 (spor c), U937 (spor d), Jurkat (spor e) og IM9 (spor f).

5 Fig. 4: karakterisering av den rekombinante IL-13R β reseptoren for IL-13. COS-7 cellene er transfektert med IL-13R β cDNA og anvendt for:

a) studier for bindingen av radioaktivt merket IL-13 (innføyd) ved Scatchard analyse av metningskurven;

10 b) kryssbindingsforsøk ved anvendelse av radioaktivt merket IL-13 i fravær (spor a) og i nærvær av ett hundre ganger overskudd av umerket IL-13 (spor b); c-d) kotransfeksjonsforsøk ved anvendelse av klonet IL-13R β , IL-4R (gp140) og γ c kjeden etterfulgt av
15 bindingen av radioaktivt merket IL-13 (c) eller av IL-4 (d). De mørke og lyse kolonner representerer den spesifikke binding av henholdsvis IL-13 og av IL-4.

Fig. 5: inhibering av bindingen av IL-13 til IL-13R β ved den
20 oppløselige form av reseptoren (IL-13R β s) i transient ekspresjon.

Ekspresjonen av IL-13R β s i supernatanten av cellene transfektert med 2034 testes ved inhibering av bindingen av IL-13 på celler transfektert med IL-13R β
25 (2036). Supernatantene testes i den urene tilstand ved at de fortynnes 1/2 i den joderte ligand.

2036 NSB: ikke-spesifikk binding i nærvær av et overskudd av umerket IL-13.

2036 BT: total binding på celler transfektert med
30 2036

2036 + sgt 2034: binding til celler transfektert med 2036 i nærvær av supernatant av celler transfektert med 2034.

2036 + sgt pSE1: kontroll.

35 Fig. 6: inhibering av bindingen av IL-13 til IL-13R β ved den oppløselige form av reseptoren (IL-13R β s) på stabile linjer.

T2036-22: Total binding på klonet IL-13R β (2036-22)
i fravær av supernatant av klon som utskiller
IL-13R β s (referanse 100%)

2034-4

5

2034-6

2034-19 4 kloner IL-13R β s

2034-21

1274-20: i nærvær av supernatant av CHO celler som
ikke uttrykker IL-13R β s (kontroll).

10 Fig. 7: nukleotidsekvens av IL-13R α cDNA og sammenligning av
proteinsekvensene av human IL-13R α og murin IL-13R α .

a) Nukleotidsekvens av IL-13R α cDNA. Aminosyrene
svarende til signalpeptidet utledet fra nukleinsyre-
sekvensen er understreket med en prikket linje og
dem svarende til transmembrandomenet er understreket
15 med en dobbel linje. De potensielle N-glykosyler-
ingssteder (Asn-X-Ser/Thr) er angitt i bokser.

b) Oppstilling av aminosyrene av human IL-13R α og av
murin IL-13R α . Proteinsekvensene av human IL-13R α
20 og av murin IL-13R α er oppstilt som beskrevet over
(24). Cysteinrestene og motivet WSXWS som er karak-
teristisk for denne familie av reseptorer er angitt
i bokser.

Fig. 8: karakterisering av den rekombinante IL-13R α resep-
25 toren for IL-13.

CHO eller COS-3 cellene transfektert med IL-13R α
og/eller IL-4R cDNA og anvendt for:

a) studier av bindingen av jod-125 merket IL-13 ved
Scatchard analyse av metningskurven med CHO celler
30 transfektert med IL-13R β cDNA (fig. A), transfektert
med IL-13R β cDNA og IL-4R cDNA (fig. B),
transfektert med IL-13R α cDNA (fig. C) og
transfektert med IL-13R α cDNA og IL-4R cDNA (fig.
D),

35 b) konkurranseforsøk av binding av [125 I]-IL-13 på
CHO celler transfektert med IL-13R β cDNA (fig. E),
transfektert med IL-13R β cDNA og IL-4R cDNA (fig.
F), transfektert med IL-13R α cDNA (fig. G) og
transfektert med IL-13R α cDNA og IL-4R cDNA (fig.

H). De klare og skraverte kolonner representerer henholdsvis den spesifikke binding av radioaktivt merket IL-13 i nærvær av et overskudd (1.000 ganger mere) av IL-13 eller IL-4, de sorte kolonner representerer total binding.

Fig. 9: sammenligning av elektroforesemobiliteten i EMSA for cellulære ekstrakter som uttrykker IL-4 reseptoren alene (CHO-4), IL-13R α reseptoren alene (CHO-13) eller de kombinerte reseptorer IL-13R α og IL-4R (CHO-4-13) etter aktivisering av CHO cellene i nærvær av IL-4 eller IL-13 (4 eller 13), idet c representerer den ikke-aktiverte kontroll.

Materialer og metoder

15 Bindings- og kryssbindingsforsøk:

Bindings- og kryssbindingsforsøkene gjennomføres som beskrevet for [125 I][Phe43]-IL-13-GlyTyrGlyTyr (17).

Induksjon av sekresjon av IL-6:

20 Caki-1 celler (ATCC HTB46) anbringes i 24 brønns plater i en densitet på 5×10^4 celler/brønn og etter 3 døgns dyrking blir konfluente monolag vasket tre ganger med DMEM medium uten føtalt kalveserum. Stimuleringen av Caki-1 cellene gjennomføres med 30 ng/ml IL-4 eller IL-13 i fravær eller i nærvær
25 av Y124DIL-4 eller av et anti-gp140 monoklonalt antistoff. Mengden av IL-6 frigitt inn i kulturmediumet etter inkubasjon i 24 timer måles ved en ELISA teknikk (Innotest, Frankrike).

Isolering og analyse av det humane IL-13R β cDNA:

30 Total RNA ble ekstrahert fra Caki-1 cellene som beskrevet over (25). Poly(A) RNA isoleres fra de totale RNAer med magnetiske kuler belagt med oligo(dT) $_{25}$ (Dynal). Et cDNA bibliotek inneholdende 2×10^5 kloner ble konstruert ved anvendelse av en primer-adaptorprosedyre (26) og vektoren pSE-1 (27). Kloningsstrategien for ekspresjonen som ble
35 anvendt er beskrevet tidligere (17).

Fremstilling av human IL-13R β cDNA:

RNA prøvene kopieres med revers transkriptase underkastet PCR (polymerasekjedereaksjon) ved anvendelse av en sense primer svarende til sekvensen + 52 til + 71 og en antisense primer svarende til + 489 til 470 (nummereringen er gjort på grunnlag av den cDNA sekvens som er vist i fig. 2). De PCR-amplifiserte produkter hybridiseres med en probe som er komplementær til sekvensene + 445 til + 461 av cDNA. Størrelsesmarkørene er indikert på venstre side av figuren.

10

Isolering og analyse av det humane IL-13R α cDNA:

1) Fremstilling av den murine IL-13R α probe.

a) Dyrking av B9 cellene (28).

15 B9 cellene dyrkes i RPMI medium (Gibco) supplert med 10% føtalt kalveserum og 50 μ g/ml gentamycin.

b) Fremstilling av RNA av B9 cellene.

Cellene vaskes to ganger med PBS buffer (fosfatbufret salt-oppløsning, referanse 04104040-GIBCO-BRL). Etter sentrifugering i 10 minutter ved 1.000 rpm suspenderes cellepelleten i lysisbuffer med følgende sammensetning: 4M guanidin-tiocyanat, 25 mM natriumcitrat pH 7, 0,5% sarkosyl, 0,1 M β 2-merkaptoetanol.

25 Suspensjonen ultralydbehandles ved anvendelse av en Ultraturax sonikator nr. 231256 (JANKE og KUNDEL) ved maksimal kraft i ett minutt. Natriumacetat pH 4 tilsettes til 0,2 M. Oppløsningen ekstraheres med en volumdel av en fenol/kloroformblanding (volum/volum: 5/1).

30 RNA inneholdt i den vandige fase presipiteres ved -20°C ved hjelp av en volumdel isopropanol. Pelleten resuspenderes i lysisbuffer. Oppløsningen ekstraheres igjen med en fenol/kloroformblanding og RNA presipiteres med isopropanol Etter vasking av pelleten med 70% og deretter med 100% etanol
35 resuspenderes RNA i vann.

c) Fremstilling av det komplementære DNA.

cDNA fremstilles fra 5 μ g total RNA ved anvendelse av en poly T12 primer. Det totale RNA inkuberes i en volumdel på 30 μ l

buffer: 50 mM Tris-HCl pH 8,3, 6 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 40 mM KCl, inneholdende 0,5 mM av hver av deoksynukleotid-trifosfatene og 30 enheter Rnasin (Promega), i en time ved 37°C, og deretter i 10 minutter ved 50°C, og deretter i ytterligere 10
 5 minutter ved 37°C, med 200 enheter av det reverse transkriptaseenzym Rnase H (Gibco-BRL referanse 8064A). Reaksjonen stanses ved oppvarming i 10 minutter ved 65°C.

d) Spesifikk amplifikasjon av et IL-13R α cDNA fragment fra
 10 mus ved PCR teknikken.

Polymeriseringen gjennomføres med 6 μ l cDNA i 50 μ l sluttvolum med bufferen med følgende sammensetning: 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 2,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 4 dNTP 0,2 mM, 2 μ g/ml av hver av de to nukleinsyreprimere og 2,5 U TAQ DNA polymerase
 15 (Beckman). Primerparene velges på sekvensen publisert av Hilton (22).

Sense primer: nukleotid 249 til 268

5' AGAGGAATTACCCCTGGATG 3'

20 Antisense primer: nukleotid 1256 til 1275

5' TCAAGGAGCTGCTTTCTTCA 3'

Reaksjonen gjennomføres i 30 sykluser av 1 minutt ved 94°C, 1 minutt ved 58°C, 4 minutter ved 72°C, etterfulgt av en
 25 endelig syklus på 10 minutter ved 72°C.

e) Rensing av PCR amplifikasjonsproduktet.
 Etter kjøring på en 1% agarosegel (Sigma) i TAE buffer (40 mM, Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 7,9) i 1 time ved 100 volt,
 30 farges gelen i nærvær av 1 μ g/ml etidiumbromid i den samme buffer. Båndet svarende til amplifikasjonsproduktet (cDNA fragment på 1027 basepar (bp) av IL-13R α) ekstraheres ved anvendelse av et Glass Max kit (Gibco).

35 f) Fremstilling av proben.

25 ng av det rensede cDNA fragment på 1027 bp svarende til IL-13R α musereseptoren merkes med fosfor-32 med BRL random primere DNA merkesystemkit ved en spesifikk aktivitet på $2,4 \times 10^9$ dpm/ μ g og alternativt merkes 100 ng ved

nicktranslasjon ved anvendelse av Boeringher kitet ved en spesifikk aktivitet på 4×10^8 dpm/ μ g.

2) Isolering og analyse av det humane IL-13R α cDNA.

5 a) Fremstilling av total RNA.

Det totale RNA ble ekstrahert fra Caki-1 celler som beskrevet over i avsnitt 1b.

b) Rensing av messenger RNA (polyA+ fraksjon).

10 Rensingen av polyA+ fraksjonen av RNA gjennomføres ved anvendelse av DYNAL oligo (dT)₂₅ Dynabeads kitet (referanse 610.05) idet man følger prosedyren som er anbefalt av produsenten. Prinsippet er basert på bruk av superparamagnetiske polystyrenkuler på hvilke et poly(dT)₂₅ oligonukleotid er
15 festet. PolyA+ fraksjonen hybridiseres med oligo(dT)₂₅ oligonukleotidet koblet til kulene som er fanget på en magnetisk bærer.

c) Northern blott.

20 5 μ g av polyA+ messenger RNA anbringes på en 1% agarose, 8% formaldehyd-denatureringsgel i MOPS buffer (10 mM pH 7,4, 0,5 mM EDTA). Etter migrering og overføring på en N+ Hybond membran (Amersham) i en 20X SSC buffer, fikseres RNAet ved oppvarming i en ovn ved 80°C under vakuum. Membranen pre-
25 hybridiseres deretter i 2 timer ved 42°C i følgende buffer: 1 M NaCl, 30% formamid, 1% SDS, 5X Denhart's, 100 μ g/ml laksesperma DNA. Etter 2 timers prehybridisering hybridiseres membranen i den samme buffer med en konsentrasjon av IL-13R α museprobe fremstilt ved random priming på $2,5 \times 10^6$
30 dpm/ml i 16 timer. Membranen vaskes deretter to ganger i 30 minutter i 2X SSC 0,1% SDS buffer ved romtemperatur og deretter i 2 timer ved 50°C i den samme buffer. Etter 4 døgns eksponering i en kasset (Molecular Dynamics), analyseres Northern blottet med et Instant Imager (Molecular
35 Dynamics). Et dominerende transkript på 4.200 bp og en dublett på 1.500 bp og 2.000 bp detekteres i Caki-1 cellene, U373 og U937.

Karakterisering av egenskapene av det humane IL-13R α og IL-13R β :

COS-7 eller CHO cellene transfekteres i Petri skåler som
 5 beskrevet over (17). 24 timer senere trypsinbehandles
 cellene og dyrkes i 24 brønns plater ved en densitet på 8×10^4
 celler/brønn. Etter dyrking i 48 timer ved 37°C, anvendes
 cellene for bindingsforsøk (analyser gjennomført in triplo
 viser en variasjon på mindre enn 10%) med jodert IL-13 som
 10 beskrevet (17). For transfeksjon, ble denne bevirket på COS-
 7 eller CHO cellene i 25 cm² plater ved anvendelse av 0,6 mg
 av forskjellige plasmider. Etter 24 timer trypsinbehandles
 cellemonolagene og dyrkes i 12 brønns plater ved 8×10^4
 celler/brønn. Tre døgn senere ble bindings- og
 15 konkurranseforsøk gjennomført med merket IL-13 og med umerket
 IL-13 og/eller IL-4. Resultatene er representative for minst
 tre forsøk gjennomført uavhengig av hverandre.

Sammenligning av elektroforetiske mobiliteter i EMSA for
 20 nukleærestraktene av celler som uttrykker human IL-13R α
 og/eller IL-4R:
 2×10^6 CHO celler ble platet ut på 10 cm Petri skåler. 24
 timer senere transfekteres cellene med 6 μ g plasmid DNA (34).
 Etter 48 timer inkuberes cellene ved 37°C i 30 minutter i 3
 25 ml medium med eller uten IL-13 eller IL-4 i en konsentrasjon
 på 100 ng pr. ml. Cellene blir deretter vasket to ganger med
 en PBS-0,5 mM EDTA buffer og deretter høstet i 1,2 ml PBS.
 Cellene sentrifugeres deretter og celleekstraktene
 fremstilles som beskrevet i (35). EMSA gjennomføres deretter
 30 som beskrevet i (36) med 10 til 20 μ g celleekstrakter og med
 en oligonukleotidprobe radioaktivt merket med ³²P (50.000-
 100.000 cpm), en probe svarende til Ce elementet av den
 humane Ce promoter (37). Oligonukleotidproben som
 syntetiseres har følgende sekvens:
 35 5'-GATCCACTTCCAAGAACAGA-3'.

EKSEMPLER

Eksempel 1

Analyse av ekspresjonen av human IL-13R β på overflaten av Caki-1 celler

Man har nylig funnet at humane renale karsinomceller uttrykte, i tillegg til reseptorene delt med IL-4 og IL-13, et stort overskudd av spesifikke IL-13 reseptorer (21). På grunnlag av disse resultater, ble en prøve av humane karsinomcellelinjer studert for bindingen av IL-13 som beskrevet over (17). En spesifikk linje, Caki-1 (ATCC HTB46), som uttrykker et særlig høyt antall bindingssteder for IL-13, ble analysert i større detalj. Scatchard kurvene oppnådd fra metningsforsøk viste tilstedeværelsen av bindingssteder med en Kd på 446 ± 50 pM og en kapasitet på $7,2 \times 10^4$ reseptorer/celle (fig. 1a). I konkurrerende forsøk deplasserer umerket IL-13 fullstendig merket IL-13 på en doseavhengig måte, mens IL-4 deplasserer, med en høy affinitet, omtrent 10% av merket IL-13. Høyere konsentrasjoner av IL-4 (mere enn 100 nM) deplasserer ikke de resterende 90% av bundet IL-13 (fig. 1b).

Disse resultater er i overensstemmelse med eksistensen av to seter, ett som deles av de to cytokiner, det andre spesifikt for IL-13. Forsøkene på kryssbinding med affinitet for IL-13 viste et kompleks på omtrent 70 kDa, som stemmer overens med komplekset observert i lignende kryssbindingsforsøk med IL-13 i forskjellige celletyper (17, 21). Merket IL-13 deplasseres fullstendig fra komplekset ved IL-13 men ikke ved IL-4, som er i overensstemmelse med de konkurrerende forsøk (fig. 1c).

Eksempel 2

Analyse av sekresjon av IL-6 indusert ved IL-4 eller IL-13

De foreliggende oppfinnere har også analysert sekresjonen indusert ved IL-4 eller IL-13 på Caki-1 celler. De to cytokiner induserer sekresjonen av tilsvarende nivåer av IL-6, og sekresjonen inhiberes ved antistoffer som er spesifikke for α kjeden av IL-4R og ved antagonisten Y124DIL-4 (fig. 1d). Dette foreslår at reseptorene som deles av de to cytokiner i Caki-1 cellene er ansvarlig for induksjonen av sekresjonen av IL-6. Tilsvarende resultater observeres når fosforyleringen av proteinkomplekset IRS1/4PS

(18) induisert ved IL-4 og IL-13 analyseres i nærvær eller i fravær av anti-IL-4R antistoffer og av IL-4 antagonist.

Disse resultater, sett under ett, foreslår at reseptor-
 5 komplekset IL-4/IL-13 uttrykt i Caki cellene er identisk med
 det som er beskrevet tidligere og at proteinet som binder
 IL-13 (IL-13R β) som er over-uttrykt, er en komponent av
 reseptoren ansvarlig for gjenkjennelsen av IL-13 i et funk-
 sjonelt kompleks som inkluderer IL-4R. Disse celler blir
 10 derfor anvendt som en messenger RNA kilde for kloningen av
 denne IL-13 bindingsentitet.

Eksempel 3

Kloning av den primære subenhet av IL-13 reseptoren (IL-13R β)

15 Strategien for kloningen og ekspresjonen som ble anvendt er
 beskrevet tidligere (17). Et cDNA bibliotek inneholdende
 2×10^5 rekombinante kloner ble konstruert (26) ved anvendelse
 av Caki-1 celler. Biblioteket ble oppdelt i batcher på 1.000
 cDNAer hvor DNA i hver batch, i plasmidform, ble innført i
 20 COS-7 celler (29). Bindingen av merket IL-13 til de trans-
 ferkterte COS-7 celler gjør det mulig å identifisere batchene
 av kloner som koder for en IL-13 reseptor. De positive
 batcher ble fordelt på nytt og rescreenet inntil et enkelt
 klon i stand til å gjennomføre syntesen av et celleover-
 25 flateprotein i stand til binding av IL-13 er identifisert.
 To uavhengige IL-13R β cDNAer ble til slutt isolert. Den
 fullstendige nukleotidsekvens for IL-13R β cDNA og aminosyre-
 sekvensen utledet derfra er vist i fig. 2a. cDNA har en
 lengde på 1298 baser som utelukker poly-A halen og har en
 30 kort 3' ikke-translatert region på 106 baser. Et kanonisk
 AATAAA polyadenyleringssignal er på forventet sted. Den åpne
 leseramme mellom nukleotider 53 og 1192 definerer et poly-
 peptid på 380 aminosyrer. Sekvensen koder for et membran-
 protein med et potensielt signalpeptid, et enkelt trans-
 35 membrandomene og en kort intracytoplasmatisk hale.

Fire potensielle N-glykosyleringssteder er lokalisert i den ekstracellulære region. Det er viktig å merke seg at to konsensusmotiver som er betraktet som signaturer for type II

familien av cytokinreseptorer (30) også er til stede, hvor det første er avledet fra en N-terminal disulfidbro-sløyfe-struktur, og det andre er WSXWS type motivet lokalisert i den C-terminale ende av den ekstracellulære region. Den svært
 5 korte cytoplasmatiske sekvens vil kunne forklare hvorfor det kun er reseptorkomplekset som deles av IL-4 og av IL-13 i Caki cellene som transduserer et signal i cellen.

Oppstillingsstudier viser homologier med den humane IL-5R α
 10 kjeden (51% likhet og 27% identitet, fig. 2b) og, i mindre grad, med prolaktinreseptoren. Det er interessant å merke seg at IL-5R komplekset utgjøres av en α kjede som binder IL-5 men som behøver et annet protein, β kjeden delt med IL-3 og GM-CSF reseptorene, for å danne en høyaffinitetsreseptor
 15 som er i stand til å transdusere et signal (31).

Eksempel 4

Deteksjon av humane IL-13R β messenger RNAer i forskjellige cellelinjer

20 I Caki-1 cellene ble tilsvarende mengder messenger RNAer for IL-13R β og IL-4R overraskende detektert ved hjelp av Northern analyser skjønt et stort overskudd av IL-13R β er uttrykt. Denne observasjon foreslår at det er en større translasjon av dette mRNA sammenlignet med IL-4R transkriptet og forklarer
 25 mangelen på deteksjon av IL-13R β mRNA i cellelinjene som uttrykte et lite antall IL-13R bindingssteder. RT-PCR analyser (fig. 3) viser at transkriptet funnet i Caki-1 cellene også er til stede i mindre mengder i den keratinocytiske linje A431, premyeloidcellene TF-1, de premocytiske celler
 30 U937 og cellelinjen B IM9. Intet transkript ble detektert i Jurkat T cellelinjen eller i pre-B NALM6 cellelinjen. Disse resultatene er i overensstemmelse med IL-13 bindingsstudiene utført på de samme linjer som beskrevet tidligere av forfatterene av den foreliggende oppfinnelse (17), og med de kjente
 35 biologiske IL-13 targeter.

Eksempel 5Bindingsanalyser gjennomført på COS-7 celler transfektert med human IL-13R β cDNA

- COS-7 cellene transfektert med det isolerte cDNA som koder
- 5 for IL-13R β binder spesifikt merket IL-13. Scatchard analysen av metningskurven viser et enkelt komponentsete med en Kd verdi på 250 ± 30 pM og en maksimal bindingskapasitet på $5,6 \times 10^5$ reseptorer/celle (fig. 4a).
- 10 Affiniteten av den rekombinante reseptor er i god overensstemmelse med Kd verdien på 446 pM for IL-13R β i Caki-1 cellene og det som er blitt beskrevet for en rekke andre celler (17). Følgelig, til tross for en sekvenshomologi med α kjeden av IL-5R, opptrer den klonede reseptor annerledes da
- 15 den ikke behøver en andre kjede for å rekonstituere et høy-affinitets-bindingssete.

- Det er interessant å merke seg at proteinet som binder IL-15 og som nylig er blitt beskrevet likeledes har egenskapen med
- 20 binding av IL-15 med en høy affinitet i fravær av de to andre komponenter av IL-15R komplekset (32).

- I konkurrerende forsøke er IL-13 i stand til å inhibere bindingen av merket IL-13 til den klonede reseptor, med en inhiberingskonstant (K_i) på $1,5 \pm 0,5$ nM, mens IL-4 ikke inhiberer bindingen. Farmakologien for den klonede reseptor er derfor lik den for IL-13R β til stede i Caki-1 celler. Kryssbindingsforsøk viser et radioaktivt merket bånd på 70kDa. Dette bånd har den samme mobilitet som det som observeres i Caki
- 30 celler så vel som i andre celler (17). Dette kompleks svarer mest sannsynlig til 60-70 kDa båndet observert i tillegg til IL-4R 140 kDa båndet i kryssbindingsforsøk gjennomført med merket IL-4. Dette vil også kunne foreslå at der eksisterer en sterk interaksjon mellom de to proteiner i det funksjonelle reseptorkompleks. Forfatterne av den foreliggende opp-
- 35 finnelse undersøkte derfor om IL-13R β og IL-4R interagerer i cellemembranen for å rekonstituere en reseptor som tillater kryss-konkurrering mellom de to cytokiner. Resultatene av et koekspresjonsforsøk er vist i fig. 4 c og d.

Det fremgår klart at ekspresjonen av de to reseptorer, enten separat eller samtidig, resulterer i et stort antall reseptorer som spesifikt gjenkjenner den ene eller den andre av de to cytokiner. Når de uttrykkes sammen, er imidlertid et lite
 5 antall reseptorer (5 til 10%) i stand til å gjenkjenne de to cytokinene. Kotransfeksjonen av γ c kjeden med IL-4R og IL-13R β bevirker ikke en økning i antallet delte bindings-seter. Disse resultater foreslår at IL-13R β og IL-4R kjeden kan interagere med hverandre i cellemembranen for å rekonstituere en reseptor for hvilken IL-13 og IL-4 kan være i konkurranse.
 10 Den lave prosentandel rekonstituerte reseptorer er et argument som favoriserer tilstedeværelsen av et annet protein (IL-13R α) i begrensede mengder i COS cellene som er nødvendig for rekonstitueringen av reseptorkomplekset hvortil
 15 IL-13 og IL-4 binder på konkurrerende måte.

De resultater som oppnås i transfeksjonsforsøkene med γ c kjeden viser at dette protein ikke er den begrensende faktor som foreslått tidligere (15). Denne konklusjon er også
 20 understøttet av fraværet av γ c messenger RNA i Caki-1 cellene (21).

En annen mulig grunn som forklarer det lave antallet rekonstituerte reseptorer er forekomsten av en ukorrekt stœkiometri av de to proteiner i cellemembranen. Kotransfeksjoner ved anvendelse av forskjellige relative mengder av IL-4R og IL-13R β viser imidlertid ikke en stor forskjell i antallet rekonstituerte reseptorer. Muligheten av at en annen IL-13R med en større kapasitet til å interagere med IL-4R eksisterer
 30 ble bekreftet i mus (22) og i menneske ved isolering av IL-13R α cDNA (konf. eksempel 7). Det skal bemerkes at ekspresjonen av γ c øker bindingen av IL-4 som beskrevet tidligere (19) men reduserer bindingen av IL-13, noe som foreslår en kompleks interaksjon mellom de forskjellige kjeder.

35

Eksempel 6

Studium av inhiberingen av bindingen av IL-13 til dens membranreseptor ved en reseptor i oppløselig form

Resultatene i transient ekspresjon (fig. 5) eller på stabile linjer (fig. 6) er beskrevet.

De to cDNA sekvenser som koder for IL-13R β og IL-13R β s inn-
5 føres i vektoren p7055 i stedet for IL-2 cDNA (33). De opp-
nådde plasmider betegnes henholdsvis 2036 og 2034.

a) Transient ekspresjon.

CHO cellene inokuleres i 12 brønns plater ved 3×10^5 celler/-
10 brønn og transfekteres den neste dag ved hjelp av DEAE-
Dextran metoden som for COS cellene, enten med plasmid 2036
eller 2034, eller med det tomme plasmid pSE-1 som kontroll.

Cellene dyrkes i tre døgn for å tillate akkumulering av
15 IL-13R β s i supernatanten til cellene transfektert med plas-
midet 2034 og god ekspresjon av IL-13R β i membranen til
cellene transfektert med plasmidet 2036.

Supernatanten til cellene transfektert med IL-13R β s (2034)
20 eller den negative kontroll (tom pSE-1) samles deretter og
cellene transfektert med IL-13R β anvendes til å studere inhi-
beringen av bindingen av IL-13.

Bindingen av IL-13 til overflaten av CHO cellene som ut-
25 trykker IL-13R β (2036) måles i nærvær eller fravær av disse
urene supernatanter fortynnet en til to med radioliganden
eller i nærvær av overskudd av ikke-radioaktivt IL-13 (NSB).
Bindingen gjennomføres på hele celler i et sluttvolum på
500 ml med 300 pM radioligand, in triplo.

30

b) Stabile linjer.

To stabile transformerte CHO linjer oppnås ved transfeksjon
med kodesekvensene av den komplette IL-13R β (polypeptid på
380 rester) eller av IL-13R β i oppløselig form (IL-13R β s,
35 trunkert polypeptid svarende til rester 1 til 337 i IL-13R β).
Disse sekvenser innføres i vektoren p7055.

CHO-DHFR⁻ cellene transfekteres med plasmidene 2036 (IL-13R β) og 2034 (IL-13R β s) og de rekombinante kloner velges som beskrevet tidligere (33).

- 5 Ett av klonene CHO-IL-13R β (CHO 2036) som oppnås med 2 til 5×10^5 seter pr. celle, inokuleres i en 12 brønns plate med en densitet på 10^5 celler pr. brønn og cellene anvendes to døgn senere for bindingsforsøk i nærvær eller fravær av IL-13R β s.
- 10 For dette inokuleres CHO-IL-13R β s (CHO 2034) kloner i 6 cm skåler, in triplo, ved 5×10^5 celler pr. skål. Etter 3 døgns akkumulering i dyrkingsmediet, samles mediet (5 ml pr. skål) for IL-13 bindingsinhiberingstudier på IL-13R β av CHO 2036 klonet. På samme måte blir supernatanten fra CHO celler som
- 15 ikke uttrykker det oppløselige IL-13R β samlet.

- Bindingen av IL-13 på overflaten av CHO 2036-22 klonet måles i nærvær eller fravær av disse urene supernatanter fortynnet en til to med radioliganden, eller i nærvær av et overskudd
- 20 av ikke-radioaktivt merket IL-13 (NSB). Bindingen gjennomføres in triplo, på hele celler, i et volum på 500 ml med 300 pM radioligand.

- Histogrammene i figurene 5 og 6 representerer inhiberingen av
- 25 bindingen av IL-13 på IL-13R β ved IL-13R β s. Inhibering av bindingen av IL-13 til dets reseptor kan observeres på en rekke kloner.

Eksempel 7

- 30 Kloning av den humane IL-13R α reseptor

a) Fremstilling av cDNA biblioteket fra polyA⁺ messenger RNAer av Caki-1 celler.

- Med utgangspunkt i 0,5 μ g polyA⁺ messenger RNA, fremstilles enkelttrådet komplementært DNA merket med [³²P]dCTP (det
- 35 komplementære DNA som oppnås har en spesifikk aktivitet på 3.000 dpm/ng) med den syntetiske primer som har følgende sekvens (omfattende et BamHI sete):

5'<GATCCGGGCCCTTTTTTTTTTTT<3'

i et volum på 30 μ l av følgende buffer: 50 mM Tris-HCl pH 8,3, 6 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT, 40 mM KCl, inneholdende 0,5 mM av hver av deoksynukleinsyretрифосfatene, 30 μ Ci [$\alpha^{32}P$]dCTP og 30 U Rnasin (Promega). Etter inkubasjon i en time ved 37°C og deretter 10 minutter ved 50°C og deretter i ytterligere 10 minutter ved 37°C med 200 enheter av det reverse transkriptaseenzym Rnase H (Gibco -BRL), tilsettes 4 μ l EDTA. RNA templatet nedbrytes deretter ved tilsetning av 6 μ l av en 2 N NaOH oppløsning og man inkuberer i 5 minutter ved 65°C.

10

For å fjerne den syntetiske primer, blir det komplementære DNA rensset på en 1 ml Sephacryl S400 kolonne (Pharmacia), ekvilibrert i TE buffer. De første to radioaktive fraksjoner kombineres og presipiteres med en 1/10 volumdel av en 10 M ammoniumacetatoppløsning og 2,5 volumdeler etanol, dette etter ekstraksjon med kloroform. cDNA utvides deretter i 5' retningen ved tilsetning av en dG homopolymer hale med 20 enheter av enzymet terminal transferase (Pharmacia 27073001). Deretter gjennomføres inkubasjon i 20 μ l buffer med følgende sammensetning: 30 mM Tris-HCl pH 7,6, 1 mM koboltklorid, 140 mM kakodylsyre, 0,1 mM DTT, 1 mM dGTP, i 15 minutter ved 37°C, og deretter tilsettes 2 μ l 0,5 M EDTA. En videre behandling med natriumhydroksyd gjennomføres uten oppvarming, etterfulgt av en ny rensing på en S400 kolonne, ekstraksjon med kloroform og presipitering med etanol. Pelletten oppløses i 33 μ l TE buffer. Det neste trinn omfatter paring av kloningsvektoren pT7T3-18 gjennom hvilken en homopolymer dC hale er blitt addert på forhånd etter kutting med PstI, cDNA og adaptoren. cDNA (33 μ l) bringes i kontakt med 75 ng av vektoren pT7/T3-18 (5 μ l), 120 ng adaptor (1 μ l) med følgende sekvens (omfattende et ApaI sete),

5'AAAAAAAAAAAAAGGGCCCG 3'

10 μ l av en 200 mM NaCl oppløsning og blandingen inkuberes deretter i 5 minutter ved 65°C og deretter avkjøles reaksjonsblandingen til romtemperatur. Det neste trinn omfatter ligeringen av kloningsvektoren og den enkelttrådede cDNA i et reaksjonsvolum på 100 μ l med 32,5 enheter av enzymet T4 fag DNA ligase (Pharmacia) over natten ved 15°C i en buffer med sammensetning: 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM ATP.

35

Proteinene fjernes deretter ved ekstraksjon med fenol etterfulgt av ekstraksjon med kloroform og deretter tilsettes en 1/10 volumdel av 10 mM ammoniumacetatoppløsning og 2,5 volumdeler etanol. Blandingen sentrifugeres, pelleten tas opp i
5 bufferen med sammensetningen: 33 mM Tris-acetat pH 7,9, 62,5 mM kaliumacetat, 1 mM magnesiumacetat og 1 mM DTT, den andre cDNA tråd syntetiseres i et volum på 30 μ l med 30 enheter av enzymet T4 fag DNA polymerase (Pharmacia) og en blanding av 1 mM av de fire deoksynukleotidtrifosfater så vel
10 som to enheter av proteinet av T4 fag genet 32 (Pharmacia) i en time ved 37°C. Blandingen ekstraheres med fenol og spor fjernes ved avsetning på en P10 kolonne (Biogel P10-200-400 mesh - referanse 15011050 - Biorad).

15 Det siste trinn omfatter transformering av E. Coli MC 1061 celler ved elektroporering av det rekombinante DNA ved anvendelse av et Biorad Gene Pulser apparat anvendt ved 2,5 kV under de betingelser som anbefales av produsenten, og deretter dyrkes bakteriene i en time i LB medium med sammen-
20 setningen: baktotrypton 10 g/l, gjærekstrakt 5 g/l, NaCl 10 g/l.

Antallet oppnådde uavhengige kloner bestemmes ved utplating av en 1/1.000 fortynning fra transformasjonen etter en times
25 inkubasjon på en plate av LB medium supplert med 1,5% agar (vekt/volum) og med 100 μ g/ml ampicillin i det etterfølgende betegnet LB agarmedium.

Antallet oppnådde uavhengige kloner er 1 million.

30

b) Screening av cDNA biblioteket.

Hele biblioteket ble utplatet på agarmedium (Petri skåler med diameter 150 mm) belagt med Biodyne A membraner (PALL referanse BNNG 132). Etter henstand over natten ved 37°C over-
35 føres klonene ved kontakt på de nye membraner. De sistnevnte behandles ved at de anbringes på et Wathman 3 MM papir som er impregnert med følgende oppløsninger: 0,5 N NaOH, 1,5 M NaCl i 5 minutter og deretter 0,5 Tris-HCl pH 8, 1,5 M NaCl i 5 minutter. Etter behandling med proteinase K i den følgende

buffer, 10 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA, 50 mM NaCl, 0,1% SDS, 100 µg/ml proteinase K i 30 minutter ved 37°C, vaskes membranene inngående i 2X SSC buffer (natriumcitrat-NaCl), og tørkes deretter i en ovn under vakuum ved 80°C i 20 minutter.

5

c) Prehybridisering og hybridisering av membranene.

Membranene prehybridiseres i 2 timer ved 42°C i følgende

buffer: 1 mM NaCl, 30% formamid, 1% SDS, 5X Denhart's

100 µg/ml laksesperma DNA. Etter 2 timers prehybridisering,

10 hybridiseres membranene i den samme buffer med en

konsentrasjon av IL-13Rα probe fra mus fremstilt ved nick-

translasjon av $2,5 \times 10^6$ dpm/ml, i 16 timer. Membranene vaskes

to ganger i 30 minutter i 2X SSC, 0,1% SDS buffer ved

romtemperatur og deretter i to timer ved 50°C i den samme

15 buffer. Etter eksponering ved -8°C i nærvær av en Kodak

X-OMAT film over natten, detekteres en rekke positive kloner.

d) Sekvensering av et humant IL-13Rα klon og analyse av sekvensen.

20 Sekvensen oppnås ved anvendelse av et kit fra Applied Bio-

system (referanse 401628). Den komplette nukleinsyresekvens

av IL-13Rα cDNA og aminosyresekvensen utledet derfra er vist

i fig. 7. cDNA har 3999 baser med utelukkelse av poly-A

halen og har en lang ikke-translatert 3' region på 2145

25 baser.

Et kanonisk polyadenyleringssignal eksisterer på det for-

ventede sted. Den åpne leseramme mellom nukleotidet 34 og

1851 definerer et polypeptid på 427 aminosyrer. Sekvensen

30 koder for et membranprotein med et potensielt signalpeptid og

et enkelt transmembrandomene og en kort intracytoplasmatiske

region.

10 potensielle glykosyleringssteder er lokalisert i den

35 ekstracellulære region. Det er viktig å merke seg at to

konsensusmotiver betraktet som signaturer av type II familien

av cytokinreseptorer også er til stede, idet det første er

avledet fra en N-terminal disulfidbro-sløyfestructur, og den

andre er WSXWS type motivet lokalisert i den C-terminale ende av den ekstracellulære region.

Eksempel 8

5 Bindingsanalyse gjennomført på COS-3 eller CHO celler transfektert med human IL-13R α cDNA

CHO cellene transfektert med det isolerte cDNA som koder for IL-13R α binder spesifikt merket IL-13. Scatchard analyse av metningskurven viser et enkelkomponentsete med en Kd verdi på
10 4,5 $\pm$ 0,4 nM og en maksimum bindingskapasitet på 26.000 reseptorer/celle (figurene 8C og 8G).

Resultatene av koekspresjonsforsøkene er vist i figurene 8D og 8H.

15

Analyse av resultatene i fig. 8C viser at IL-13R α er godt uttrykt i klonet 2036 av CHO cellene. Det skal bemerkes at IL-4R deplasserer 60% av bindingen av IL-13 i CHO cellene kotransfektet med IL-4R og IL-13R α cDNA (fig. 8H) men under
20 hensyntagen til en Kd på 7,5 nM for IL-13R α vil der være 10 ganger så mange IL-13R α seter som IL-4R seter.

CHO-hIL4R cellene (human IL-4R) som uttrykkes hIL-4R som er transfektert med det cDNA som koder for hIL-13R α binder
25 spesifikt merket IL-13.

Scatchard analysen av metningskurven viser klart 2 komponent-seter, ett med høy affinitet med en Kd verdi på 23 $\pm$ 8,9 pM og en maksimal bindingskapasitet på 28.000 seter/celle og den
30 andre med lav affinitet med en Kd verdi på 4,2 $\pm$ 1,4 nM og en maksimal bindingskapasitet på 150.000 seter/celle (fig. 8D).

Det andre sete som er karakterisert har den samme affinitet som hIL-13R α (human IL-13R α) uttrykt alene og svarer til de
35 ikke-assosierte IL-13R α kjeder fordi de er uttrykt i en større mengde enn hIL-4R.

Disse høyaffinitetsreseptorer som er rekonstituert i nærvær av 2 hIL-13R α og hIL-4R kjedene er i stand til å gjenkjenne

de 2 cytokiner (figurer 8D og 8H). Dette er enda klarere på COS/pSE1 cellene som ko-uttrykker 2 hIL-13R α og hIL-4R kjedene i en sammenlignbar mengde hvor IL-4 deplasserer all IL-13 bindingen.

5

Affiniteten av den rekombinante humane IL-13R α er sammenlignbar med den som er beskrevet for IL-13R α musereseptoren (2-10 nM) (ref. 22).

- 10 I motsetning til hIL-13R β som er beskrevet tidligere, utgjør human IL-13R α ikke alene et høyaffinitets-bindingssete.

IL-13R α og IL-4R interagerer derfor i cellemembranen for å rekonstituere en høyaffinitetsreseptor.

15

Eksempel 9

Aktivering av STAT proteinene ved IL-13 og IL-4 i CHO cellene som ko-uttrykker hIL-13R α og hIL-4R

- I humane PBMC celler aktiverer hIL-4 og IL-13 2 tryosin-
- 20 kinaser av janusfamilien, Jak1 og Jak2 som fosforylerer en latent transkripsjonsfaktor, STAT6. Denne aktiverte faktor går inn i kjernen og binder til spesifikke elementer i promotorene til gener regulert ved IL-4.
- 25 Man velger C ϵ elementet av den humane C ϵ promotoren som probe i en elektroforese-mobilitets-svitsj-analyse (EMSA) for å demonstrere aktiveringen, ved IL-13, av en bindingsfaktor som er lik STAT6.
- 30 Kjerneekstraktene fra CHO cellene som uttrykker IL-13R alene, IL-4R alene eller de 2 kjedene sammen, stimulert med 100 ng/ml IL-13 eller IL-4 i 30 min. ved 37°C, inkuberes med det radioaktivt merkede C ϵ elementet.
- 35 Kjerneekstraktene av cellene som ko-uttrykker hIL-13R α og hIL-4R danner et kompleks med den samme mobilitet i EMSA enten cellene er indusert med IL-4 eller IL-13 (se fig. 9). På den annen side, med de cellene som uttrykker den ene eller den andre kjede alene, detekteres intet kompleks.

I CHO cellene som uttrykker hIL-13R α og hIL-4R α , initierer derfor IL-13 og IL-4 den samme signalkaskade.

Kloningen av IL-13R β og IL-13R α som beskrevet her gjør det
5 mulig å forbedre kunnskapen vedrørende de faktorer som er
involvert i responsene spesifikt indusert ved IL-13 sammen-
lignet med responsene indusert ved IL-4. Den gjør det i til-
legg mulig å ha et verktøy for å studere reguleringen av
ekspressjonen av reseptoren under normale og patologiske
10 forhold hvor IL-13 spiller en nøkkelrolle.

Dessuten gjør tilgjengeligheten av cDNA det mulig å forenkle
kloningen av andre proteiner som er nødvendige for rekonsti-
tueringen av et IL-4/IL-13 reseptorkompleks og er også
15 anvendbar for fremstillingen eller den rasjonelle utforming
av nye medisinske produkter i stand til å være spesifikke
antagonister av aktivitetene av IL-13.

REFERANSER:

1. Minty, A. et al., *Nature*, 1993, 362, 248-250.
2. McKenzie, A.N. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1993, 90, 3735-3739.
- 5 3. Defrance, T. et al., *J. Exp. Med.*, 1994, 179, 135-143.
4. Punnonen, J. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 1993, 90, 3730-3734.
5. Fior, R. et al., *Eur. Cytokine Network*, 1994, 5, 593-600.
- 10 6. Muzio, M. R. F. et al., *Blood*, 1994, 83, 1738-1743.
7. De Waal Malefyt, R. et al., *J. Immunol*, 1993, 151, 6370-6381.
8. Doyle, A. et al., *Eur. J. Immunol.* 1994, 24, 1441-1445.
- 15 9. Montaner, L.J. et al., *J. Exp. Med.*, 1993, 178, 743-747.
10. Sozzani, P. et al., *J. Biol. Chem.*, 1995, 270, 5084-5088.
- 20 11. Herbert, J.M. et al., *Febs Lett.*, 1993, 328, 268-270.
12. Derocq, J.M. et al., *Febs Lett.* 1994, 343, 32-36.
13. Zurawski, G. et al., *Immunol. Today*, 1994, 15, 19-26.
- 25 14. *Interleukin-13 for Cytokines in Health and Disease.* Eds D.G. Remick and J.S. Frie, Marcel Dekker, N.Y. 1996.
15. Zurawski S.M. et al., *Embo Journal*, 1993, 12, 2663-2670.
- 30 16. Aversa, G. et al., *J. Exp. Med.*, 1993, 178, 2213-2218.
17. Vita, N. et al., *Biol. Chem.*, 1995, 270, 3512-3517.
18. Lefort, S. et al., *Febs Lett.*, 1995, 366, 122-126.
19. Kondo, M. et al., *Science*, 1993, 262, 1874-1883.
- 35 20. Russell, S.M. et al., *Science*, 1993, 262, 1880-1883.
21. Obiri, N. et al., *J. Biol. Chem.*, 1995, 270, 8797-8804.
22. Hilton, D.J. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,

- 1996, 93, 497-501.
23. Callard, R.E. et al., Immunology Today, 1996, 17, 3
108-110.
 24. Devereaux, J. et al., Nucleic Acids Res., 1984, 12,
5 387-395.
 25. Chomczynski, P. et al., N. Anal. Biochem., 1987,
162, 156-159.
 26. Caput, D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1986,
83, 1670-1674.
 - 10 27. Minty, A. et al., Eur. Cytokine Network, 1993, 4,
99-110
 28. Labit Le Bouteiller, C. et al., J. of Immunol.
Methods, 1995, 181, 1, 29-36.
 29. Seed, B. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987,
15 84, 3365-3369.
 30. Bazan, J.F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA,
1990, 87, 6934-6938.
 31. Honjo, T. et al., Current Opinion in Cell Biology,
1991, 1, 201-203.
 - 20 32. Giri, J.G. et al., Embo Journal, 1993, 14, 3654-
3663.
 33. Miloux, B. et al., Gene, 1994, 149, 341-344.
 34. Sampayrac, L.M. et al., PNAS USA, 1981, 78, 7575-
7578.
 - 25 35. Jiang, S-W et al., Nucleic Acid Res., 1995, 23,
3607-3608.
 36. Köhler, I. et al., FEBS Letters, 1994, 345, 187-192.
 37. Seidel, H.M. et al., PNAS USA, 1995, 92, 3041-3045.

SEKVENSLISTE

<110> Sanofi-Synthélabo

<120> Polypeptide récepteur de l'IL-13

<130> BET 96/884

<140> PCT/FR96/01756

<141> 1996-11-07

<150> FR 95/14424

<151> 1995-12-06

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1298

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

ggtgcctgtc ggogggggaga gaggcaatat caaggtttta aatctcggag aaatggcttt 60
cgtttgcttg gctatcggat gcttatatac ctttctgata agcacaacat ttggctgtac 120
ttcatcttca gacaccgaga taaaagttaa ccctcctcag gattttgaga tagtggatcc 180
cggatactta ggttatctct atttgcaatg gcaacccccca ctgtctctgg atcattttta 240
ggaatgcaca gtggaatatg aactaaaata ccgaaacatt ggtagtgaaa catggaagac 300
catcattact aagaatctac attacaaaga tgggtttgat cttacaagg gcattgaagc 360
gaagatacac acgcttttac catggcaatg cacaaatgga tcagaagttc aaagttcctg 420
ggcagaaact acttattgga tatcaccaca aggaattoca gaaactaaag ttcaggatat 480
ggattgcgta tattacaatt ggcaatatct actctgttct tggaaacctg gcatagggtg 540
acttcttgat accaattaca acttgtttta ctggtatgag ggcttggatc atgcattaca 600
gtgtgttgat tacatcaagg ctgatggaca aaatatagga tgcagatttc cctatttgga 660
ggcatcagac tataaagatt tctatatttg tgttaatgga tcatcagaga acaagcctat 720
cagatccagt tatttcactt ttcagcttca aaatatagtt aaacctttgc cgccagtcta 780
tcttactttt actcgggaga gttcatgtga aattaagctg aaatggagca tacctttggg 840
acctattcca gcaaggtggt ttgattatga aattgagatc agagaagatg atactacctt 900
ggtgactgct acagttgaaa atgaaacata caccttgaaa acaacaaatg aaacccgaca 960
attatgcttt gtagtaagaa gcaaagtga tttttattgc tcagatgacg gaatttggag 1020
tgagtggagt gataaacaat gctgggaagg tgaagacctc tcgaagaaaa ctttgctacg 1080
tttctggcta ccatttggtt tcatcttaat attagttata tttgtaaccg gtctgctttt 1140
gcgtaagcca aacacctacc caaaaatgat tccagaattt ttctgtgata catgaagact 1200
ttccatatca agagacatgg tattgactca acagtttcca gtcatggcca aatgttcaat 1260
atgagtctca ataaactgaa tttttcttgc gaatgttg 1298

```

<210> 2

<211> 380

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

```

Met Ala Phe Val Cys Leu Ala Ile Gly Cys Leu Tyr Thr Phe Leu Ile
  1           5           10           15

```

```

Ser Thr Thr Phe Gly Cys Thr Ser Ser Ser Asp Thr Glu Ile Lys Val
      20           25           30

```

```

Asn Pro Pro Gln Asp Phe Glu Ile Val Asp Pro Gly Tyr Leu Gly Tyr

```

35					40					45					
Leu	Tyr	Leu	Gln	Trp	Gln	Pro	Pro	Leu	Ser	Leu	Asp	His	Phe	Lys	Glu
50					55					60					
Cys	Thr	Val	Glu	Tyr	Glu	Leu	Lys	Tyr	Arg	Asn	Ile	Gly	Ser	Glu	Thr
65					70					75					80
Trp	Lys	Thr	Ile	Ile	Thr	Lys	Asn	Leu	His	Tyr	Lys	Asp	Gly	Phe	Asp
					85				90					95	
Leu	Asn	Lys	Gly	Ile	Glu	Ala	Lys	Ile	His	Thr	Leu	Leu	Pro	Trp	Gln
			100					105					110		
Cys	Thr	Asn	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Ser	Ser	Trp	Ala	Glu	Thr	Thr	Tyr
		115					120					125			
Trp	Ile	Ser	Pro	Gln	Gly	Ile	Pro	Glu	Thr	Lys	Val	Gln	Asp	Met	Asp
	130					135					140				
Cys	Val	Tyr	Tyr	Asn	Trp	Gln	Tyr	Leu	Leu	Cys	Ser	Trp	Lys	Pro	Gly
145					150					155					160
Ile	Gly	Val	Leu	Leu	Asp	Thr	Asn	Tyr	Asn	Leu	Phe	Tyr	Trp	Tyr	Glu
			165					170						175	
Gly	Leu	Asp	His	Ala	Leu	Gln	Cys	Val	Asp	Tyr	Ile	Lys	Ala	Asp	Gly
			180					185					190		
Gln	Asn	Ile	Gly	Cys	Arg	Phe	Pro	Tyr	Leu	Glu	Ala	Ser	Asp	Tyr	Lys
		195					200					205			
Asp	Phe	Tyr	Ile	Cys	Val	Asn	Gly	Ser	Ser	Glu	Asn	Lys	Pro	Ile	Arg
	210					215					220				
Ser	Ser	Tyr	Phe	Thr	Phe	Gln	Leu	Gln	Asn	Ile	Val	Lys	Pro	Leu	Pro
225					230					235					240
Pro	Val	Tyr	Leu	Thr	Phe	Thr	Arg	Glu	Ser	Ser	Cys	Glu	Ile	Lys	Leu
			245						250					255	
Lys	Trp	Ser	Ile	Pro	Leu	Gly	Pro	Ile	Pro	Ala	Arg	Cys	Phe	Asp	Tyr
			260				265						270		
Glu	Ile	Glu	Ile	Arg	Glu	Asp	Asp	Thr	Thr	Leu	Val	Thr	Ala	Thr	Val
		275				280						285			
Glu	Asn	Glu	Thr	Tyr	Thr	Leu	Lys	Thr	Thr	Asn	Glu	Thr	Arg	Gln	Leu
	290					295					300				
Cys	Phe	Val	Val	Arg	Ser	Lys	Val	Asn	Ile	Tyr	Cys	Ser	Asp	Asp	Gly
305					310					315					320
Ile	Trp	Ser	Glu	Trp	Ser	Asp	Lys	Gln	Cys	Trp	Glu	Gly	Glu	Asp	Leu
			325						330					335	
Ser	Lys	Lys	Thr	Leu	Leu	Arg	Phe	Trp	Leu	Pro	Phe	Gly	Phe	Ile	Leu
			340					345					350		
Ile	Leu	Val	Ile	Phe	Val	Thr	Gly	Leu	Leu	Leu	Arg	Lys	Pro	Asn	Thr
	355						360					365			

Tyr Pro Lys Met Ile Pro Glu Phe Phe Cys Asp Thr
 370 375 380

<210> 3
 <211> 4009
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 3
 tcagccccgc cgggctccga ggcgagaggg tgcattggagt ggccggcgcg gctctgcggg 60
 ctgtggggcg tgctgctctg cgccggcggg gggggcgggg gcggggcgcg cgcgcctacg 120
 gaaactcagc cacctgtgac aaatttgagt gtctctgttg aaaacctctg cacagtaata 180
 tggacatgga atccaccgga gggagccagc tcaaatgtga gtctatggta ttttagtcat 240
 tttggcgaca aacaagataa gaaaatagct ccggaaactc gtcgttcaat agaagtaccc 300
 ctgaatgaga ggatttgtct gcaagtgggg tccagtgta gcaccaatga gaggagaaag 360
 cctagcattt tggttgaaaa atgcattctca ccccagaag gtgacctga gctgctgtg 420
 actgagcttc aatgcatttg gcacaacctg agctacatga agtggtcttg gctccctgga 480
 aggaatacca gtcccgacac taactatact ctctactatt ggcacagaag cctggaaaaa 540
 attcatcaat gtgaaaacat ctttagagaa ggccaatact ttggttgctt ctttgatctg 600
 accaaagtga aggattccag ttttgaacaa cacagtgtcc aaataatggt caaggataat 660
 gcaggaaaaa ttaaaccttc cttcaatata gtgcctttta cttcccggtg gaaacctgat 720
 cctccacata ttaaaaacct ctccctccac aatgatgacc tatatgtgca atgggagaat 780
 ccacagaatt ttatttagcag atgcctattt tatgaagtag aagtcaataa cagccaaact 840
 gagacacata atgttttcta cgtccaagag gctaaatgtg agaattccaga atttgagaga 900
 aatgtggaga atacatcttg tttcatggtc cctggtgttc ttctgatac tttgaacaca 960
 gtcagaataa gagtcaaaac aaataagtta tgctatgagg atgacaaact ctggagtaat 1020
 tggagccaag aaatgagtat aggtagaag cgcgaattcca cactctacat aacctgtta 1080
 ctcatgttcc cagtcattct cgcaggtgca atcatagtag tctgtcttta cctaaaaagg 1140
 ctcaagatta ttatattccc tccaattcct gatcctggca agatttttaa agaaatgttt 1200
 ggagaccaga atgatgatac tctgcactgg aagaagtacg acatctatga gaagcaaacc 1260
 aaggaggaaa ccgactctgt agtgctgata gaaaacctga agaaagcctc tcagtgatgg 1320
 agataattta tttttacctt cactgtgacc ttgagaagat tcttccatt ctccatttgt 1380
 tatctgggaa cttattaaat ggaaactgaa actactgcac catttaaaaa caggcagctc 1440
 ataagagcca caggctcttta tgttgagtcg cgcacggaaa aactaaaaat aatgggcgct 1500
 ttggagaaga gtgtggagtc attctcattg aattataaaa gccagcaggc ttcaaaactag 1560
 gggacaaaagc aaaaagtgat gatagtgggt gagttaatct tatcaagagt tgtgacaact 1620
 tcttgaggga tctatacttg ctttgtgttc tttgtgtcaa catgaacaaa ttttatttgt 1680
 aggggaactc atttggggtg caaatgctaa ttgtcaaaact gaggcacaaa gaacatgtag 1740
 aaaaacaaat ggataaaatc tgatatgtat tgtttgggat cctattgaac catgtttgtg 1800
 gctattaaaa ctcttttaac agtctgggtt ggttccggtg gctcacgctt gtaatcccag 1860
 caatttggga gtccgaggcg ggcggatcac tcgaggtcag gaggttccaga ccagcctgac 1920
 caaaatggtg aaacctcctc tctactaaaa ctacaaaaat taactgggtg tgggtggcgcg 1980
 tgccgtgaat ccagctactc cgggaagctg aggcaggtga attgtttgaa cctgggagggt 2040
 ggaggttgca gtgagcagag atcacaccac tgcaactctag cctgggtgac agagcaagac 2100
 tctgtctaaa aaacaaaaca aaacaaaaca aaacaaaaca acctcttaat attctggagt 2160
 catcattccc ttgcagagca ttttctcttg ctttgaaagc ccagaaaatc agtgttggcc 2220
 atgatgacaa ctacagaaaa accagaggca gcttctttgc caagaccttt caaagccatt 2280
 ttaggtctgtt aggggcagtg gaggtagaat gactccttgg gtattagagt ttcaaccatg 2340
 aagtctctaa caatgtattt tcttcacctc tgctactcaa gtagcattta ctgtgtcttt 2400
 gggttgtgct agggcccccg gtgtgaagca cagacccctt ccagggtttt acagtctatt 2460
 ttgagactct cagttcttgc cacttttttt tttaatctcc accagtcatt tttcagacct 2520
 ttttaactct caattccaac actgatttcc ccttttgcac tctccctcct tcccttcttt 2580
 gtagcctttt gactttcatt ggaaattagg atgtaaatct gctcaggaga cctggaggag 2640
 cagaggataa ttatcatctc aggttaagtg tgagtaatct gagaaacaat gactaattct 2700
 tgcataattt gtaacttcca tgtgagggtt ttcagcattg atatttgtgc attttctaaa 2760
 cagagatgag gtggtatctt cacgtagaac attggtattc gcttgagaaa aaaagaatag 2820
 ttgaacctat ttctctttct ttacaagatg ggtccaggat tctctttttc tctgccataa 2880
 atgattaatt aaatagcttt tgtgtcttac attggtagcc agccagccaa ggctctgttt 2940
 atgcttttgg ggggcatata ttgggttcca ttctcaccta tccacacaac atatccgtat 3000

```

atatccctc tactcttact tcccccaat ttaaagaagt atgggaaatg agaggcattt 3060
ccccacccc atttctctcc tcacacacag actcatatta ctggtaggaa cttgagaact 3120
ttatttccaa gttgttcaaa catttaccaa tcataattaat acaatgatgc tatttgcaat 3180
tcctgtcctc aggggagggg agataagaaa ccctcactct ctacaggttt gggtaacaagt 3240
ggcaacctgc ttccatggcc gtgtagaagc atgggtgccct ggcttctctg aggaagctgg 3300
ggttcatgac aatggcagat gtaaagttat tcttgaagtc agattgaggc tgggagacag 3360
ccgtagtaga tggttctactt tggtctgctg ttctctagaa agaataattg gttttcctgt 3420
ataggaatga gattaattcc tttccaggta ttttataatt ctgggaagca aaacccatgc 3480
ctccccctag ccatttttac tgttatccta tttagatggc catgaagagg atgctgtgaa 3540
attcccaaca aacattgatg ctgacagtca tgcagtctgg gagtggggaa gtgatctttt 3600
gttcccatcc tcttctttta gcagtaaaat agctgaggga aaagggaggg aaaagggaagt 3660
tatgggaata cctgtggtgg ttgtgatccc taggtcttgg gagctcttgg aggtgtctgt 3720
atcagtggat ttcccatccc ctgtgggaaa ttagtaggct catttactgt tttaggtcta 3780
gcctatgtgg attttttctt aacataccta agcaaaccce gtgtcaggat ggtaattctt 3840
attctttcgt tcagttaagt ttttcccttc atctgggcac tgaagggata tgtgaaacaa 3900
tgttaacatt tttggtagtc ttcaaccagg gattgtttct gtttaacttc ttataggaaa 3960
gcttgagtaa aataaatatt gtctttttgt atgtcaccca aaaaaaaaaa 4009

```

<210> 4

<211> 427

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

```

Met Glu Trp Pro Ala Arg Leu Cys Gly Leu Trp Ala Leu Leu Leu Cys
 1             5             10             15

Ala Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Ala Pro Thr Glu Thr Gln
      20             25             30

Pro Pro Val Thr Asn Leu Ser Val Ser Val Glu Asn Leu Cys Thr Val
      35             40             45

Ile Trp Thr Trp Asn Pro Pro Glu Gly Ala Ser Ser Asn Cys Ser Leu
      50             55             60

Trp Tyr Phe Ser His Phe Gly Asp Lys Gln Asp Lys Lys Ile Ala Pro
      65             70             75             80

Glu Thr Arg Arg Ser Ile Glu Val Pro Leu Asn Glu Arg Ile Cys Leu
      85             90             95

Gln Val Gly Ser Gln Cys Ser Thr Asn Glu Ser Glu Lys Pro Ser Ile
      100            105            110

Leu Val Glu Lys Cys Ile Ser Pro Pro Glu Gly Asp Pro Glu Ser Ala
      115            120            125

Val Thr Glu Leu Gln Cys Ile Trp His Asn Leu Ser Tyr Met Lys Cys
      130            135            140

Ser Trp Leu Pro Gly Arg Asn Thr Ser Pro Asp Thr Asn Tyr Thr Leu
      145            150            155            160

Tyr Tyr Trp His Arg Ser Leu Glu Lys Ile His Gln Cys Glu Asn Ile
      165            170            175

Phe Arg Glu Gly Gln Tyr Phe Gly Cys Ser Phe Asp Leu Thr Lys Val
      180            185            190

```

Lys Asp Ser Ser Phe Glu Gln His Ser Val Gln Ile Met Val Lys Asp
 195 200 205
 Asn Ala Gly Lys Ile Lys Pro Ser Phe Asn Ile Val Pro Leu Thr Ser
 210 215 220
 Arg Val Lys Pro Asp Pro Pro His Ile Lys Asn Leu Ser Phe His Asn
 225 230 235 240
 Asp Asp Leu Tyr Val Gln Trp Glu Asn Pro Gln Asn Phe Ile Ser Arg
 245 250 255
 Cys Leu Phe Tyr Glu Val Glu Val Asn Asn Ser Gln Thr Glu Thr His
 260 265 270
 Asn Val Phe Tyr Val Gln Glu Ala Lys Cys Glu Asn Pro Glu Phe Glu
 275 280 285
 Arg Asn Val Glu Asn Thr Ser Cys Phe Met Val Pro Gly Val Leu Pro
 290 295 300
 Asp Thr Leu Asn Thr Val Arg Ile Arg Val Lys Thr Asn Lys Leu Cys
 305 310 315 320
 Tyr Glu Asp Asp Lys Leu Trp Ser Asn Trp Ser Gln Glu Met Ser Ile
 325 330 335
 Gly Lys Lys Arg Asn Ser Thr Leu Tyr Ile Thr Met Leu Leu Ile Val
 340 345 350
 Pro Val Ile Val Ala Gly Ala Ile Ile Val Leu Leu Leu Tyr Leu Lys
 355 360 365
 Arg Leu Lys Ile Ile Ile Phe Pro Pro Ile Pro Asp Pro Gly Lys Ile
 370 375 380
 Phe Lys Glu Met Phe Gly Asp Gln Asn Asp Asp Thr Leu His Trp Lys
 385 390 395 400
 Lys Tyr Asp Ile Tyr Glu Lys Gln Thr Lys Glu Glu Thr Asp Ser Val
 405 410 415
 Val Leu Ile Glu Asn Leu Lys Lys Ala Ser Gln
 420 425

PATENTKRAV

1. Renset polypeptid,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter en amino-
5 syresekvens valgt blant:
 - a) sekvensen SEQ ID No. 2,
 - b) en hvilken som helst sekvens avledet fra SEQ ID No. 2 ved mutasjon, delesjon, addisjon, substitusjon og/eller kjemisk modifikasjon av en eller av et begrenset antall
10 aminosyrer, hvori nevnte polypeptid med sekvens avledet fra SEQ ID No. 2 har den samme biologiske aktivitet som polypeptidet omfattende aminosyresekvensen SEQ ID No. 2.
2. Polypeptid som angitt i krav 1,
15 k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter aminosyresekvensen SEQ ID No. 2.
3. Polypeptid som angitt i krav 1,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det er polypeptidet
20 med sekvens SEQ ID No. 2 hvori de 8 C-terminale restene er substituert med de etterfølgende 6 rester: VRCVTL.
4. Polypeptid som angitt i krav 1,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det er en oppløselig
25 form som strekker seg opp til rest 343.
5. Polypeptid som angitt i krav 1,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det er en oppløselig
form som strekker seg opp til rest 337.
30
6. Isolert nukleinsyresekvens,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den koder for et polypeptid som angitt i ett eller flere av kravene 1 til 5.
- 35 7. Isolert nukleinsyresekvens som angitt i krav 6,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den er valgt fra:
 - (a) sekvensen SEQ ID No. 1,

- (b) nukleinsyresekvensene som er i stand til å hybridisere med sekvensen SEQ ID No. 1 og som koder for et polypeptid med en IL-13 β -reseptor aktivitet,
- (c) nukleinsyresekvensene avledet fra sekvenser a) og b) som et resultat av degenereringen av den genetiske koden.

8. Nukleinsyresekvens som angitt i krav 7, karakterisert ved at den omfatter eller består av en serie av nukleotider som strekker seg fra nukleotid nr. 1 til nukleotid 1081, og foretrukket til nukleotid 1063 på sekvensen SEQ ID No. 1.

9. Renset polypeptid, karakterisert ved at det omfatter sekvensen SEQ ID No. 4.

10. Renset polypeptid, karakterisert ved at det er en oppløselig form av polypeptidet med sekvens SEQ ID No. 4 som strekker seg opp til rest 343 og foretrukket opp til restene mellom 336 og 342.

11. Isolert nukleinsyresekvens, karakterisert ved at den koder for et polypeptid som angitt i krav 9 eller 10.

12. Isolert nukleinsyresekvens som angitt i krav 11, karakterisert ved at den valgt fra:

- (a) sekvensen SEQ ID No. 3,
- (b) nukleinsyresekvensene avledet fra sekvens a) som et resultat av degenereringen av den genetiske koden.

13. Nukleinsyresekvens som angitt i krav 11, karakterisert ved at den omfatter eller består av en serie av nukleotider som strekker seg fra nukleotid 1 til nukleotid 1059, og foretrukket til nukleotidene mellom nr. 1041 og 1056 på sekvensen SEQ ID No. 3.

14. Klonings- og/eller ekspresjonsvektor,

k a r a k t e r i s e r t v e d at den inneholder en nukleinsyresekvens som angitt i ett eller flere av kravene 6 til 8 og 11 til 13.

5 15. Vektor som angitt i krav 14,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den er plasmidet PSE-1.

16. Vertscelle,
10 k a r a k t e r i s e r t v e d at den er transfektert med en vektor som angitt i krav 14 eller 15.

17. Transfektet vertscelle som angitt i krav 16,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den er en celle fra
15 cellelinjen COS-7, COS-3 eller CHO.

18. Nukleotid probe som hybridiserer spesifikt med hvilken som helst av sekvensene som angitt i krav 6 til 8, de komplementære sekvensene derav eller de tilsvarende budbringer
20 RNA'er,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den inkluderer hele sekvensen SEQ ID No. 1 eller den komplementære tråden derav.

19. Nukleotid probe som hybridiserer spesifikt med hvilken
25 som helst av sekvensene som angitt i krav 11 til 13, de komplementære sekvensene derav eller tilsvarende budbringer RNA'er,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den inkluderer hele sekvensen SEQ ID No. 3 eller den komplementære tråden derav.

30
20. Antisense-sekvens som er i stand til å i det minste delvis inhibere produksjon av polypeptidet som angitt i ett eller flere av kravene 1 til 5 og 9 til 10,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den er valgt fra
35 sekvensene som utgjør leserammen som koder for et polypeptid som angitt i ett eller flere av kravene 1 til 5 og 9 til 10 på transkripsjonsnivået.

21. Anvendelse av en nukleinsyresekvens som angitt i ett eller flere av kravene 6 til 8 og 11 til 13 for fremstilling av et rekombinant polypeptid som angitt i ett eller flere av kravene 1 til 5 og 9 til 10.

5

22. Fremgangsmåte for å fremstille et rekombinant IL-13 reseptor polypeptid, k a r a k t e r i s e r t v e d at transfekterte celler som angitt i krav 16 eller 17 dyrkes under betingelser som
10 tillater ekspresjonen av et rekombinant polypeptid som angitt i ett eller flere av kravene 1 til 5 eller 9 til 10 og hvor nevnte rekombinante polypeptid utvinnes.

23. Monoklonale eller polyklonale antistoffer, konjugerte
15 antistoffer eller fragmenter derav, k a r a k t e r i s e r t v e d at de er i stand til spesifikt å gjenkjenne et polypeptid som angitt i ett eller flere av kravene 1 til 5 og 9 til 10.

20 24. Monoklonale eller polyklonale antistoffer, konjugerte antistoffer eller fragmenter derav, k a r a k t e r i s e r t v e d at de nevnte antistoffer er merkede antistoffer, kimære antistoffer, humaniserte antistoffer, eller Fab eller F(ab')₂ fragmenter som er i stand
25 til å spesifikt gjenkjenne et polypeptid som angitt i ett eller flere av kravene 1 til 5 og 9 til 10.

25. Farmasøytisk preparat, k a r a k t e r i s e r t v e d at det som aktivt
30 prinsipp omfatter et polypeptid som angitt i ett eller flere av kravene 1 til 5 eller 9 til 10.

26. Farmasøytisk preparat som angitt i det foregående krav, k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter et polypeptid som angitt i ett eller flere av kravene 4, 5 eller 10.
35

27. Anvendelse av et polypeptid som angitt i ett eller flere av kravene 1 til 5 for å screene midler som er i stand til å modifisere aktiviteten av IL-13R β .

28. Anvendelse av et polypeptid som angitt i krav 9 eller 10 for å screene midler som er i stand til å modifisere aktiviteten av IL-13R α .

5 29. Anvendelse av et polypeptid som angitt i krav 4, 5 eller 10 for å syntetisere et IL-13 antagonistisk legemiddel som er egnet for å behandle tilstander som responderer på en IL-13 antagonistisk effekt.

10 30. Anvendelse av et polypeptid som angitt i ett eller flere av kravene 1 til 5 eller 9 til 10 for å fremstille et farmasøytisk preparat som kan anvendes for å regulere immunologiske og inflammatoriske mekanismer produsert ved IL-13.

1/19

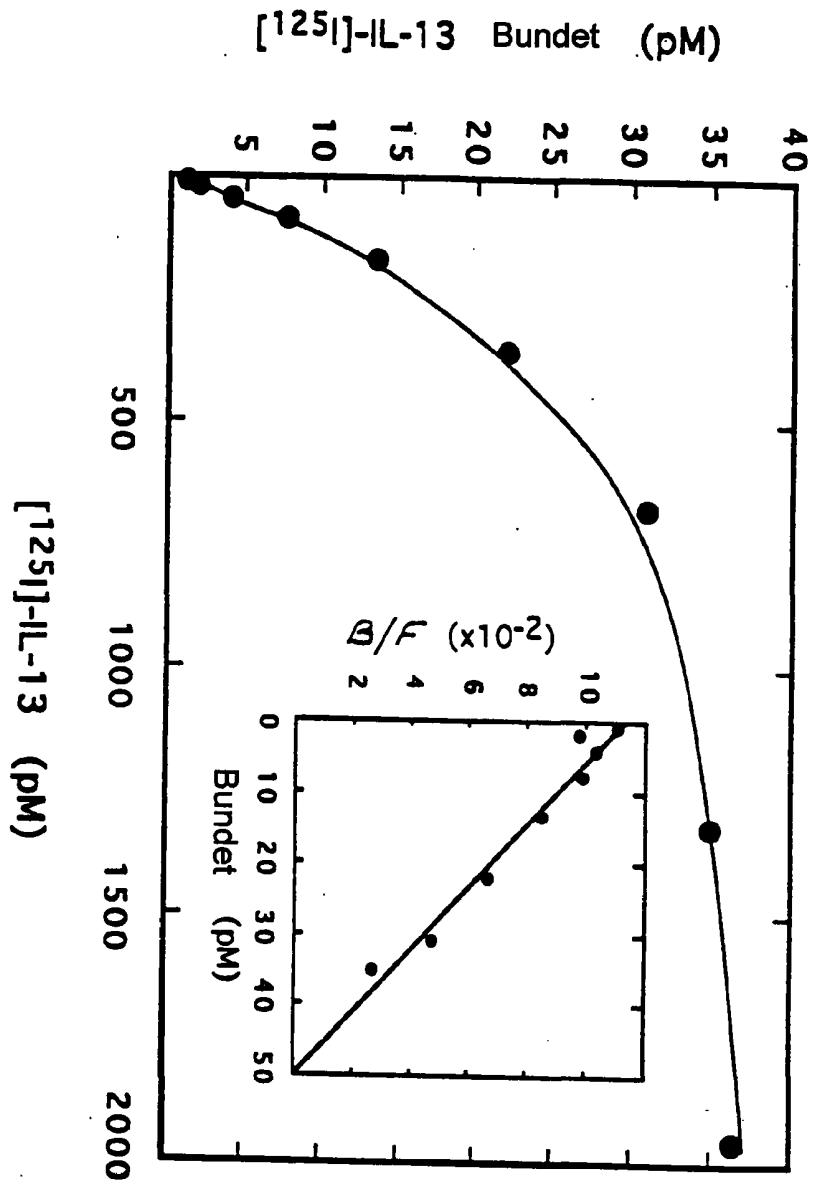


FIG. 1a

2/19

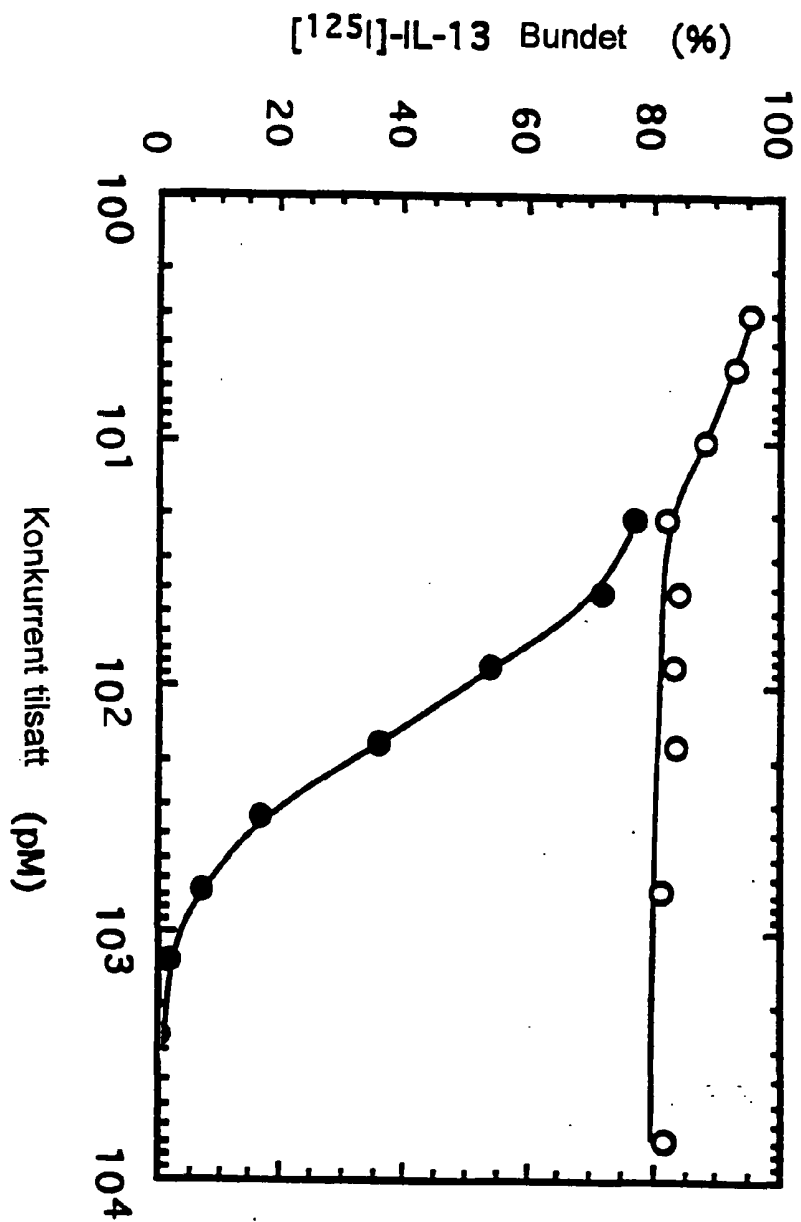


FIG.1b

3/19

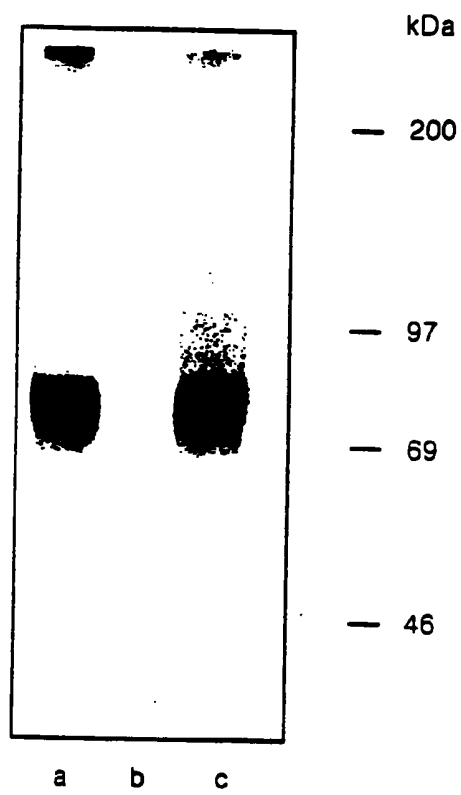


FIG.1c

4/19

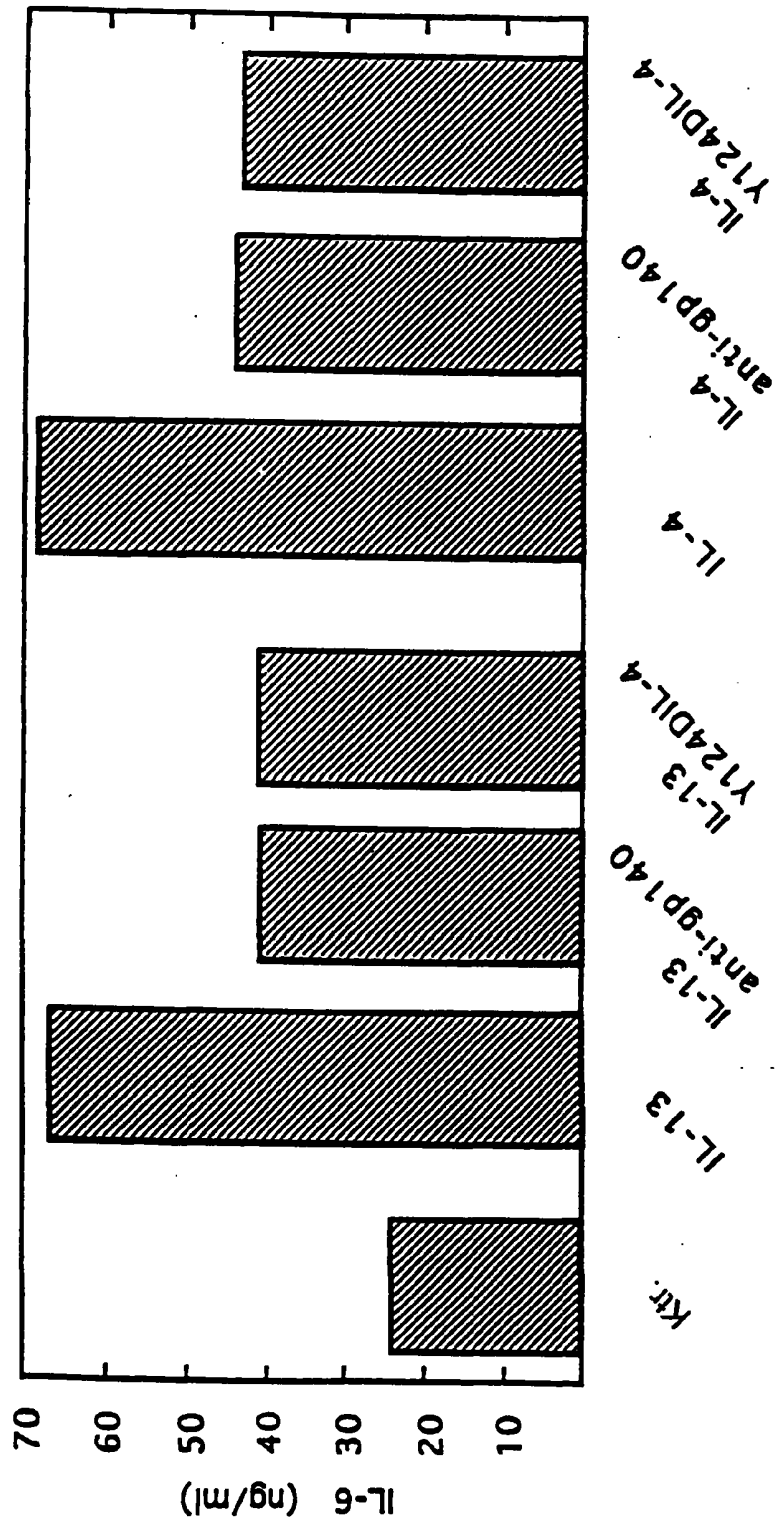


FIG.1d

5/19

1	GGTGCCTGTGCGCGGGGAGAGAGGCAATATCAAGTTTTTAAATCTCGGAGAAATGGCT	58
1		2
59	TTCGTTTGCTTGGCTATCGGATGCTTATATACCTTTCTGATAAGCACAAACATTGGCTGT	118
3	PheValCysLeuAlaIleGlyCysLeuTyrThrPheLeuIleSerThrThrPheGlyCys	22
119	ACTTCATCTTCAGACACCGAGATAAAAGTTAAACCTCCTCAGGATTTTGAGATAGTGGAT	178
23	ThrSerSerSerAspThrGluIleLysValAsnProProGlnAspPheGluIleValAsp	42
179	CCCGGATACTTAGGTTATCTCTATTTGCAATGGCAACCCCACTGTCTCTGGATCATTTT	238
43	ProGlyTyrLeuGlyTyrLeuTyrLeuGlnTrpGlnProProLeuSerLeuAspHisPhe	62
239	AAGGAATGCACAGTGGAAATATGAACATAAAATACCGAAACATTGGTAGTGAACATGGAAG	298
63	LysGluCysThrValGluTyrGluLeuLysTyrArgAsnIleGlySerGluThrTrpLys	82
299	ACCATCATTAAGAATCTACATTACAAAGATGGGTTTGATCTTAACAAGGCGATTGAA	358
83	ThrIleIleThrLysAsnLeuHisTyrLysAspGlyPheAspLeuAsnLysGlyIleGlu	102
359	GCGAAGATACACACGCTTTTACCATGGCAATGCACAAATGGATCAGAAGTTCAAAGTTCC	418
103	AlaLysIleHisThrLeuLeuProTrpGlnCysThrAsnGlySerGluValGlnSerSer	122
419	TGGCAGAAACTACTTATTGGATATCACCACAAAGGAATCCAGAACTAAAGTTCAGGAT	478
123	TrpAlaGluThrThrTyrTrpIleSerProGlnGlyIleProGluThrLysValGlnAsp	142
479	ATGGATTGCGTATATTACAATTGGCAATATTACTCTGTCTTGGAACCTGGCATAGGT	538
143	MetAspCysValTyrTyrAsnTrpGlnTyrLeuLeuCysSerTrpLysProGlyIleGly	162
539	GTACTTCTTGATACCAATTACAACCTGTTTACTGGTATGAGGCTTGGATCATGCATTA	598
163	ValLeuLeuAspThrAsnTyrAsnLeuPheTyrTrpTyrGluGlyLeuAspHisAlaLeu	182
599	CAGTGTGTTGATTACATCAAGGCTGATGGACAAATATAGGATGCAGATTTCCCTATTG	658
183	GlnCysValAspTyrIleLysAlaAspGlyGlnAsnIleGlyCysArgPheProTyrLeu	202

FIG.2a

659 GAGGCATCAGACTATAAAGATTTCTATATTTGTGTTAATGGATCATCAGAGAACAAGCCT 718
203 GluAlaSerAspTyrLysAspPheTyrIleCysValAsnGlySerSerGluAsnLysPro 222

719 ATCAGATCCAGTTATTTCACTTTTCAGCTTCAAAATATAGTTAAACCTTTGCCGCCAGTC 778
223 IleArgSerSerTyrPheThrPheGlnLeuGlnAsnIleValLysProLeuProProVal 242

779 TATCTTACTTTTACTCGGAGAGTTTCATGTGAAATTAGCTGAAATGGAGCATACCTTTG 838
243 TyrLeuThrPheThrArgGluSerSerCysGluIleLysLeuLysTyrSerIleProLeu 262

839 GGACCTATTCAGCAAGGTGTTTGTGATTATGAAATTGAGATCAGAGAAGATGATACCTACC 898
263 GlyProIleProAlaArgCysPheAspTyrGluIleGluIleArgGluAspAspThrThr 282

899 TTGGTGACTGCTACAGTTGAAATGAAACATACACCTTGAAACAAACAATGAAACCCGA 958
283 LeuValThrAlaThrValGluAsnGluThrTyrThrLeuLysThrThrAsnGluThrArg 302

959 CAATTATGCTTTGTAGTAAGCAAGTGAATATTTATTGCTCAGATGACGGAATTTGG 1018
303 GlnLeuCysPheValValA: gSerLysValAsnIleTyrCysSerAspAspGlyIleTyr 322

1019 AGTGAGTGGAGTGATAAACAAATGCTGGGAAGGTGAAGACCTATCGAAGAAAACTTTGCTA 1078
323 SerGluTrpSerAspLysGlnCysTrpGluGlyGluAspLeuSerLysLysThrLeuLeu 342

1079 CGTTTCTGGCTACCATTTGGTTTCATCTTAATATATTAGTTATATTTGTAACCGTCTGCTT 1138
343 ArgPheTrpLeuProPheGlyPheIleLeuIleLeuValIlePheValThrGlyLeuLeu 362

1139 TTGCGTAAGCCAAACACCTACCCAAAAATGATTCAGAAATTTTCTGTGATACATGAAGA 1198
363 LeuArgLysProAsnThrTyrProLysMetIleProGluPhePheCysAspThr 381

1199 CTTTCCATATCAAGAGACATGGTATTGACTCAACAGTTTCCAGTCATGCCCAATGTTCA 1258
1259 ATATGAGTCTCAATAAAGTGAATTTTCTTCCGAATGTTG 1298

FIG. 2a (forts.)

7/19

IL13R	MAFVCLAIGCLYTFLLISTTFGCTSSSDTEIKVNPPQDFEIVDPGYLGYLEY 50
IL5R	..MIIVAHVLLILLGATEELQADLLPDEKISLLPPVNFTIKVTG.LAQVL 47
IL13R	LQWQPPLSLDHFKECTVEYELKYRNIGSETWKTIITKNLHYKDGFDLNKG 100
IL5R	LQWKPNPDQEQ.RNVNLEYQVKINAPKEDDYETRITES...KCVTILHKG 93
IL13R	IEAKIHTLLPWQCTNGSEVQSSWAETTYWISPOGIPETKVQDMDQV.... 146
IL5R	FSASVRTILQ...NDHSLASSWASAE.LHAPPGSPGTSIVNLTQTNTT 139
IL13R	..YYNWQ.....YELCSWKPGIGVLLDTNYNLFYWYEGLDHALQVVDYIK 189
IL5R	EDNYSRLRSYQVSLHQTWLVGTDAPEDTQYFLYYRYGSWTE...EQEYSK 187
IL13R	AD.GONIGCRFP..YLEASDYKDFYICVNGSSSENKPIRSSYFTFQLQNIIV 236
IL5R	DTLGRNIAQWFPRTFILSKGRDWLSVLVNGSSKHSAIRPFDQLFALHAID 237
IL13R	KPLPPVYLTFRESSCEIKLKSIPLGPIPARCFDYEIEIREDDTTLVTA 286
IL5R	QINPPLNVTAEEIGT.RLSIQWEKPVSAFFPIHCFDYEVKIHNTNRNGYLQI 286
IL13R	TVENETYTLKTTNETRQLCFVVRSKVNIYCSDDGIWSEWSKQCWEGEDL 336
IL5R	EKLMTNAFISIIDLSKYDVQVRAAVSSMCREAGLWSEWSQ.PIYVGND 335
IL13R	SKKTLLRFWLPFGFILILVIFVTGLLLRKPNTYPKMIP.....EF 376
IL5R	HKPLREWFVIVIMATICFILLILSLICKICHLWIKLFPPIPAPKSNIKDL 385
IL13R	FCDT..... 380
IL5R	FVTTNYEKAGSSETEIEVICYIEKPGVETLEDV 420

FIG. 2b

8/19

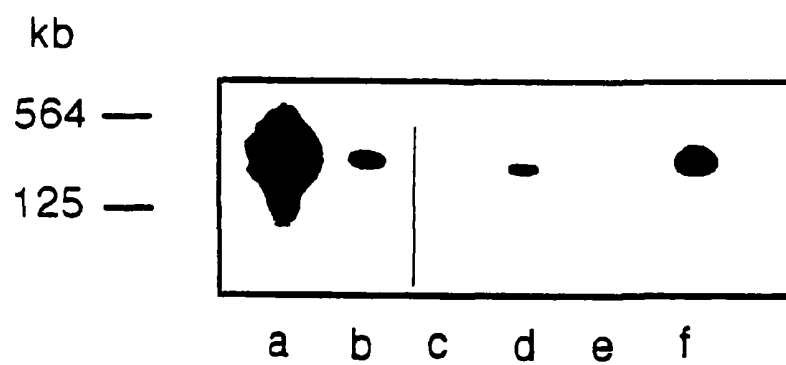


FIG.3

9/19

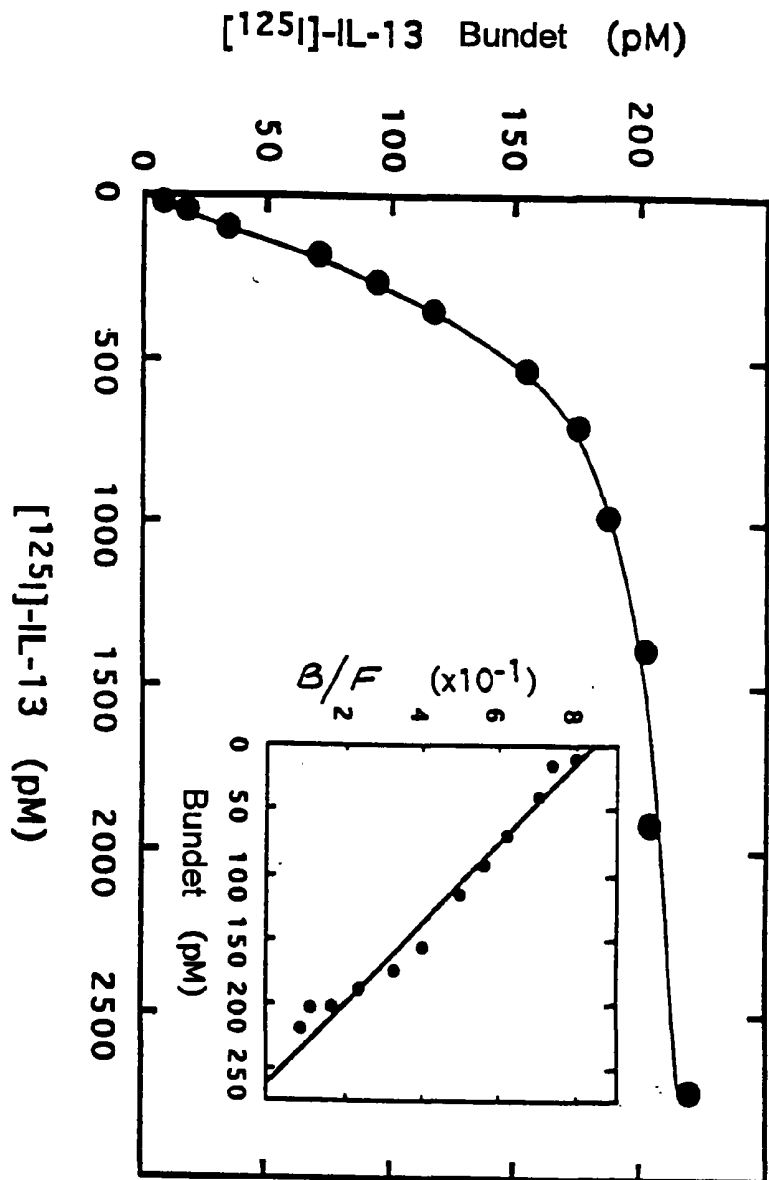


FIG. 4D

10/19

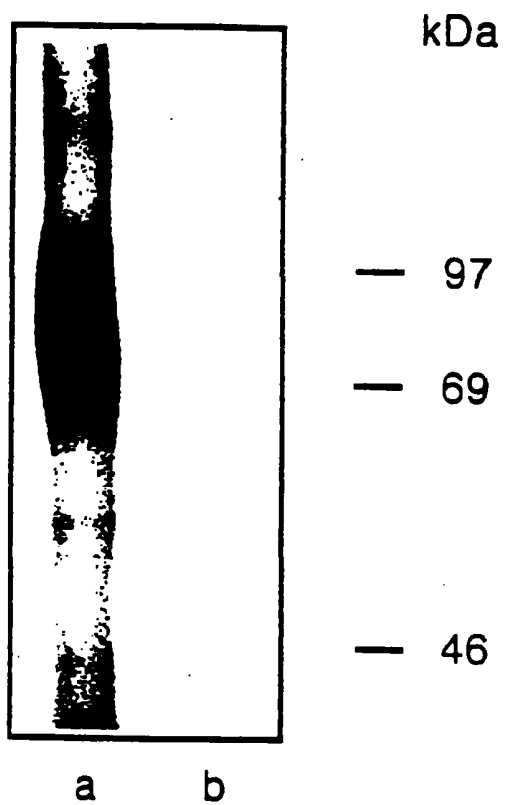


FIG.4b

11/19

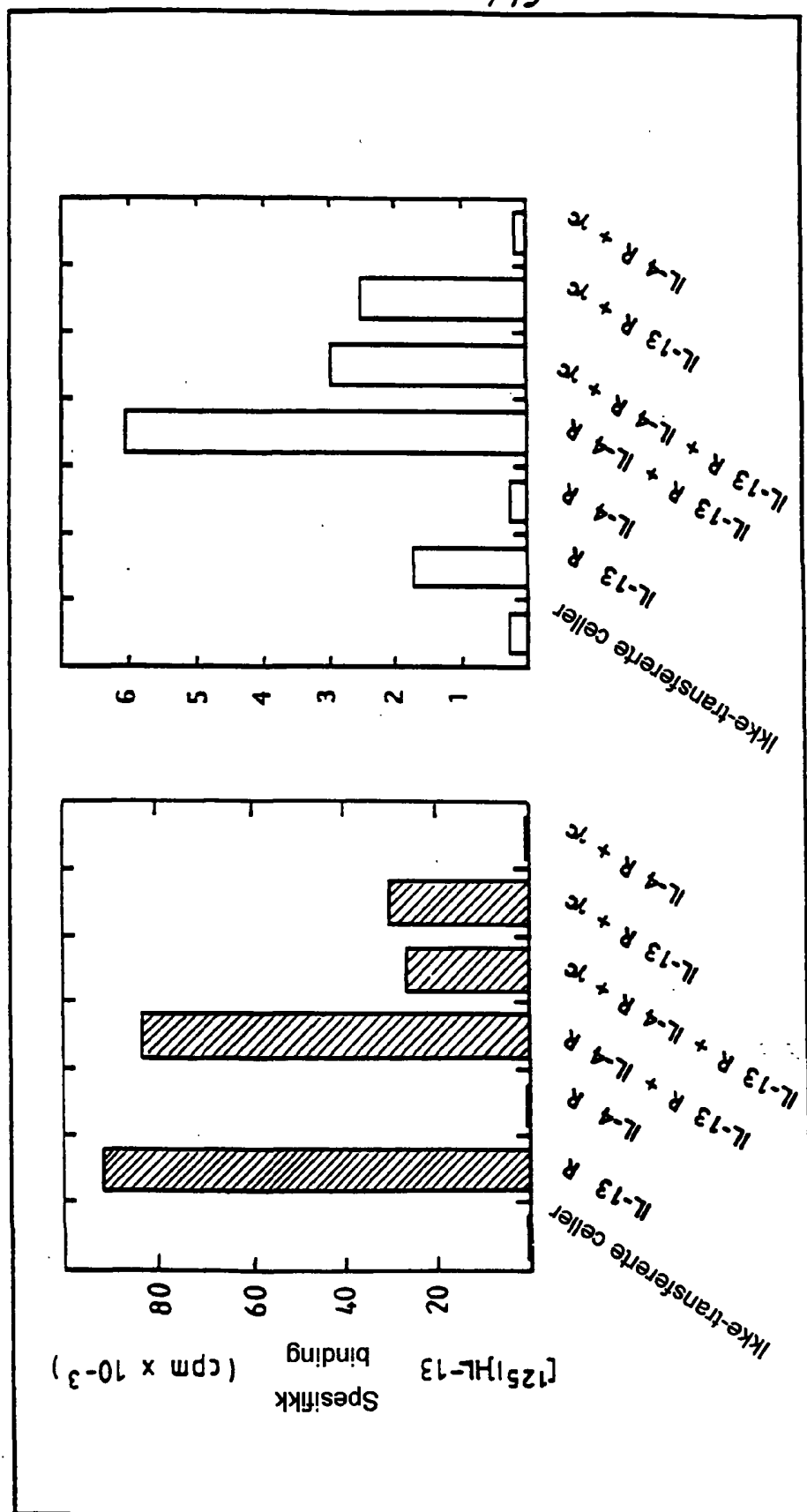


FIG. 4C

12/19

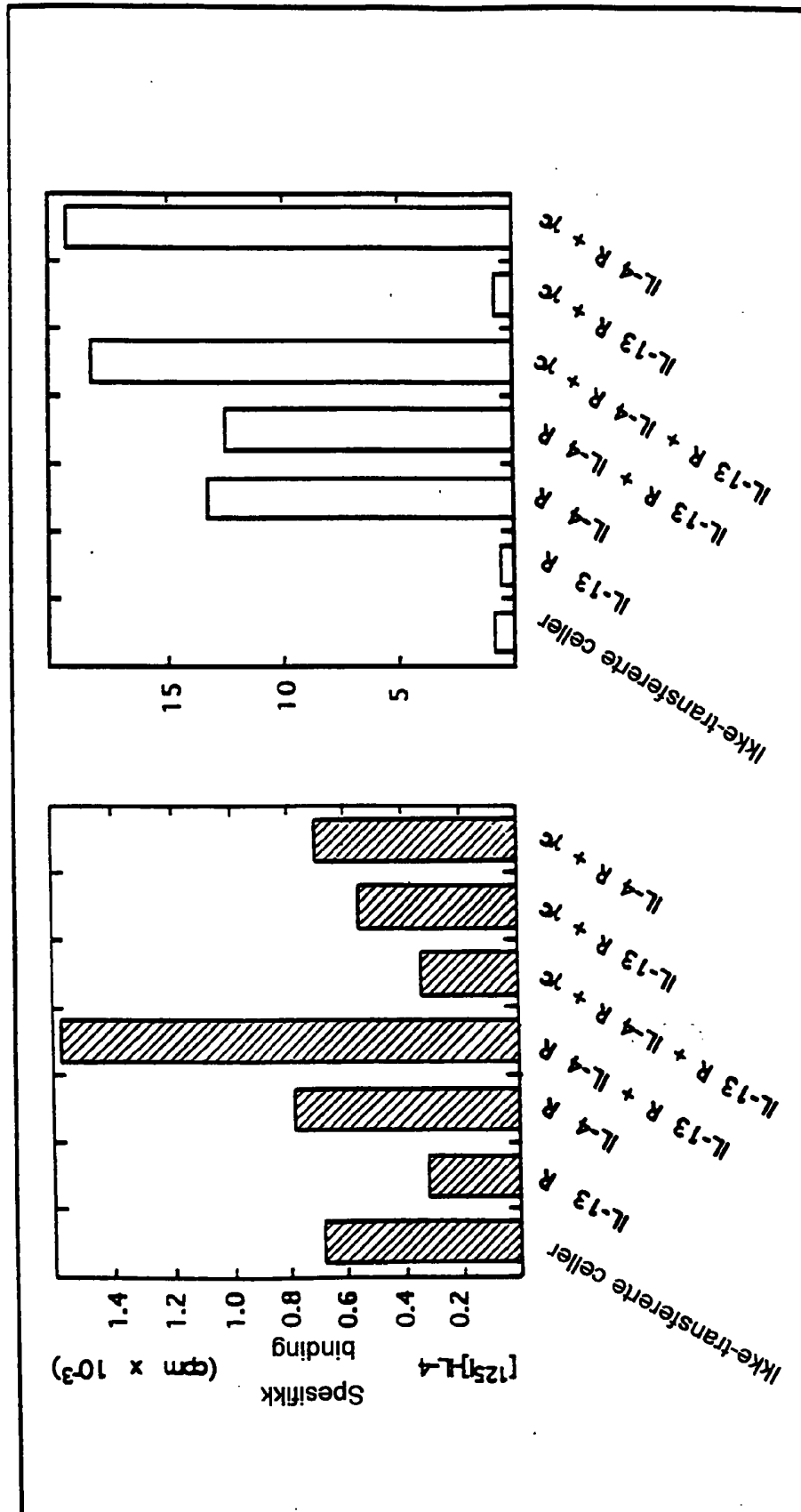


FIG. 4d

13/19

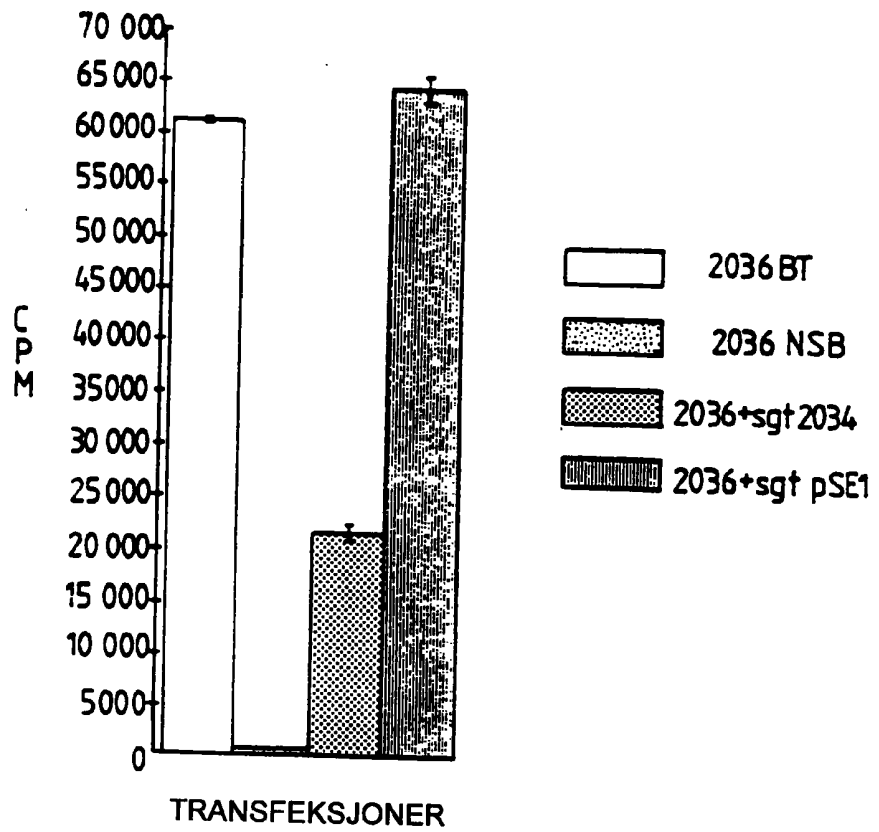
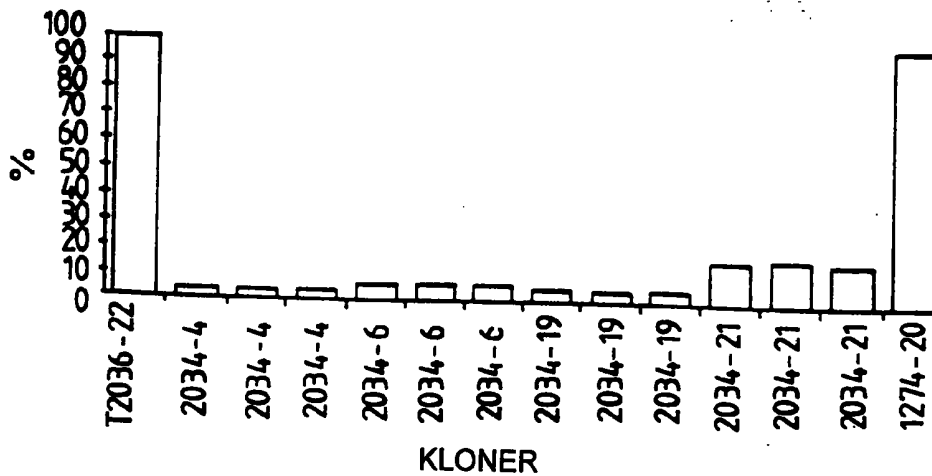


FIG.5

FIG.6



14/19

1	TCAGCCCGGCCGGGCTCCGAGGCGAGAGGCTGCATGGAGTGGCCGGCGCGGCTCTGCGGG	60
-10		
61	CTGTGGGCGCTGCTGCTCTGCGCCGGCGGGGGCGGGGGCGCCGCGCCTACG	120
10	L_W_A_L_L_L_C_A_G_G_G_G_G_G_A_A_P_T	29
121	GAAACTCAGCCACCTGTGACAAATTTGAGTGTCTCTGTTGAAAACCTCTGCACAGTAATA	180
30	E T Q P P V T <u>N L S V</u> S V E N L C T V I	49
181	TGGACATGGAATCCACCCGAGGGAGCCAGCTCAAATTGTAGTCTATGGTATTTTAGTCAT	240
50	W T W N P P E G A S S <u>N C S L</u> W Y F S H	69
241	TTTGGCGACAAACAAGATAAGAAAATAGCTCCGGAAACTCGTCGTTCAATAGAAGTACCC	300
70	F G D K Q D K K I A P E T R R S I E V P	89
301	CtGAATGAGAGGA'TTGTC'TGCAAGTGGGGT'CCAGTGTAGCACCAATGAGAGTGAGAAG	360
90	L N E R I C L Q V G S Q C S T <u>N E S E</u> K	109
361	CCTAGCATT'TTGTTGAAAATGCATCTCACCCCAAGGTGATCCTGAGTCTGCTGTG	420
110	P S I L V E K C I S F P E G D P E S A V	129
421	ACTGAGCTTCAATGCAT'TGGCACAACC'IGAGC'TACATGAAGTGT'TCTTGGCTCCCTGGA	480
130	T E L Q C I W H <u>N L S Y</u> M K C S W L P G	149
481	AGGAATACCAGTCCCGACACTAACTATACTCTCTACTATTGGCACAGAAGCCTGGAAAAA	540
150	R N T S P D T <u>N Y T L</u> Y Y W H R S L E K	169
541	ATTCAATCAATGTGAAAACATCTTTAGAGAAGGCCAATACTTTGGTTGTTCCTTTGATCTG	600
170	I H Q C E N I F R E G Q Y F G C S F D L	189
601	ACCAAAGTGAAGGATTCCAGTTTtGAACAACACAGTGTCCAAATAATGGTCAAGGATAAT	660
190	T K V K D S S F E Q H S V Q I M V K D N	209
661	GCAGGAAAAATTAAACCATCCTTCAATATAGTGCCTTTAACTTCCCGTGAAACCTGAT	720
210	A G K I K P S F N I V P L T S R V K P D	229
721	CCTCCACATATTA AAAACCTCTCCTTCCACAATGATGACCTATATGTGCAATGGGAGAAT	780
230	P P H I K <u>N L S F</u> H N D D L Y V Q W E N	249
781	CCACAGAATTTTATTAGCAGATGCCTATTTTATGAAGTAGAAGTCAATAACAGCCAAACT	840
250	P Q N F I S R C L F Y E V E V <u>N N S Q</u> T	269
841	GAGACACATAATGTTTTCTACGTCCAAGAGGCTAAATGTGAGAATCCAGAATTTGAGAGA	900
270	E T H N V F Y V Q E A K C E N P E F E R	289
901	AATGTGGAGAATACATCTTGTTCATGGTCCCTGGTGTCTTCTGATACTTTGAACACA	960
290	N V E <u>N T S C</u> F M V P G V L P D T L N T	309
961	GTCAGAATAAGAGTCAAAACAAATAAGTTATGCTATGAGGATGACAAACTCTGGAGTAAT	1020
310	V R I R V K T N K L C Y E D D K L W S <u>N</u>	329
1021	TGGAGCCAAGAAATGAGTATAGGTAAGAAGCGCAATTCACACTCTACATAACCATGTTA	1080
330	<u>W S Q</u> E M S I G K K R <u>N S T L</u> Y I T M L	349
1081	CTCATTGTTCCAGTCATCGTCGAGGTGCAATCATAGTACTCCTGCTTTACCTAAAAAGG	1140
350	<u>L I V P V I V A G A I I V L L L Y L K R</u>	369
1141	<u>CTCAAGATTATTATATTCCTCCAATTCCTGATCCTGGCAAGATTTTAAAGAAATGTTT</u>	1200
370	L K I I I F P P I P D P G K I F K E M F	389
1201	GGAGACCAGAATGATGATACTCTGCACTGGAAGAAGTACGACATCTATGAGAAGCAAACC	1260
390	G D Q N D D T L H W K K Y D I Y E K Q T	409
1261	AAGGAGGAAACCGACTCTGTAGTGCTGATAGAAAACCTGAAGAAAGCCTCTCAGTGATGG	1320
410	K E E T D S V V L I E N L K K A S Q *	429

FIG.7a

15/19

1381	TATCTGGGAAC TTATTAATGGAACTGAACTACTGCACCATT TAAAAACAGGCAGCTC	1440
1441	ATAAGAGCCACAGGTC TTTATGTTGAGTCGCGCACCGAAAACTAAAAATAATGGGCGCT	1500
1501	TTGGAGAAGAGTGTGGAGTCATTCTCATTGAATTATAAAAGCCAGCAGGCTTCAAAC TAG	1560
1561	GGGACAAAGCAAAAAGTGATGATAGTGGTGGAGTTAATCTTATCAAGAGTTGTGACAACT	1620
1621	TCCTGAGGGATCTATAC TTGCTTTGTGTTCTTTGTGTCAACATGAACAAATTTTATTTGT	1680
1681	AGGGGAAC TCATTTGGGGTGCAAAATGCTAATGTCAAAC TTGAGTCACAAAGAACATGTAG	1740
1741	AAAACAAATGGATAAAATCTGATATGTATTGTTTGGGATCCTATTGAACCATGTTTGTG	1800
1801	GCTATTTAAAC TC TTTTAACAGTCTGGGCTGGGTCCGGTGGCTCACGCCTGTAATCCAG	1860
1861	CAATTTGGGAGTCCGAGGCGGGCGGATCACTCGAGGT CAGGAGTTCCAGACCAGCCTGAC	1920
1921	CAAAATGGTGAAACCTCCTCTCTACTAAAACTACAAAAATTAAC TGGGTGTGGTGGCGCG	1980
1981	TGCCGTGTAATCCCAGCTACTCGGGAAGCTGAGGCAGGTGAATTGTTTGAACCTGGGAGGT	2040
2041	GGAGGTTGCAGTGAGCAGAGATCACACCCTGC ACTCTAGCCTGGGTGACAGAGCAAGAC	2100
2101	TCTGTC TAAAAAACAAAACAAAACAAAACAAAACAAAAAACCTCTTAATATTCTGGAGT	2160
2161	CATCATTTCCCTTTTCGACAGCATTTTCTCTCTGCTTTTGAAGCCCCAGAAAATCAGTGT TGGCC	2220
2221	ATGATGACAACTACAGAAAAACCAGAGGCAGCTTCTTTGCCAAGACCTTTCAAAGCCATT	2280
2281	TTAGGCTGTTAGGGGCAGTGGAGGTAgAATGACTCCTTGGGTATTAGAGTTTCAACCATG	2340
2341	AAGTCTCTAACAAATGTaTTTCTTTCACCTCTGCTACTCAAGTAGCATTTACTGTGTCTTT	2400
2401	GGTTTGTGCTAGGCCCCCGGGTGTGAAGCACAGACCCCTTCCAGGGGTTTACAGTCTATe	2460
2461	TGAGACTCCTCAGTTCTTGCCACTTTTTTTTTTAAATCTCCACCAGTCATTTTTCAGACCT	2520
2521	TTTAACTCCTCAATTCCAACACTGATTTCCCTTTTGCATTCTCCCTCCTTCCCTTCCTT	2580
2581	GTAGCCTTTTGACTTTTCATTGGAATTAGGATGTAAATCTGCTCAGGAGACCTGGAGGAG	2640
2641	CAGAGGATAATTAGCATCTCAGGTTAAGTGTGAGTAATCTGAGAAACAATGACTAATTCT	2700
2701	TGCATATTTTGTAACTTCCATGTGAGGGT TTTT CAGCATTGATATTTGTGCATTTTCTAAA	2760
2761	CAGAGATGAGGTGGTATCTT CAGTAGAACATTGGTATTGCTTGAGAAAAAAGAATAG	2820
2821	TTGAACCTATTTCTCTTTCTTTACAAGATGGGTCCAGGATTCCTCTTTTCTCTGCCATAA	2880
2881	ATGATTAATTAAATAGCTTTTGTGTCTTACATTGGTAGCCAGCCAGCCAAGGCTCTGTTT	2940
2941	ATGCTTTTGGGGGGCATATATTGGGTTCATTCTCACCTATCCACACAACATATCCGTAT	3000
3001	ATATCCCCCTACTCTTACTTCCCCCAAATTTAAAGAAGTATGGGAAATGAGAGGCATTT	3060
3061	CCCCCACCCTATTTCTCTCTCACACACAGACTATATTACTGGTAGGAACTTGAGAACT	3120
3121	TTATTTCCAAGTTGTTCAAACATTTACCAATCATATTAATACAATGATGCTATTTGCAAT	3180
3181	TCCTGCTCCTAGGGGAGGGGAGATAAGAAACCCTCACTCTCTACAGGTTTGGGTACAAGT	3240
3241	GGCAACCTGCTTCCATGGCCGTGTAGAAGCATGGTGCCCTGGCTTCTCTGAGGAAGCTGG	3300
3301	GGTTCATGACAATGGCAGATGTAAAGTTATTCTTGAAGTCAGATTGAGGCTGGGAGACAG	3360
3361	CCGTAGTAGATGTTCTACTTTGTCTGCTGTTCTCTAGAAAGAATATTTGGTTTTCTGT	3420
3421	ATAGGAATGAGATTAATTCCTTTCCAGGTATTTTATAATTCTGGGAAGCAAACCCATGC	3480
3481	CTCCCCCTAGCCATTTTACTGTTATCCTATTTAGATGGCCATGAAGAGGATGCTGTGAA	3540
3541	ATTCCCAACAAACATTGATGCTGACAGTCATGCAGTCTGGGAGTGGGGAAGTGATCTTTT	3600
3601	GTTCCCATCCTCTTCTTTTAGCAGTAAAATAGCTGAGGGAAAAGGGAGGGAAAAGGAAGT	3660
3661	TATGGGAATACCTGTGGTGGTTGTGATCCCTAGGTCTTGGGAGCTCTTGGAGGTGTCTGT	3720
3721	ATCAGTGGATTTCCCATCCCCGTGGGAAATTAGTAGGCTCATTTACTGTTTTAGGTCTA	3780
3781	GCCTATGTGGATTTTTTCCTAACATACCTAAGCAAACCCAGTGT CAGGATGGTAATTCTT	3840
3841	ATTCTTTTCGTT CAGTTAAGTTTTTCCCTTCATCTGGGCACTGAAGGGATATGTGAAACAA	3900
3901	TGTTAACATTTTTTGGTAGTCTTCAACCAGGGATGTTTTCTGTTTAACTTCTTATAGGAAA	3960
3961	GCTTGAGTAAAATAAATATTGTCTTTTTTGTATGTCACCCaaaaaaaaa 4009	

FIG. 7a (forts.)

1L-13 α MUS

FIG. 7b

17/19

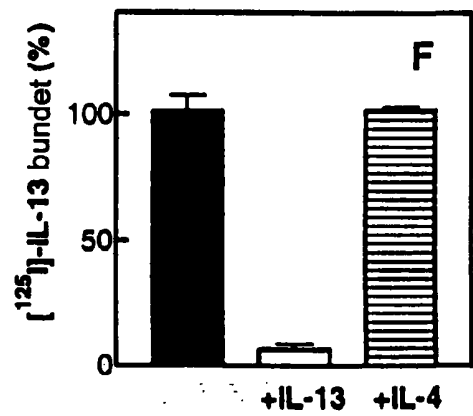
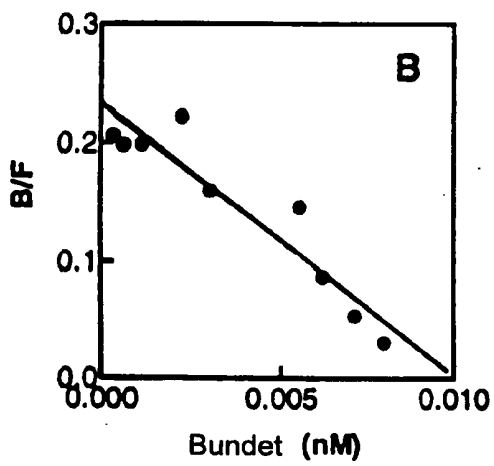
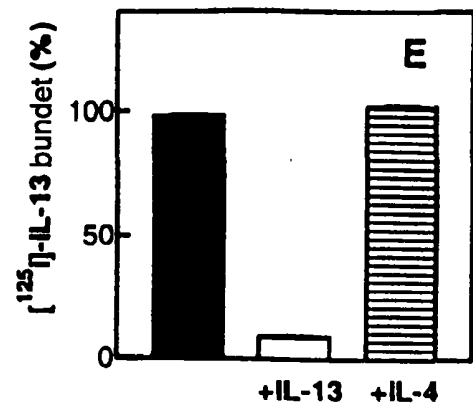
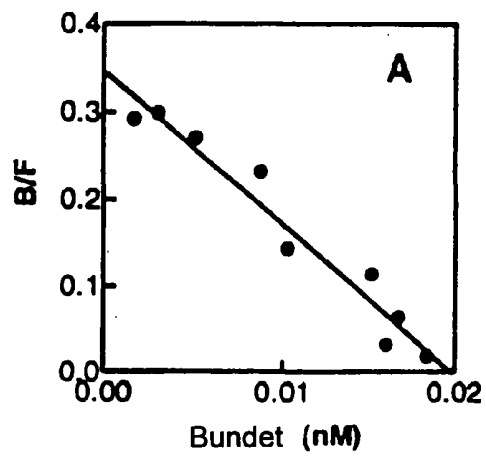


FIG. 8

18/19

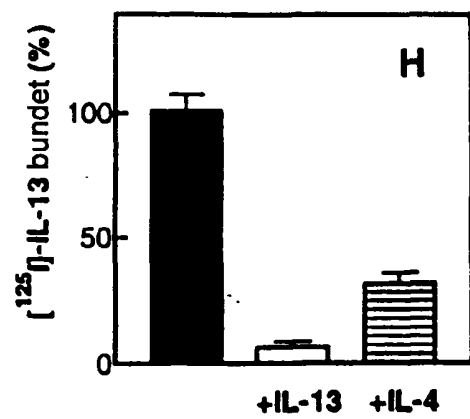
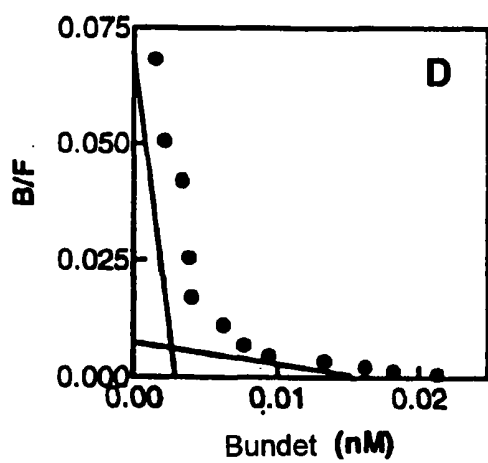
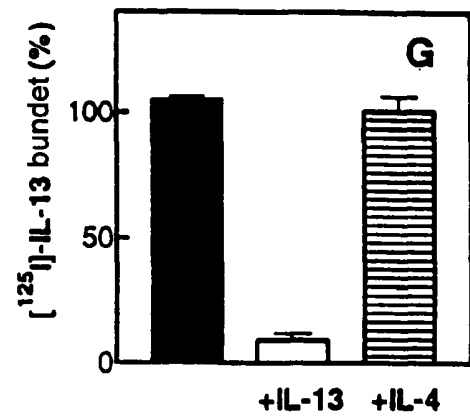
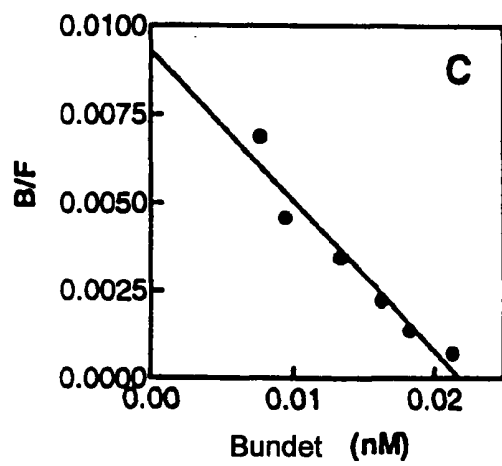


FIG. 8 (forts.)

19/19

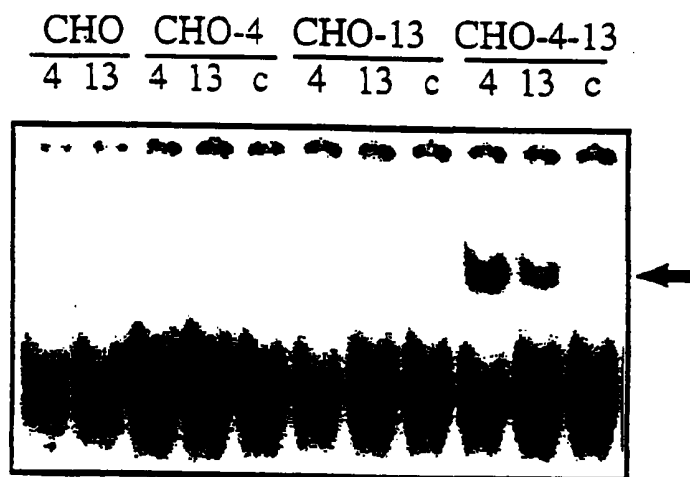


FIG.9