



(12) **PATENT**

(19) **NO**

(11) **330775**

(13) **B1**

NORGE

(51) **Int Cl.**

C12N 15/12 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 38/22 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

A61P 11/06 (2006.01)

A61P 13/12 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

m flere

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20016036	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2000.05.23 PCT/US2000/014142
(22)	Inng.dag	2001.12.10	(85)	Videreføringsdag	2001.12.10
(24)	Løpedag	2000.05.23	(30)	Prioritet	1999.06.08, US, 138133
(41)	Alm.tilgj	2002.02.08			
(45)	Meddelt	2011.07.11			
(73)	Innehaver	Regeneron Pharmaceuticals Inc, 777 Old Saw Mill River Road, US-NY10591 TARRYTOWN, USA Samuel Davis, New York, NY, US-, USA George D Yancopoulos, 1519 Baptist Church Road, US-NY10598 YORKTOWN HEIGHTS, USA Nicholas J Papadopoulos, Butler, NJ, US-, USA			
(72)	Oppfinner				
(74)	Fullmektig	Oslo Patentkontor AS, Postboks 7007 Majorstua, 0306 OSLO, Norge			

(54)	Benevnelse	Isolert nukleinsyremolekyl som koder for vaskulær endotelial vekstfaktor med immunoglobulin-domener, fusjonspolypeptid kodet av dette, fremgangsmåte for fremstilling derav samt anvendelse derav			
(56)	Anførte publikasjoner	DAVIS-SMYTH T. et al., "The second immunoglobulin-like domain...", The EMBO Journal, 1996, vol. 15, s.4919-4927, ISSN 0261-4189, WO 9744453 A1			
(57)	Sammendrag				

Modifiserte kimære polypeptider med forbedrede farmakokinetiske egenskaper beskrives. Nærmere bestemt beskrives modifiserte kimære Flt1-reseptor-polypeptider som er blitt modifisert på en måte som forbedrer deres farmakokinetiske profil. Også beskrevet er fremgangsmåter ved fremstilling og anvendelse av de modifiserte polypeptider, omfattende, men ikke begrenset til, anvendelse av de modifiserte polypeptider til å nedsette eller inhibere plasmalekkasje og/eller den vaskulære permeabilitet i et pattedyr.

Området for foreliggende oppfinnelse er et isolert nuklinsyremolekyl som angitt i krav 1 og som koder for modifiserte polypeptider med forbedrede farmakokinetiske egenskaper. Slike polypeptider er Flt1-reseptor-polypeptider som er blitt modifisert på en måte som forbedrer deres farmakokinetiske profil. Området for foreliggende oppfinnelse vedrører også fremgangsmåter ved fremstilling og anvendelse av slike polypeptider som angitt i henholdsvis krav 14 og 17 for å nedsette eller inhibere plasmalekkasje og/eller den vaskulære permeabilitet i et pattedyr.

BAKGRUNN

Evnen av polypeptidligander til å bindes til celler og dermed utløse en fenotypisk respons så som cellevekst, overlevelse, celleproduktutsondring eller differensiering, medieres ofte av transmembrane reseptorer på cellene. Den ekstracellulære domene av slike reseptorer (dvs. det parti av reseptoren som vises frem på overflaten av cellen) er generelt det mest karakteristiske parti av molekylet, idet det tilfører proteinet dets ligandbindingskarakteristikk. Bindingen av en ligand til den ekstracellulære domene fører generelt til en signaltransduksjon som overfører et biologisk signal til intracellulære mål. Ofte virker denne signaltransduksjon via en katalytisk intracellulær domene. Den bestemte anordning av sekvensmotiver av denne katalytiske intracellulære domene bestemmer dens tilgang til potensielle kinasesubstrater (Mohammadi *et al.*, 1990, *Mol. Cell. Biol.* 11: 5068-5078; Fantl *et al.*, 1992, *Cell* 69: 413-413). Eksempler på reseptorer som transduserer signaler via katalytiske intracellulære domener, omfatter reseptor-tyrosinkinaser (RTK'er) så som Trk-reseptorfamilien, som generelt er begrenset til celler i nervesystemet, cytokin-reseptorfamilien omfattende tripartat-CNTF-reseptorkompleks (Stahl & Yancopoulos, 1994, *J. Neurobio.* 25: 1454-1466), som også er generelt begrenset til cellene i nervesystemet, G-protein-koblede reseptorer så som β_2 -adrenergisk reseptor som f.eks. foreligger på hjertemuskelceller, og den flerverdige IgE-høyaffinitetsreseptor Fc ϵ RI som hovedsakelig finnes på mastceller og basofiler (Sutton & Gould, 1993, *Nature* 366: 421-428).

Alle reseptorer som hittil er blitt identifisert, virker å gjennomgå en dimerisering, multimerisering eller en beslektet konformasjonell endring etter ligandbinding (Schlessinger, J., 1998, *Trend Biochem. Sci.* 13: 443-447; Ullrich & Schlessinger, 1990, *Cell* 61: 203-212; Schlessinger & Ullrich, 1992, *Neuron* 9: 383-391), og molekylære vekselvirkninger mellom dimeriserende intracellulære domener fører til en aktivering av den katalytiske funksjon. I noen tilfeller, så som blodplate-avledet vekstfaktor (PDGF), er liganden en dimer som binder to reseptormolekyler (Hart et

al., 1998, *Science*, **240**: 1529-1531; Heldin, 1989, *J. Biol. Chem.* **264**: 8905-8912), mens liganden f.eks. i tilfellet av epidermal vekstfaktor (EGF) er en monomer (Weber *et al.*, 1984, *J. Biol. Chem.* **259**: 14631-14636). I tilfellet av Fc ϵ RI-reseptor, foreligger liganden, IgE, bundet til Fc ϵ RI på monomer måte, og aktiveres først når
 5 antigen bindes til IgE/Fc ϵ RI-komplekset og fornetter hosliggende IgE-molekyler (Sutton & Gould, 1993, *Nature* **366**: 421-428).

Ofte gir vevfordelingen av en bestemt reseptor i høyere organismer en forståelse for den biologiske funksjon av reseptoren. RTK'ene for noen vekst- og differensieringsfaktorer, så som fibroblast-vekstfaktor (FGF), uttrykkes bredt og virker derfor
 10 å spille en generell rolle i vevets vekst og vedlikehold. Medlemmer av Trk-RTK-familien (Glass & Yancopoulos, 1993, *Trends in Cell Biol.* **3**: 262-268) av reseptorer er mer generelt begrenset til celler i nervesystemet, og nervevekstfaktor-familien bestående av nervevekstfaktor (NGF), hjerne-avledet neurotrofisk faktor (BDNF), neurotrofin-3 (NT-3) og neurotrofin-4/5 (NT-4/5), som binder reseptorer av Trk-
 15 RTK-familie, fremmer differensieringen av forskjellige grupper av neuroner i hjernen og periferien (Lindsay, R.M., 1993, i *Neurotrophic Factors*, S.E. Loughlin & J.H. Fallon, utg., s. 257-284, San Diego, CA, Academic Press). Fc ϵ RI er begrenset til et meget lite antall celletyper, så som mastceller og basofiler. Mastceller stammer fra benmarg-flerpotent hematopoietisk stamcellelinjen, men fullfører sin modning i
 20 vevet etter en migrasjon fra blodstrømmen (se Janeway & Travers, 1996, i *Immunobiology*, 2. utg., M. Robertson & E. Lawrence, utg., s. 1:3-1:4, Current Biology Ltd., London, UK, forlag) og er omfattet i allergiske responser.

Mange undersøkelser har vist at den ekstracellulære domene av en reseptor tilveiebringer den spesifikke ligandbindingskarakteristikk. Videre kan det cellulære miljø
 25 hvor en reseptor uttrykkes, påvirke den biologiske respons som oppvises etter binding av en ligand til reseptoren. F.eks. når en neuronal celle som uttrykker en Trk-reseptor, utsettes for et neurotrofin som bindes til denne reseptor, fører dette til en neuronal overlevelse og differensiering. Når den samme reseptor uttrykkes av en fibroblast, fører en utsettelse for neurotrofinet til en proliferasjon av fibroblasten
 30 (Glass *et al.*, 1991, *Cell* **66**: 405-413).

En klasse celleavlede dimere mitogener med selektivitet for vaskulære endotelceller er blitt identifisert og benevnt endotelcellevekstfaktor (VEGF). VEGF er blitt isolert fra kondisjonert vekstmedium av rotte-gliomaceller [Conn *et al.*, (1990), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**, s. 2628-2632]; og kondisjonert vekstmedium fra
 35 bovine hypofysefollikkel-stellatceller [Ferrara og Henzel, (1989), *Biochem. Biophys.*

Res. Comm., 161, s. 851-858; Gozpadarowicz *et al.*, (1989), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 86, s. 7311-7315] og kondisjonert vekstmedium fra humane U937-celler [Conolly, D.T. *et al.* (1989), Science, 246, s. 1309-1312]. VEGF er en dimer med en tilsynelatende molekyllmasse på ca. 46 kDa, hvor hver delenhets har en tilsynelatende molekyllmasse på ca. 23 kDa. VEGF har noen strukturelle likheter med blodplate-
 5 avledet vekstfaktor (PDGF), som er et mitogen for bindevevceller, men som ikke er mitogent for vaskulære endotelceller fra store kar.

Den membranbundne tyrosinkinasereseptor, kjent som Flt, ble demonstrert å være en VEGF-reseptor [DeVries, C. *et al.*, (1992), Science, 255, s. 989-991]. Flt-
 10 reseptor binder spesifikt VEGF, hvilket induserer mitogenese. En annen form for VEGF-reseptor, benevnt KDR, er også kjent for å binde VEGF og indusere mitogenese. Den delvise cDNA-sekvens og nærmest hellengdes proteinsekvens av KDR er også kjent [Terman, B.I. *et al.*, (1991), Oncogene 6, s. 1677-1683; Terman, B.I. *et al.*, (1992), Biochem. Biophys. Res. Comm. 187, s. 1579-1586].

15 En vedvarende angiogenese kan forårsake eller forverre visse sykdommer så som psoriasis, reumatoid artritt, hemangiomaer, angiofibromaer, diabetisk retinopati og neovaskulær glaukoma. En inhibitor av VEGF-aktiviteten vill være nyttig for behandling av slike sykdommer og annen VEGF-indusert patologisk angiogenese og vaskulære permeabilitetstilstander, så som svulstvaskularisering. Foreliggende opp-
 20 finnelse vedrører en VEGF-antagonist ifølge krav 15 som baserer seg på VEGF-reseptor Flt1.

Plasmalekkasje, en hovedkomponent under betennelse, finner sted i en bestemt undergruppe av mikrokår. Spesielt finner i de fleste organer, plasmalekkasje sted i venulene. Til forskjell fra arterioler og kapillærer, begynner venuler å lekke som
 25 respons på forskjellige inflammatoriske mediatorer omfattende histamin, bradykinin og serotonin. Ett kjennetegn av betennelse er plasmalekkasjen som resulterer av intercellulære hulrom som dannes i endotel av venuler. De fleste eksperimentelle modeller for betennelse tyder på at disse intercellulære hulrom forekommer mellom endotelcellene av postkapillære og oppsamlende venuler (Baluk, P. *et al.*, Am. J. Pathol. 1998, 152: 1463-1476). Det er blitt vist at visse lektiner kan brukes for å
 30 vise fokale seter for plasmalekkasje, endotele hulrom og fingerlignende utstikkere i endotelcellegrenser i betente venuler (Thurston, G. *et al.*, Am. J. Physiol., 1996, 271: H2547-2562). Spesielt er plantelektiner blitt brukt for å visualisere morfologiske endringer i endotelcellegrenser i betente venuler av f.eks. rotte-trachea. Lek-
 35 tiner så som konkonavalin A og ricin, som bindes fokalt til betente venuler, viser

områder av subendotelkarveggen som har hulrom som tilsvarer steder for plasma-lekkasje (Thurston, G. *et al.*, Am. J. Physiol. 1996, 271: H2547-2562).

Egenskapene av mikrokarene er dynamiske. Kroniske betennelsessykdommer forbindes f.eks. med mikrovaskulær ommodellering, omfattende angiogenese og
5 mikrokarforstørrelse. Mikrokar kan også gjenmodelleres ved å anta abnormale fenotypiske egenskaper. I en murin modell for kronisk luftveisbetennelse antar luftveis-kapillærer egenskapene av venuler, også en forstørret kardiameter, en hevet immunoreaktivitet for von Willebrand-faktor og økt immunoreaktivitet for P-selektin. I tillegg lekker disse ommodellerte kar som respons på inflammatoriske
10 mediatorer, mens kar i den samme posisjon i luftveiene av normale mus ikke gjør dette.

Visse substanser har vist seg å nedsette eller inhibere den vaskulære permeabilitet og/eller plasmalekkasje. F.eks. er mystixiner syntetiske polypeptider som er blitt beskrevet å inhibere plasmalekkasje uten å blokkere dannelsen av endotelhulrom
15 (Baluk, P. *et al.*, J. Pharmacol. Exp. Ther., 1998, 284: 693-699). Dessuten nedsetter den beta-2-adrenergiske reseptoragonist formoterol den mikrovaskulære lekkasje ved å inhibere dannelsen av endotelhulrom (Baluk, P. og MacDonald, D.M., Am. J. Physiol., 1994, 266: L461-468).

Angiopoietiner og medlemmer av vaskulær endotel-vekstfaktor (VEGF)-familien er
20 de eneste vekstfaktorer som antas å være overveiende spesifikke for vaskulære endotelceller. Målrettede gen-inaktiveringsundersøkelser i mus har vist at VEGF er nødvendig for de tidlige faser av den vaskulære utvikling, og at Ang-1 er nødvendig for senere trinn av den vaskulære ommodellering.

US-patent nr. 6.011.003, utstedet den 4. januar 2000 til Metris Therapeutics Limited, beskriver en endret, løselig form for FLT-polypeptid som har evnen til å bindes
25 til VEGF og som derfor utøver en inhibitorisk virkning på den, hvor polypeptidet omfatter fem eller færre fullstendige immunoglobulindomener.

US-patent nr. 5.712.380, utstedet den 27. januar 1998 og overdratt til Merck & Co., beskriver vaskulære endotelcelle-vekstfaktor (VEGF)-inhibitorer som er naturlig forekommende eller rekombinant konstruerte løselige former med eller uten et
30 C-terminalt transmembrant område av reseptoren for VEGF.

Også overdratt til Merck & Co. er PCT-publikasjon nr. WO 98/13071, publisert den 2. april 1998, som beskriver genterapimetoder for inhibering av primær svulstvekst og metastase ved genoverføring av en nukleotidsekvens som koder for et løselig reseptorprotein som bindes til VEGF.

- 5 PCT-publikasjon nr. WO 97/44453, publisert den 27. november 1998 i navnet til Genentech, Inc., beskriver nye kimære VEGF-reseptorproteiner som omfatter aminosyresekvenser avledet fra vaskulær endotel-vektfaktor (VEGF)-reseptorene Flt1 og KDR, medregnet den murine homolog for human KDR-reseptor FLK1, hvor de kimære VEGF-reseptorproteiner bindes til VEGF og antagoniserer den proliferative og angiogene aktivitet derav på endotelceller.

- 10 PCT-publikasjon nr. WO 97/13787, publisert den 17. april 1997 i navnet til Toa Gosei Co., Ltd., beskriver en VEGF-inhibitor med lav molekylvekt som kan brukes ved behandling av sykdommer som ledsages av neovaskularisering, så som faste svulster. Et polypeptid som inneholder den første immunoglobulin-lignende domene og den andre immunoglobulin-lignende domene i den ekstracellulære region av en VEGF-reseptor FLT, men som ikke inneholder den sjette immunoglobulin-lignende domene og den syvende immunoglobulin-lignende domene derav, viser en VEGF-inhibitorisk aktivitet.

- 20 Sharifi, J. et al., 1998, The Quarterly Jour. of Nucl. Med. 42: 242-249, beskriver at fordi monoklonale antistoffer (mAb'er) er basiske, positivt ladede proteiner, og patedyrceller er negativt ladet, kan de elektrostatiske vekselvirkninger mellom disse to føre til høyere nivåer av bakgrunnsbinding, som fører til lave forhold mellom svulster og normale organer. For å overvinne denne virkning, forsøkte forskerne å forbedre Mab-utskillingen ved bruk av forskjellige metoder så som sekundære midler, samt kjemiske og ladningsmessige modifikasjoner av selve mAb'et.

- Jensen-Pippo et al., 1996, Pharmaceutical Research 13: 102-107, beskriver at en pegylering av et terapeutisk protein, rekombinant humant granulocyt-kolonistimulernede faktor (PEG-G-CSF), fører til en hevet stabilitet og retensjon av *in vivo*-bioaktiviteten når det administreres ved intraduodenal rute.

- 30 Tsutsumi et al., 1997, Thromb Haemost. 77: 168-173, beskriver eksperimenter hvor den trombopoietiske aktivitet *in vivo* av polyetylenglykol-modifisert interleukin-6 (MPEG-IL-6), hvor 54% av de 14 lysin-aminogrupeer av IL-6 var koblet til PEG, ble sammenlignet med daktiviteten av nativt IL-6.

Yang *et al.*, 1995, Cancer 76: 687-694, beskriver at konjugering av polyetylenglykol til rekombinant humant interleukin-2 (IL-2) fører til en forbindelse, polyetylen-glykol-modifisert IL-2 (PEG-IL-2) som beholder *in vitro*- og *in vivo*-aktiviteten av IL-2, men som oppviser en merkbart forlenget sirkulasjonshalveringstid.

- 5 R. Duncan og F. Spreafico, Clin. Pharmacokinet. 27: 290-306, 296 (1994) beskriver forsøk på å forlenge plasma-halveringstiden av asparaginase ved å konjugere det med polyetylenglykol.

- 10 Den internasjonale PCT-publikasjon WO 99/03996, publisert den 28. januar 1999 i navnet til Regeneron Pharmaceuticals, Inc. og The Regents Of The University of California, beskriver modifiserte humane noggin-polypeptider som har delesjoner av områder med basiske aminosyrer. De modifiserte humane noggin-polypeptider beskrives å beholde sin biologiske aktivitet, mens de har en nedsatt affinitet for heparin og overlegne farmakokinetiske egenskaper i dyreserum sammenlignet med umodifisert humant noggin.

- 15 I WO 97/44453 A1 er det beskrevet kimære VEGF-reseptorer der et eller flere av de Ig-liknende domenene fra et Flt1-IgG-konstrukt er byttet ut med det eller de tilsvarende domene fra enten KDR eller Flt4-reseptorene og anvendelsen av disse kimærene i farmasøytiske preparater til behandling av tilstander hvor vaskularisering og angiogenese er ønskelig.

20 SAMMENFATNING AV OPPFINNELSEN

- Foreliggende oppfinnelse vedrører VEGF-antagonister med forbedrede farmakokinetiske egenskaper. En foretrukken utførelse er et isolert nukleinsyremolekyl som koder for et fusjonspolypeptid som har evnen til å binde et VEGF-polypeptid, omfattende (a) en nukleotidsekvens som koder for en VEGF-reseptorkomponent som angitt i krav 1 og som er operabelt bundet til (b) en nukleotidsekvens som koder for en multimeriserende komponent, hvor VEGF-reseptorkomponenten er den eneste VEGF-reseptorkomponent av fusjonspolypeptidet, og hvor nukleotidsekvensen av (a) i det vesentlige består av en nukleotidsekvens som koder for aminosyresekvensen av Ig-domene 2 av det ekstracellulære domene av en første VEGF-reseptor, og
- 25 en nukleotidsekvens som koder for aminosyresekvensen av Ig-domene 3 av det ekstracellulære domene av en andre VEGF-reseptor, hvor første VEGF-reseptor er Flt1 og andre VEGF-reseptor er Flk1 eller Flt4, og VEGF-reseptorkomponenter er den eneste VEGF-reseptorkomponent i fusjonspolypeptidet.
- 30

I en annen foretrukken utførelse er nukleotidsekvensen som koder for Ig-domene 2 av det ekstracellulære domene av den første VEGF-reseptor, oppstrøms for nukleotidsekvensen som koder for Ig-domene 3 av det ekstracellulære domene av den andre VEGF-reseptor.

- 5 I enda en annen utførelse er nukleotidsekvensen som koder for Ig-domene 2 av det ekstracellulære domene av den første VEGF-reseptor, nedstrøms for nukleotidsekvensen som koder for Ig-domenet 3 av det ekstracellulære domene av den andre VEGF-reseptor.

- 10 I en foretrukken utførelse av oppfinnelsen omfatter den multimeriserende komponent et immunoglobulin-domene.

I en annen utførelse er immunoglobulin-domenet valgt fra gruppen omfattende Fc-domene av IgG og tung kjede av IgG.

- 15 Foretrukne utførelser omfatter et isolert nukleinsyremolekyl omfattende en nukleotidsekvens som koder for et modifisert Flt1-reseptor-fusjonspolypeptid, hvor det kodende parti av nukleinsyremolekylet består av en nukleotidsekvens valgt fra gruppen omfattende

- (a) nukleotidsekvensen SEQ ID NO. 2;
 (b) nukleotidsekvensen SEQ ID NO. 3;
 (c) nukleotidsekvensen SEQ ID NO. 4;
 20 (d) nukleotidsekvensen SEQ ID NO. 5;
 (e) nukleotidsekvensen SEQ ID NO. 6;
 (f) nukleotidsekvensen SEQ ID NO. 7;
 (g) nukleotidsekvensen SEQ ID NO. 8;
 (h) en nukleotidsekvens som, som et resultat av degeneransen av den genetiske
 25 kode, skiller seg fra nukleotidsekvensen av (a), (b), (c), (d), (e), (f) eller (g), og som koder for et fusjonspolypeptidmolekyl som har den biologiske aktivitet av det modifiserte Flt1-reseptorfusjonspolypeptid.

I en ytterligere utførelse av oppfinnelsen kodes et polypeptid for av de ovennevnte isolerte nukleinsyremolekyler.

En foretrukken utførelse er en sammensetning som har evnen til å binde et VEGF-molekyl for å danne et ikke-funksjonelt kompleks som omfatter en multimer av fusjonspolypeptidet.

Også foretrukket er en sammensetning hvor multimeren er en dimer.

- 5 I enda en annen utførelse er sammensetningen i en bærer.

En annen utførelse er en vektor som omfatter de ovenfor beskrevne nukleinsyremolekyler, omfattende en ekspresjonsvektor som omfatter de beskrevne nukleinsyremolekyler, hvor nukleinsyremolekylet er operabelt bundet til en ekspresjonskontrollsekvens.

- 10 Andre omfattede utførelser er et vert/vektor-system for produksjon av et fusjonspolypeptid som omfatter ekspresjonsvektoren, i en egnet vertcelle; vert/vektor-systemet hvor en egnet vertcelle er en bakteriecelle, gjær-celle, insekt-celle eller pattedyr-celle; vert/vektor-systemet hvor den egnede vertcelle er *E. coli*; vert/vektor-systemet hvor den egnede vertcelle er en COS-celle; vert/vektor-
- 15 systemet hvor den egnede vertcelle er en CHO-celle.

En annen utførelse av oppfinnelsen er en fremgangsmåte ved dannelsen av et fusjonspolypeptid, omfattende å dyrke celler av vert/vektor-systemet under tilstander som tillater en produksjon av fusjonspolypeptidet, og å isolere det således dannede fusjonspolypeptid.

- 20 Ytterligere utførelser omfatter et fusjonspolypeptid som kodes for av nukleinsyresekvensen som vises på SEQ ID NO. 1 eller SEQ ID NO. 8, som er blitt modifisert ved acetylering eller pegylering, hvor acetyleringen oppnås med minst ca. et 100 gangers molart overskudd av acetyleringsreagensmiddel, eller hvor acetyleringen oppnås med et molart overskudd av acetyleringsreagensmiddel som varierer fra
- 25 minst ca. et 10 gangers overskudd til ca. et 100 gangers molart overskudd, eller hvor pegyleringen er 10K eller 20K PEG.

En ytterligere utførelse er et fusjonspolypeptid som spesifikt binder VEGF-reseptorliganden VEGF.

- 30 Polypeptidene ifølge oppfinnelsen er virksomme ved blokkering av blodkarvekst i et menneske, og ved inhibering av VEGF-reseptorligandaktivitet i et pattedyr.

Polypeptidene ifølge oppfinnelsen kan også fremskaffe en svekking eller forebygging av svulstvekst i mennesker; svekking eller forebygging av ødemer i mennesker, spesielt hvor ødemet er et hjerneødem; svekking eller forebygging av askittdannelse i mennesker, spesielt hvor askittene er ovariekreft-assosierte askitter.

- 5 Foretrukne utførelser av oppfinnelsen omfatter et fusjonspolypeptid som har evnen til å binde et VEGF-polypeptid, omfattende (a) en VEGF-reseptorkomponent som er operativt bundet til (b) en multimeriseringskomponent, hvor VEGF-reseptorkomponenten er den eneste VEGF-reseptorkomponent i fusjonspolypeptidet og i det vesentlige består av aminosyresekvensen av Ig-domene 2 av det ekstracellulære domene av en første VEGF-reseptor og aminosyresekvensen av Ig-domene 3 av det ekstracellulære domene av en andre VEGF-reseptor.

I en ytterligere utførelse av fusjonspolypeptidet er den første VEGF-reseptor Flt1.

I enda en ytterligere utførelse av fusjonspolypeptidet er den andre VEGF-reseptor Flk1.

- 15 Enda en annen utførelse av fusjonspolypeptidet er en utførelse hvor den andre VEGF-reseptor er Flt4.

- Foretrukne utførelser omfatter et fusjonspolypeptid hvor aminosyresekvensen av Ig-domene 2 av det ekstracellulære domene av den første VEGF-reseptor er oppstrøms for aminosyresekvensen av Ig-domene 3 av det ekstracellulære domene av den andre VEGF-reseptor, og et fusjonspolypeptid hvor aminosyresekvensen av Ig-domene 2 av det ekstracellulære domene av den første VEGF-reseptor er nedstrøms for aminosyresekvensen av Ig-domene 3 av det ekstracellulære domene av den andre VEGF-reseptor.

- I enda en annen utførelse omfatter den fusjonspolypeptid-multimeriserende komponent et immunoglobulindomene omfattende en utførelse hvor immunoglobulin-domenet er valgt fra gruppen omfattende Fc-domene av IgG, tung kjede av IgG og lett kjede av IgG.

- Foretrukne utførelser omfatter et fusjonspolypeptid omfattende en aminosyresekvens av en modifisert Flt1-reseptor, hvor aminosyresekvensen er valgt fra gruppen omfattende (a) aminosyresekvensen som vises på SEQ ID NO. 2; (b) aminosyresekvensen som vises på SEQ ID NO. 3; (c) aminosyresekvensen som vises på

SEQ ID NO. 4; (d) aminosyresekvensen som vises i SEQ ID NO. 5; (e) aminosyresekvensen som vises på SEQ ID NO. 6; (f) aminosyresekvensen som vises på SEQ ID NO. 7; og (g) aminosyresekvensen som vises på SEQ ID NO. 8.

KORT BESKRIVELSE AV TEGNINGENE

5 Fig. 1: IEF-gelanalyse av umodifiserte og acetylerede Flt1(1-3)-Fc-proteiner. Umofisert Flt1(1-3)-Fc-protein har ikke evnen til å trenge inn i gelen grunnet dens pl-verdi >9,3, mens acetyleret Flt1(1-3)-Fc har evnen til å trenge inn i gelen og ekvilibrere ved pl-verdien 5,2.

10 Fig. 2: Bindingen av umodifisert Flt1(1-3)-Fc og acetyleret Flt1(1-3)-Fc-protein til "Matrigel"-bestrøkte plater. Umofisert Flt1(1-3)-Fc-protein bindes i stor grad til ekstracellulære matrikskomponenter i "Matrigel", mens acetyleret Flt1(1-3)-Fc ikke bindes.

15 Fig. 3: Binding av umodifisert Flt1(1-3)-Fc, acetyleret Flt1(1-3)-Fc og pegylert Flt1(1-3)-Fc i et "Biacore"-basert assay. Acetyleret (kolonnene 13-16), pegylert (kolonnene 17-20) og heparin-behandlet KFlt1(1-3)-Fc (kolonnene 21-24) har evnen til å fullstendig konkurrere med et "Biacore"-flak-bundne Flt1(1-3)-Fc om VEGF-bindingen, sammenlignet med kontrollen (kolonnene 1-4) og irrelevant protein (kolonnene 5-8). Umofisert Flt1(1-3)-Fc (kolonnene 5-6) virker å kun delvis konkurrere med "Biacore"-flak-bundet Flt1(1-3)-Fc om VEGF-bindingen. Imidlertid fører vasking av de bundne prøver med 0,5M NaCl (kolonnene 7-8) til en bindingsprofil som ligner profilen for de modifiserte former for Flt1(1-3)-Fc, hvilket tyder på at det umofiserte protein oppviser en ikke-spesifikk binding til flaket, som kan elimineres ved vasking med salt.

20

25 Fig. 4: Bindingen av umodifisert Flt1(1-3)-Fc, acetyleret Flt1(1-3)-Fc og pegylert Flt1(1-3) til VEGF i et ELISA-basert assay. Både pegylerte og acetylerede Flt1(1-3)-Fc-proteiner bindes til VEGF med en affinitet som er nesten like høy som for umofisert Flt1(1-3)-Fc.

30 Fig. 5: Farmakokinetisk profil for umodifisert Flt1(1-3)-Fc, acetyleret Flt1(1-3)-Fc og pegylert Flt1(1-3)-Fc. Balb/c-mus (23-28g) fikk subkutan injisert 4 mg/kg umofisert, acetyleret eller pegylert Flt1(1-3)-Fc. Man tok blodprøver fra musenes hale 1, 2, 4, 6 og 24 timer, 2 dager og 3 dager etter injeksjon av proteinet, og seraene ble testet i et standard ELISA-basert assay utviklet for å påvise Flt1(1-3)-Fc-protein.

T_{maks} -verdien var for alle Flt1(1-3)-Fc-proteiner mellom 6-timers og 24-timers tidspunktet. C_{maks} -verdien for de forskjellige proteiner var som følger: umodifisert: 0,06 µg/ml - 0,15 µg/ml; acetyliert: 1,5 µg/ml - 4,0 µg/ml; og pegyliert: ca. 5 µg/ml.

Fig. 6A-6B: IEF-gelanalyse av umodifiserte og trinnvis acetylierte Flt1(1-3)-Fc-

5 proteiner. Umofisert Flt1(1-3)-Fc-protein har ikke evnen til å trenge inn i gelen, grunnet sin pI-verdi >9,3, mens hovedparten av de trinnvis acetylierte Flt1(1-3)-Fc-prøver (prøver med 30-100 gangers overskudd) hadde evnen til å migrere inn i gelen og ekvilibrere med en pI-verdi mellom 4,55-8,43, avhengig av acetyleringsraden.

10 **Fig. 7:** Bindingen av umodifisert Flt1(1-3)-Fc og trinnvis acetyliert Flt1(1-3)-Fc-protein til "Matrigel"-bestrøkne plater. Slik det også var tilfellet for det irrelevante kontrollprotein, nemlig rTie2-Fc, oppviser trinnvis acetyliert fFlt1(1-3)-Fc (prøver med 20 og 30 gangers overskudd) ingen binding til den "Matrigel"-bestrøkne plate, mens det ikke-acetylierte Flt1(1-3)-Fc-protein oppviser en betydelig binding. Prøven
15 med 10 gangers overskudd oppviser en nedsatt binding, men acetyleringsgraden er ikke tilstrekkelig for å blokkere bindingen til ekstracellulære matrikskomponenter.

Fig. 8: Bindingen av umodifisert Flt1(1-3)-Fc og trinnvis acetyliert Flt1(1-3)-Fc i et "Biacore"-basert assay. I et substrøkiometrisk forhold (0,5 µg/ml av enten umodifisert Flt1(1-3)-Fc eller trinnvis acetyliert Flt1(1-3)-Fc vs. 0,2 µg/ml VEGF), foreligger
20 det ikke tilstrekkelig Flt1(1-3)-Fc (hverken umodifisert eller trinnvis acetyliert) i oppløsningen for å fullstendig binde VEGF'et. Ved 1,0 µg/ml, som er ca. et 1:1 støkiometrisk forhold, har både umodifisert og trinnvis acetyliert Flt1(1-3)-Fc en bedre evne til å konkurrere om VEGF-bindingen, men det foreligger fortsatt ikke tilstrekkelig Flt1(1-3)-Fc-protein (hverken umodifisert eller trinnvis acetyliert) til å fullstendig
25 mette det tilgjengelige VEGF. Ved 5,0 µg/ml, som er mange ganger høyere enn et 1:1 støkiometrisk forhold, har imidlertid både Flt1(1-3)-Fc og det trinnvis acetylierte Flt1(1-3)-Fc-protein evnen til å mette VEGF'et, uavhengig av acetyleringsgraden.

Fig. 9: Farmakokinetisk profil for umodifisert Flt1(1-3)-Fc og trinnvis acetyliert
30 Flt1(1-3)-Fc. Balb/c-mus (23-28 g) fikk subkutan injisert 4 mg/kg umodifisert eller prøver av 10, 20, 40, 60 eller 100 gangers overskudd av trinnvis acetyliert Flt1(1-3)-Fc (3 mus for umodifisert prøve og prøver med 10, 20 og 40 gangers overskudd, og 2 mus for prøvene med 60 og 100 gangers overskudd). Man tok blodprøver fra musenes hale etter 1, 2, 4, 6 og 24 timer, 2 dager og 3 dager etter

injeksjonen. Seraene ble testet i et ELISA-basert assay utviklet for å påvise Flt1(1-3)-Fc. T_{maks} -verdien for alle de testede Flt1(1-3)-Fc-proteiner var på tidspunktet 6 timer, mens C_{maks} -verdien var som følger: umodifisert Flt1(1-3)-Fc: 0,06 µg/ml; prøve med 10 gangers overskudd: 0,7 µg/ml, prøve med 20 gangers overskudd: 2 µg/ml, prøve med 40 gangers overskudd: 4 µg/ml, prøve med 60 gangers overskudd: 2 µg/ml, prøve med 100 gangers overskudd: 1 µg/ml.

Fig. 10: Skjematisk diagram over strukturen av Flt1.

Fig. 11A og 11B: Hydrofilisitsanalyse av aminosyresekvensen av Ig-domene 2 og Ig-domene 3 av Flt1.

Fig. 12: Binding av umodifisert Flt1(1-3)-Fc, basisk region-delesjonsmutant Flt1(1-3)-Fc og Flt1(1-3)_{R→N}-mutantproteiner i et "Biacore"-basert assay. I et substøkiometrisk forhold (0,25 µg/ml Flt1(1-3)-Fc av den umodifiserte, acetylerede eller genetisk modifiserte prøve vs. 0,1 µg/ml VEGF), foreligger utilstrekkelig Flt1(1-3)-Fc-protein til å blokkere bindingen av VEGF til Flt1(1-3)-Fc som er immobilisert på "Biacore"-flaket. Ved 0,5 µg/ml umodifisert, acetyleret eller genetisk modifisert Flt1(1-3)-Fc-protein er det støkiometriske forhold ca. 1:1, og det foreligger en forsterket evne til å blokkere VEGF-bindingen til "Biacore"-flaket. Ved 1,0 µg/ml umodifisert, acetyleret eller genetisk modifisert Flt1(1-3)-Fc-protein, som er et ca. 10:1 støkiometrisk forhold, har Flt1(1-3)-Fc-proteinene evnen til å blokkere bindingen av VEGF til "Biacore"-flaket, men de er ikke like gode. Umofisert, acetyleret og Mut1: Flt1(1-3_{ΔB})-Fc er i det vesentlige like gode til å blokkere VEGF-bindingen, mens Mut4: Flt1(1-3_{R→N})-Fc er noe mindre virksom på å blokkere bindingen.

Fig. 13: Bindingen av umodifisert Flt1(1-3)-Fc, Mut1: Flt1(1-3_{ΔB})-Fc, Mut2: Flt1(2-3_{ΔB})-Fc og Flt1(2-3)-mutantproteiner til "Matrigel"-bestrøkne plater. Umofisert Flt1(1-3)-Fc-protein bindes sterkt til disse brønnene, Mut3: Flt1(2-3)-Fc-protein bindes noe svakere, Mut1: Flt1(1-3_{ΔB})-Fc-protein bindes enda svakere, og Mut2: Flt1(2-3_{ΔB})-Fc-protein oppviser den beste profil idet det bindes svakere enn noe annet mutant protein. Mut4: Flt1(1-3_{R→N})-Fc-glykosylasjons-mutantprotein oppviser kun en ubetydelig fordel i "Matrigel"-assayet.

Fig. 14: Binding av umodifisert Flt1(1-3)-Fc, Mut1: Flt1(1-3_{ΔB})-Fc, Mut2: Flt1(2-3_{ΔB})-Fc og Flt1(2-3)-mutantproteiner i et ELISA-basert assay. Ved de testede konsentrasjoner binder umodifisert Flt1(1-3)-Fc, Mut1: Flt1(1-3_{ΔB})-Fc, Mut2: Flt1(2-3_{ΔB})-Fc og Flt1(2-3)-mutantproteiner VEGF i omtrent like sterk grad.

Fig. 15: Farmakokinetisk profil av umodifisert Flt1(1-3)-Fc, Mut1: Flt1(1-3_{ΔB})-Fc, Mut2: Flt1(2-3_{ΔB})-Fc og Flt1(2-3)-mutantproteiner. C_{maks}-verdien for disse reagensmidler var som følger: umodifisert Flt1(1-3)-Fc: 0,15 µg/ml; 40 gangers molart overskudd-acetyleret Flt1(1-3)-Fc: 1,5 µg/ml; og Mut1: Flt1(1-3_{ΔB})-Fc: 0,7 µg/ml.

Fig. 16: Ekstracellulær matriks (ECM)-assay. Resultatene av dette assay demonstrerer at Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a)- og Flt1D2.VEGFR3D3.FcΔC1(a)-protein er betydelig mindre klebrige på ECM sammenlignet med Flt1(1-3)-Fc-protein.

Fig. 17A-17C: Fosforylasjonsassay. I et 1,5 molart overskudd av enten Flt1(1-3)-Fc, Flt1(1-3)-Fc (A40) eller ubestendig Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a) finner det sted en fullstendig blokkering av reseptorstimulering av disse tre modifiserte Flt1-reseptorer, sammenlignet med behandling i kontrollmedium. Derimot oppviser ubestendig Flt1D2VEGFR3D3.FcΔC1(a) ingen vesentlig blokkering ved dette molare overskudd, sammenlignet med behandlingen med VEGF-positiv kontroll. Lignende resultater fremgår fra fig. 25B, hvor de modifiserte Flt-reseptorer foreligger i et 3 gangers molart overskudd i forhold til VEGF165-ligand. På fig. 25C, hvor de modifiserte Flt1-reseptorer foreligger i et 6 gangers molart overskudd i forhold til VEGF165k-ligand, kan nå ubestendig Flt1D2VEGFR3D3.FcΔC1(a) vises å delvis blokkere en VEGF165-indusert stimulering av celleflaterreseptorer.

Fig. 18A-18B: Fosforylasjonsassay. Påvisning ved "Western blot" av tyrosin-fosforylert VEGFR2(Flk1) ved VEGF165-ligand-stimulering viser at celleflaterreseptorer ikke fosforyleres ved behandlingsprøver som har VEGF165 forhåndsinkubert med 1 og 2 gangers molart overskudd (fig. 26A) eller 3 og 4 gangers molart overskudd (fig. 26B) av enten ubestendig Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a), stabilt Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a) eller ubestendig VEGFR1R2-FcΔC1(a). Ved alle de testede konsentrasjoner av Flt1-reseptor foreligger en fullstendig binding av VEGF165-ligand under forhåndsinkubasjonen, hvilket ikke fører til noen påvisbar stimulering av celleflaterreseptorer med ubundet VEGF165, sammenlignet med kontrollmedium-behandlingen.

Fig. 19: MG/R2-celleproliferasjonsassay. De følgende modifiserte Flt-rreseptorer: Flt1(1-3)-Fc, Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) og Flt1D2.VEGFR3D3.FcΔC1(a) plus en irrelevant reseptor benevnt Tie2-Fc som negativkontroll, ble titrert fra 40 nM til 20 pM og inkubert på callene i 1 time ved 37°C. Humant rekombinant VEGF165 i definert medium ble deretter tilsatt til alle brønnene i konsentrasjonen 1,56 nM. Negativkont-

rollreseptoren Tie2-Fc blokkerer ikke en VEGF165-indusert celleproliferasjon ved noen konsentrasjon, mens Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) blokkerer 1,56 nM VEGF165 med en halvmaksimal dose på 0,8 nM. Flt1(1-3)-Fc og Flt1D2.VEGFR3D3.FcΔC1(a) er mindre effektive ved blokkering av VEGF165 i dette assay, med en halvmaksimal dose på ca. 2 nM. VEGF165 alene gir en avlesning på 1,2 absorbansenheter, og bakgrunnsverdien er 0,38 absorbansenheter.

Fig. 20: "Biacore"-analyse av bindingsstøkiometri. Bindingsstøkiometrien ble beregnet som et molart forhold mellom bundet VEGF165 og immobilisert Flt1D2Flk1D3.FcΔC18a) eller VEGFR1R2-FcΔC1(a), ved bruk av en omregningsfaktor på 1000 RU likeverdig med 1 ng/ml. Resultatene viste til en bindingsstøkiometri på ett VEGF165-dimert molekyl per ett Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a) eller VEGFR1R2-FcΔC1(a)-molekyl.

Fig. 21 og fig. 22: Størrelseseksklusjons-kromatografisk støkiometri. Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a) eller VEGFR1R2-FcΔC1(a) ved en konsentrasjon på 1 nM (beregnet å være 1000 ganger høyere enn KD-verdien for Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a)- eller VEGFR1R2-FcΔC1(a)/VEGF165-vekselvirkning) ble blandet med forskjellige konsentrasjoner av VEGF165. Ett6er inkubasjonen ble konsentrasjonen av fritt Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a) i oppløsningen målt. Dataen viser at tilsetning av 1 nM VEGF165 i Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a)-oppløsningen fullstendig blokkerer Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a)-bindingen til VEGF165-overflaten. Dette resultat antyder en bindingsstøkiometri på ett VEGF165-molekyl per ett Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a)-molekyl.

Fig. 23: Størrelseseksklusjons-kromatografi (SEC) under native betingelser. Topp nr. 1 representerer Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a)/VEGF165-komplekset, og topp nr. 2 representerer ubundet VEGF165. Fraksjoner som ble eluert mellom 1,1 og 1,2 ml, ble slått sammen, og guanidiniumhydroklorid (GuHCl) ble tilsatt i den endelige konsentrasjon 4,5M for å dissosiere komplekset.

Fig. 24: Størrelseseksklusjonskromatografi (SEC) under dissosiative betingelser. For å adskille komponentene av reseptor/ligand-komplekset og bestemme deres molare forhold, ble 50 µl dissosiert kompleks ladet på en "Superose" 12 PC 3,2/30 som var ekvilibret i 6M GuHCl, og eluert. Topp nr. 1 representerer Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a), og topp nr. 2 representerer VEGF165.

Fig. 24, fig. 26 og fig. 27: Størrelseseksklusions-kromatografi (SEC) med on-line lysspredning. Størrelseseksklusions-kromatografikolonne med en "MiniDawn" on-line lysspredningsdetektor (Wyatt Technology, Santa Barbara, California) og refraksjonsindeks (RI)-detektorer (Shimadzu, Kyoto, Japan) ble brukt for å bestemme molekylvekten (MW) av reseptor/ligand-komplekset. Slik det fremgår fra fig. 33, oppviser elueringsprofilen to topper. Topp nr. 1 representerer reseptor/ligand-komplekset, og topp nr. 2 representerer ubundet VEGF165. MW ble beregnet fra LS- og RI-signalene. Den samme prosedyre ble brukt for å bestemme MW av de enkelte komponenter av reseptor/ligand-komplekset. Resultatene av disse bestemmelser er som følger: MW av Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a)/VEGF165-komplekset ved toppens posisjon er 157.300 (fig. 33); MW av VEGF165 ved toppens posisjon er 44.390 (fig. 34), og MW av R1R2 ved toppen er 113.300 (fig. 35).

Angående SEQ ID NO. 9, som viser peptid-kartlegging og glykosylasjonsanalyse, ble disulfidstrukturene og glykosylasjonssetene i Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) bestemt ved en peptidkartleggingsmetode. Det finnes tilsammen ti cysteiner i Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a); seks av den tilhører Fc-region. Cys27 er disulfidbundet til Cys76. Cys121 er disulfidbundet til Cys182. De første to cysteiner i Fc-region (Cys211 og Cys214) danner en intermolekylær disulfidbinding med de samme to cysteiner i en annen Fc-kjede. Imidlertid kan det ikke bestemmes om disulfidbinding foreligger mellom de samme cysteiner (f.eks. Cys211 til Cys211) eller mellom Cys211 og Cys214. Cys216 er disulfidbundet til Cys306. Cys352 er disulfidbundet til Cys410.

Det finnes fem mulige N-bundne glykosylasjonssteder i Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a), og disse viser seg å være glykosylert i forskjellig grad. En fullstendig glykosylasjon observeres ved Asn33, Asn193 og Asn282. En delvis glykosylasjon observeres på Asn65 og Asn120. Glykosylasjonssteder er merket med understreking på figuren.

Fig. 28: Farmakokinetikk av Flt1(1-3)-Fc (A40), Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) og VEGFR1R2-FcΔC1(a). Balb/c-mus fikk subkutan injisert 4 mg/kg Flt1(1-3)-Fc (A40), ubestendig CHO-uttrykt Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a), CHO-stabilt uttrykt Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) og ubestendig CHO-uttrykt VEGFR1R2-FcΔC1(a). Man tok blodprøver fra musenes hale 1, 2, 4, 6 og 24 timer, 2 dager, 3 dager og 6 dager etter injeksjonen. Seraene ble analysert i et ELISA som var utformet til å påvise Flt1(1-3)-Fc (A40), Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) eller VEGFR1R2-FcΔC1(a). T_{maks} -verdien for Flt1(1-3)-Fc (A40) var ved 6 timer, mens T_{maks} -verdien for ubestendig og stabilt Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) og ubestendig VEGFR1R2-FcΔC1(a) var 24 timer. C_{maks} for

Flt1(1-3)-Fc (A40) var 8 µg/ml. For begge de ubestandig produkter (Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) og VEGFR1R2-FcΔC1(a)) var C_{maks} 18 µg/ml, og C_{maks} for stabilt VEGFR1R2-FcΔC1(a) var 30 µg/ml.

Fig. 29: Farmakokinetikk av Flt1(1-3)-Fc (A40), Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) og Flt1D2.VEGFR3D3.FcΔC1(a). Balb/c-mus fikk subkutan injisert 4 mg/kg Flt1(1-3)-Fc (A40), ubestandig CHO-uttrykt Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) og ubestandig CHO-uttrykt Flt1D2.VEGFR3D3.FcΔC1(a). Man tok blodprøver fra musenes hale 1, 2, 5, 6, 7, 8, 12, 15 og 20 dager etter injeksjonen. Seraene ble analysert i et ELISA som var utformet for å påvise Flt1(1-3)-Fc, Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) og Flt1D2.VEGFR3D3.FcΔC1(a). Flt1(1-3)-Fc (A40) kunne ikke lenger påvises i serum etter dag 5, mens Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) og Flt1D2.VEGFR3D3.FcΔC1(a) kunne påvises i 15 dager eller lenger.

Fig. 30: Evnen av Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) til å inhibere HT-1080-fibrosarkomasvulstvekst *in vivo*. Behandling av SCID-mus med 25 mg/kg Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) annenhver dag eller 2 ganger i uken nedsetter veksten av subkutane HT-1080-fibrosarkomasvulster vesentlig.

Fig. 31: Evnen av Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) til å inhibere C6-gliomasvulstvekst *in vivo*. Behandling av SCID-mus med Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) annenhver dag eller 2 ganger i uken nedsetter veksten av subkutane C6-gliomasvulster betydelig, ved såpass lave doser som 2,5 mg/kg.

Fig. 32: VEGF-indusert uterin hyperpermeabilitet. PMSG som injiseres subkutan (5 IU) for å indusere ovulasjon i prepubertale rotter av hunnkjønn, fører til en strøm av østradiol etter 2 dager, hvilket i sin tur forårsaker en induksjon av VEGF i uterus. Denne induksjon fører til en hyperpermeabilitet av uterus og en økning av uterin-våttekten. En subkutan injeksjon av Flt1(1-3)-Fc (A40), Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) i konsentrasjonen 25 mg/kg 1 time etter PMSG-injeksjonen fører til en ca. 50% inhibering av økningen av uterin-våttekten.

Fig. 33A-33B: Bedømmelse av *corpus luteum*-angiogenese ved bruk av progesteron som avlesning. PMSG ble injisert subkutan (5 IU) for å indusere ovulasjon i prepubertale rotter av hunnkjønn, hvilket førte til en fullstendig funksjonell *corpus luteum* som inneholdt et tett nettverk av blodkar som utsondrer progesteron i blodstrømmen for å forberede uterus på implantasjon. Induksjonen av angiogenese i *corpus luteum* er avhengig av VEGF. Hvilkenivået av progesteron er ca. 5 ng/ml, og kan

induseres til 25-40 ng/ml etter PMSG. En subkutan injeksjon av Flt1(1-3)-Fc (A40) eller Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) i konsentrasjonen 25 mg/kg eller 5 mg/kg 1 time etter PMSG-injeksjonen førte til en fullstendig inhibering av progesteroninduksjonen på dag 4.

- 5 I tillegg viser SEQ ID NO. 1 nukleinsyre og avledet aminosyresekvens av Flt1(1-3)-Fc, SEQ ID NO. 2 viser nukleinsyre- og avledet aminosyresekvens av Mut 1: Flt1(1-3_{ΔB})-Fc, SEQ ID NO.3 viser nukleinsyre- og avledet aminosyresekvens av Mut 2: Flt1(2-3_{ΔB})-Fc; SEQ ID NO. 4 viser nukleinsyre og avledet aminosyresekvens av Mut 3: Flt1(2-3)-Fc; SEQ ID NO. 5 viser nukleinsyre og avledet aminosyresekvens
10 av Mut 4: Flt1(1-3_{R-N})-Fc; SEQ ID NO. 6 viser nukleotid- og avledet aminosyresekvens av den umodifiserte Flt1-reseptor som benevnes Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a); SEQ ID NO. 7 viser nukleotid- og avledet aminosyresekvens av den modifiserte Flt1-reseptor som benevnes flt1D2.VEGFR3D3.FcΔC1(a); SEQ ID NO. 8 viser nukleotid- og avledet aminosyresekvens av den modifiserte Flt1-reseptor som benevnes
15 VEGFR1R2-FcΔC1(a); SEQ ID NO. 9 viser peptidkartlegging og glykosyleringsanalyse i polypeptidet Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a).

DETALJERT BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN

- Det har lenge vært et problem innen faget å danne en reseptor-basert VEGF-antagonist som har en farmakokinetisk profil som er egnet til at man kan ta anta-
20 gonisten i betraktning som en terapeutisk kandidat. Søker beskriver heri for første gang et kimært polypeptidmolekyl som har evnen til å antagonisere VEGF-aktivitet, som oppviser forbedrede farmakokinetiske egenskaper sammenlignet med andre kjente reseptorbaserte VEGF-antagonister. De kimære polypeptidmolekyler som beskrives heri, tilveiebringer dermed for første gang egnede molekyler for anven-
25 delse i terapier hvor det er ønskelig med en antagonisme av VEGF.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer nye kimære polypeptidmolekyler som dannes ved å kondensere et modifisert ekstracellulær ligandbindende domene av Flt1-reseptor til Fc-region av IgG.

- Det ekstracellulære ligandbindende domene defineres som det parti av en reseptor
30 som i sin native konformasjon i cellemembranen er orientert ekstracellulært, hvor det kan komme i berøring med sin kognate ligand. Den ekstracellulære ligandbindende domene omfatter ikke de hydrofobe aminosyrer forbundet med reseptorens transmembrane domene eller noen aminosyrer forbundet med reseptorens intracel-

lulære domene. Generelt er den intracellulære eller cytoplasmatiske del vanligvis satt sammen av positivt ladede eller polare aminosyrer (dvs. lysin, arginin, histidin, glutaminsyre, asparaginsyre). De forutgående 15-30, overveiende hydrofobe eller apolare aminosyrer (dvs. leucin, valin, isoleucin og fenylalanin) utgjør det trans-

5 membrane domene. Det ekstracellulære domene omfatter aminosyrene som ligger foran den hydrofobe transmembrane strekning av aminosyrer. Vanligvis flankeres det transmembrane domene av positivt ladede eller polare aminosyrer så som lysin eller arginin. von Heijne har publisert detaljerte regler som fagmannen vanligvis konsulterer når han bestemmer hvilke aminosyrer av en gitt reseptor som tilhører

10 den ekstracellulære, transmembrane eller intracellulære domene (se von Heijne, 1995, BioEssays 17: 25-30). Alternativt er det blitt tilgjengelig websteder på internett, så som http://ulrec3.unil.ch/software/TMPRED_form.html for å gi proteinkjemikeren informasjon om å forutsi proteindomener.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer en konstruksjon av nukleinsyremolekyler som koder for kimære polypeptidmolekyler som innføres i en vektor som har evnen

15 til å uttrykke de kimære polypeptidmolekyler når de innføres i en egnet vertcelle. Egnede vertceller omfatter, men er ikke begrenset til, bakterieceller, gjærceller, insektceller og pattedyrceller. Hvilken som helst metode som er kjent for fagmannen for å innføre DNA-fragmenter i en vektor, kan brukes for å konstruere ekspresjonsvektorer som koder for de kimære polypeptidmolekyler under styring av de

20 transkripsjonelle/translasjonelle styresignaler. Disse metoder kan omfatte *in vitro*-rekombinant DNA- og syntetiske teknikker og *in vivo*-rekombinasjoner (genetisk rekombinasjon) (se Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory; Current Protocols in Molecular Biology, utg. Ausubel *et al.*,

25 *et al.*, Greene Publ. Assoc., Wiley-Interscience, NY).

Ekspresjon av nukleinsyremolekyler som koder for de kimære polypeptidmolekyler, kan reguleres med en andre nukleinsyresekvens slik at det kimære polypeptidmolekyl uttrykkes i en vert som er blitt transformert med det rekombinante DNA-

30 molekyl. F.eks. kan ekspresjon av de kimære polypeptidmolekyler som beskrives heri, styres ved hjelp av hvilket som helst promoter/forsterker-element som er kjent innen faget. Promotere som kan brukes til å styre ekspresjonen av de kimære polypeptidmolekyler, omfatter, men er ikke begrenset til, lang terminal gjentakelse som beskrives av Squinto *et al.* (1991, Cell 65: 1-20); SV40-tidlig promoterregion (Bernoist og Chambon, 1981, Nature 290: 304-310), CMV-promoter, M-MuLV-5'-

35 terminal gjentakelse promoteren som foreligger i 3'-lang terminal gjentakelse til Rous sarcomavirus (Yamamoto *et al.*, 1980, Cell 22: 787-797), herpes-

thymidinkinase-promoter (Wagner *et al.*, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78: 144-1445), de regulatoriske sekvenser av metallotionin-gen (Brinster *et al.*, 1982, Nature 296: 39-42); prokaryotiske ekspresjonsvektorer så som β -laktamase-promoter (Villa-Kamaroff *et al.*, 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75: 3727-3731) eller *tac*-promoter (DeBoer *et al.*, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80: 21-25, se også "Useful proteins from recombinant bacteria" i Scientific American, 1980, 242: 74-94); promoterelementer fra gjær eller annen sopp så som Gal4-promoter, ADH (alkoholdehydrogenase)-promoter, PGK (fosfoglycerolkinase)-promoter, alkalifosfatasepromoter og de følgende animalske transkripsjonelle styreregioner som oppviser vevspesifisitet og er blitt brukt i transgene dyr: elastase I-genkontrollregion, som er aktiv i acinære celler i bukspyttkjertel (Swift *et al.*, 1984, Cell 38: 639-646; Ornitz *et al.*, 1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50: 399-409; MacDonald, 1987, Hepatology 7: 425-515); insulin-gen-styreregion som er aktiv i betaceller av bukspyttkjertel (Hanahan, 1985, Nature 315: 115-122), immunoglobulin-gen-styreregion, som er aktiv i lymfeceller (Grosschedl *et al.*, 1984, Cell 38: 647-658; Adames *et al.*, 1985, Nature 318: 533-538; Alexander *et al.*, 1987, Mol. Cell. Biol. 7: 1436-1444), muse-brystsvulstvirus-styreregion, som er aktiv i testikkel-, bryst-, lymfe- og mastceller (Leder *et al.*, 1986, Cell 45: 485-495), albumin-gen-styreregion, som er aktiv i leveren (Pinkert *et al.*, 1987, Genes and Devel. 1: 268-276), alfa-fetoprotein-gen-styreregion, som er aktiv i leveren (Krumlauf *et al.*, 1985, Mol. Cell. Biol. 5: 1639-1648; Hammer *et al.*, 1987, Science 235: 53-58); alfa 1-antitrypsin-gen-styreregion, som er aktiv i leveren (Kelsey *et al.*, 1987, Genes and Devel. 1: 161-171), beta-globulin-gen-styreregion, som er aktiv i myeloide celler (Mogam *et al.*, 1985, Nature 315: 338-340; Kollias *et al.*, 1986, Cell 46: 89-94); myelin-basisk protein-gen-styreregion, som er aktiv i oligodendrocyttceller i hjernen (Readhead *et al.*, 1987, Cell 48: 703-712); myosin-lettkjede-2-gen-styreregion, som er aktiv i skjelettmuskler (Shani, 1985, Nature 314: 283-286) og gonadotropisk frigivningshormon-gen-styreregion, som er aktiv i hypothalamus (Mason *et al.*, 1986, Science 234: 1372-1378).

Dermed brukes ekspresjonsvektorer som har evnen til å replikeres i en bakteriell eller eukaryotisk vert, omfattende en nukleinsyre som koder for et kimært polypeptidmolekyl som beskrevet heri, for å transifisere verten og dermed styre ekspresjonen av slike nukleinsyrer for å danne de kimære polypeptidmolekyler, som deretter kan isoleres i en biologisk aktiv form. Anvendt heri omfatter en biologisk aktiv form en form som har evnen til å bindes til VEGF.

Ekspresjonsvektorer som inneholder de kimære nukleinsyremolekyler som beskrives heri, kan identifiseres ved tre generelle fremgangsmåter: (a) DNA-DNA-hybridisering, (b) nærvær eller fravær av "markør"-genfunksjoner og (c) ekspresjon av innføyde sekvenser. I den første fremgangsmåte kan nærværet av et fremmed gen som er innføyd i en ekspresjonsvektor, påvises ved DNA-DNA-hybrideisering ved bruk av prober som omfatter sekvenser som er homologe med de innføyde kimære polypeptid-molekylsekvenser. I den andre fremgangsmåte kan det rekombinante vektor/vert-system identifiseres og velges ut på grunnlag av nærværet eller fraværet av visse "markør"-genfunksjoner (f.eks. tymidinkinase-aktivitet, resistens mot antibiotika, transformasjonsfenotype, okklusjonslegemiddannelse i baculovirus osv.) som forårsakes av innføyelsen av fremmedgener i vektoren. F.eks. hvis den kimære polypeptidmolekyl-DNA-sekvens innføres i markør-gen-sekvensen av vektoren, kan rekombinanter som inneholder innføyelsen, identifiseres ved fraværet av markørgenfunksjonen. I den tredje fremgangsmåte kan rekombinante ekspresjonsvektorer identifiseres ved å teste fremmedgenproduktet som uttrykkes av rekombinanten. Slike assayer kan f.eks. basere seg på de fysiske eller funksjonelle egenskaper av de kimære polypeptidmolekyler.

Celler kan uttrykke de kimære polypeptidmolekyler ubestendig, eller fortrinnsvis, konstitutivt og permanent.

De kimære polypeptidmolekyler kan renses ved hvilken som helst teknikk som muliggjør en påfølgende dannelse av et stabilt, biologisk aktivt kimært polypeptidmolekyl. Som et eksempel kan faktorene isoleres fra celler enten som løselige proteiner eller som innlemmelseslegemer, hvorfra de kan ekstraheres kvantitativt ved 8M-guanidiniumhydroklorid og dialyse (se f.eks. Builder *et al.*, US-patent nr. 5.663.304). For å rense faktorene ytterligere, kan konvensjonell ionbyttekromatografi, hydrofob vekselvirkningskromatografi, reversfasekromatografi eller gelfiltrering brukes.

I én utførelse av oppfinnelsen er nukleotidsekvensen som koder for den første komponent, oppstrøms for nukleotidsekvensen som koder for den andre komponent. I en annen utførelse av oppfinnelsen er nukleotidsekvensen som koder for den første komponent, nedstrøms for nukleotidsekvensen som koder for den andre komponent. Ytterligere utførelser av oppfinnelsen kan fremstilles, hvor rekkefølgen av den første, andre og tredje fusjonspolypeptid-komponent er endret. F.eks. hvis nukleotidsekvensen som koder for den første komponent, benevnes 1, nukleotidsekvensen som koder for den andre komponent, benevnes 2, og nukleotidsekvensen

sen som koder for den tredje komponent, benevnes 3, da kan rekkefølgen av komponentene i den isolerte nukleinsyre ifølge oppfinnelsen, lest fra 5'- til 3'-ende, være hvilken som helst av de følgende seks kombinasjoner: 1,2,3; 1,3,2; 2,1,3; 2,3,1; 3,1,2; eller 3,2,1.

- 5 Foreliggende oppfinnelse har også diagnostisk og terapeutisk nytte. I spesielle utførelser av oppfinnelsen kan fremgangsmåter for påvisning av avvik i funksjonen eller ekspresjonen av de kimære polypeptidmolekyler som beskrives heri, brukes for diagnostisering av forstyrrelser. I andre utførelser kan en manipulasjon av de kimære polypeptidmolekyler eller agonister eller antagonister som binder de kimære
- 10 polypeptidmolekyler, brukes til behandling av sykdommer. I ytterligere utførelser benyttes det kimære polypeptidmolekyl som middel for å blokkere bindingen av et bindingsmiddel til sitt mål.

- Som et eksempel kan behandling utføres av kliniske tilstander som kjennetegnes ved vaskulær permeabilitet, ødem eller betennelse, så som hjerneødem forbundet
- 15 med skade, slag eller svulst; ødem forbundet med betennelsesforstyrrelser så som psoriasis eller artritt, omfattende rheumatoid artritt; asthma; generalisert ødem forbundet med forbrenninger; askitter og pleural effusjon forbundet med svulster, betennelse eller trauma; kronisk luftveisbetennelse; kapillærlekkasjesyndrom; sepsis; nyresykdom forbundet med økt lekkasje av protein; og øyeforstyrrelser så som
- 20 aldersrelatert makulær degenerasjon og diabetisk retinopati.

- En aminosyresekvensanalyse av Flt1(1-3)-Fc viste et nærvær av et usedvanlig høyt antall (46) av det basiske aminosyreresiduum lysin. En IEF-analyse av Flt1(1-3)-Fc viste at dette protein har en pI-verdi over 9,3, hvilket bekreftet forutsigelsen at proteinet er meget basisk. Man hypotetiserte at den basiske natur av Flt1(1-3)-Fc-
- 25 protein gjorde at det bandt seg til ekstracellulære matriksbestanddeler, og at denne vekselvirkning kunne være årsaken til den ekstremt korte påvisbare sirkulasjonshalveringstid i serum som oppvises av Flt1(1-3)-Fc når det injiseres i mus. For å teste denne hypotese, ble Flt1(1-3)-Fc-protein acetylert ved lysinresiduen for å nedsette den basiske ladning. Acetylert Flt1(1-3)-Fc ble deretter testet i assayene
- 30 som skal beskrives i det følgende.

EKSEMPLER

Eksempel 1:

Ekspresjon av Flt1(1-3)-Fc-protein i CHO-K1-celler

Ved bruk av standard molekylærbiologiske teknikker (se f.eks. Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Sambrook *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory), Current Protocols in Molecular Biology (utg. Ausubel *et al.*, Greene Publ. Assoc., Wiley-Interscience, NY)), ble genet som koder for Flt1(1-3)-Fc, innføyd i ekspresjonsvektoren pEE14.1 (Lonza Biologics, plc) ved et multippelt kloningssete nedstrøms for CMV-promoter. CHO-K1-celler ble transfisert med pEE14.1/Flt1(1-3)-Fc-DNA-konstruktet ved bruk av lipofectamin (Gaithersburg, MD). De transfiserte CHO-K1-celler ble dyrket i glutaminfritt DMEM (JRH, Kansas City, MO) som inneholdt 25 µM metioninsulfoksimin (MSX) fra Sigma Inc., St. Louis, MO, og høyt rekombinante proteinekspressorer ble erholdt ved å teste å teste CHO-K1-celle-supernatanten fra over 100 håndplukkede koloniisolater ved bruk av et standard immunoassay som innfanger og påviser humant Fc. Den valgte håndplukkede klon ble amplifisert i nærvær av 100 µM MSX, fulgt av en andre runde med testing av de amplifiserte kloner. Den høyest produserende klon hadde en spesifikk produktivitet av rekombinant Flt1(1-3)-Fc-protein på 55 pg/celle/dag.

Den valgte klon ble ekspandert i 225 cm² T-kolber (Corning, Acton, MA) og deretter i 8,5 l rullekolber (Corning, Acton, MA) ved bruk av det ovenfor beskrevne cellekulturmedium. Celler ble fjernet fra rullekolben ved standard trypsinisering og plassert i 3,5 l suspensjonsmedium. Suspensjonsmediet bestod av glutaminfritt ISCHO-medium (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) som inneholdt 5% føtalt bovint serum (FBS fra Hyclone Labs, Logan, UT), 100 µM MSX og GS-supplement (JRH Scientific, Kansas City, MO) i en 5 l Celligen-bioreaktor (New Brunswick Scientific, New Brunswick, NJ) i en tetthet på $0,3 \times 10^6$ celler/ml. Etter at cellene oppnådde en tetthet på $2,6 \times 10^6$ celler/ml og var tilpasset for suspensjon, ble de overført til en 60 l bioreaktor (ABEC, Allentown, PA) i en tetthet på $0,5 \times 10^6$ celler/ml i 20 l ISCHO-medium med 5% føtalt bovint serum. Etter 2 dager ble ytterligere 20 l ISCHO + 5% føtalt bovint serum tilsatt til bioreaktoren. Cellene fikk vokse i ytterligere to dager, og oppnådde en endelig tetthet på $3,1 \times 10^6$ celler/ml, og den endelige Flt1(1-3)-Fc-konsentrasjon ved innsamlingen var 95 mg/l. Ved innsamlingen ble cellene fjernet ved tangensialstrømfiltrering ved bruk av 0,45 µm ProstaK-filtre (Millipore, Inc., Bedford, MA).

Eksempel 2:

Rensing av Flt1(1-3)-Fc-protein som ble erholdt fra CHO-K1-celler

Flt1(1-3)-Fc-protein ble i utgangspunktet rensed ved affinitetskromatografi. En Protein A-kolonne ble brukt til å med høy spesifisitet binde Fc-partiet av molekylet.

- 5 Dette affinitetsrensede protein ble deretter konsentrert og ført over en SEC-kolonne. Proteinet ble deretter eluert inn i formuleringsbufferen. I det følgende beskrives disse prosedyrer i detalj.

Materialer og metoder

- 10 Alle kjemikalier ble ervervet fra J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, unntatt PBS, som ble ervervet som et 10⁻⁶-konsentrat fra Life Technologies, Gaithersburg, MD. Protein A-Fast Flow og Superdex 200-harpiks av prepareringskvalitet ble ervervet fra Pharmacia, Piscataway, NJ. Utstyr og membraner for proteinkonsentrasjon ble erholdt fra Millipore, Bedford, MA.

- 15 Ca. 40 l 0,45 µm-filtrert CHO-kondisjonert medium som inneholdt Flt1(1-3)-Fc-protein, ble påført på en 290 ml Protein A Fast Flow-kolonne (10 cm diameter) som var blitt ekvibrert med PBS. Kolonnen ble vasket med PBS som inneholdt 350 mM NaCl og 0,02% CHAPS, og det bundne protein ble eluert med 20 mM sitronsyre som inneholdt 10 mM Na₂HPO₄. Den enkelte topp i elueringen ble samlet, og dens pH ble hevet til nøytral nivå med 1M NaOH. Eluatfraksjonene ble konsentrert til ca.
- 20 9 mg/ml ved bruk av 10K regenererte cellulosemembraner, både ved tangensialstrømfiltrering og ved omrørt cellekonsentrasjon. For å fjerne aggregater og andre forurensninger, ble det konsentrerte protein påført på en kolonne som var pakket med Superdex 200-harpiks av prepareringskvalitet (10 cm x 55 cm) og ført i PBS som inneholdt 5% glycerol. Hovedtoppfraksjonene ble samlet, sterilfiltrert, alikvotert og lagret ved -80°C.
- 25

Eksempel 3:

Acetylering av Flt1(1-3)-Fc-protein

- 2 mg Flt1(1-3)-Fc-protein ble acetylet slik det beskrives i veiledningsmanualen som leveres med sulfo-NHS-acetat-modifikasjonssettet (Pierce Chemical Co., Rockford, IL, kat-nr. 26777).
- 30

Eksempel 4:Karakterisering av acetylt Flt1(1-3)-Fc-protein(a) IEF-analyse

Flt1(1-3)-Fc og acetylt Flt1(1-3)-Fc ble analysert ved standard IEF-analyse. Slik
 5 det fremgår fra fig. 1, har Flt1(1-3)-Fc-protein ikke evnen til å migrere inn i gelen,
 og må dermed ha en pI-verdi over 9,3, den høyeste pI-verdi i standarden. Imidler-
 tid har acetylt Flt1(1-3)-Fc evnen til å migrere inn i gelen og ekvilibre ved en
 pI-verdi på ca. 5,2. Dette resultat demonstrerer at acetylering nedsetter den positi-
 ve nettoladning av proteinet, og dermed dets pI-verdi, betraktelig.

10 (b) Binding til ekstracellulære matrikskomponenter

For å teste bindingen til ekstracellulære matrikskomponenter, ble Flt1(1-3)-Fc og
 acetylt Flt1(1-3)-Fc testet i et assay som var utformet til å etterligne vekselvirk-
 ningen med ekstracellulære matrikskomponenter. I dette assay bestrykes 96-
 brønners vevkulturplater med Matrigel (Biocoat "MATRIGEL"-matrikstynnsjiktets 96-
 15 brønners plate, katalognr. 40607, Becton Dickinson Labware, Bedford, MA). Platene
 inkuberes med forskjellige konsentrasjoner av enten Flt1(1-3)-Fc, acetylt
 Flt1(1-3)-Fc eller rTie2-Fc (et irrelevant kontrollprotein) tilsatt til brønnene. Platene
 inkuberes i 1-2 timer ved enten romtemperatur eller 37°C, og deretter utføres på-
 visningen av bundne proteiner ved tilsetning av et sekundært alkalifosfatase-
 20 konjugert anti-humant Fc-antistoff til brønnene. Til slutt tilsettes alkalifosfatase-
 substrat til brønnene, og den optiske tetthet måles. Fig. 2 viser resultatene av dette
 assay. Slik som også det irrelevante kontrollprotein rTie2-Fc, oppviser heller ikke
 acetylt Flt1(1-3)-Fc noen binding til den Matrigel-bestrøkte plate, mens det ikke-
 acetylte Flt1(1-3)-Fc-protein oppviser en betraktelig binding. Dette resultat tyder
 25 på at en acetylering av de basiske aminosyreresiduer er en virksom måte å forstyr-
 re ladningsvekselvirkningene som finnes mellom positivt ladede proteiner og de
 negativt ladede ekstracellulære matrikskomponenter som de utsettes for *in vivo*.

Eksempel 5:Pegylering av Flt1(1-3)-Fc-protein

30 Selv om pegylering (polyetylenglykol: PEG) av protein har vist seg å heve deres *in*
vivo-potens ved å forsterke stabiliteten og biotilgjengeligheten mens immunogenisi-
 teten minimeres (se publikasjoner som ble nevnt ovenfor), er det kontra-intuitivt at

pegylering av molekyler som er for store til å filtreres av nyre-glomeruli, ville forbedre deres farmakokinetiske egenskaper. Uten at man ønsker å binde seg til noen spesiell teori, antok Søker at en pegylering av Flt1(1-3)-Fc-molekylene kunne forbedre de farmakokinetiske egenskaper, eventuelt uten å endre den positive ladning eller ved å nedsette pI-verdien av Flt1(1-3)-Fc, men heller ved å fysisk avskjerne de positive ladninger fra å vekselvirke med den ekstracellulære matriks. Søker bestemte seg for å forsøke å forbedre de farmakokinetiske egenskaper av Flt1(1-3)-Fc-molekyler ved å feste på 20K PEG'er slik det skal beskrives i det følgende.

Materialer og metoder

Renset Flt1(1-3)-Fc erholdt fra CHO-celler (se ovenfor) ble brukt i de følgende pegyleringseksperimenter. Funksjonaliserte PEG'er ble erholdt fra Shearwater Polymers, Huntsville, AL; Bicin fra Sigma, St. Louis, MO; Superose 6-kolonne fra Pharmacia, Piscataway, NJ; PBS som et 10x-konsentrat fra Life Technologies, Gaithersburg, MD; glycerol fra J.T. Baker, Phillipsburg, NJ; og Bis-Tris-"precast"-geler fra Novex, CA.

20K PEG-kjeder som var blitt funksjonalisert med aminspesifikke terminale enheter, ble brukt i reaksjonsstudier i liten skala som var satt opp til å bedømme forskjellige reaksjonsbetingelser hvor PEG:protein-støkiometrien ble variert. På grunnlag av disse reaksjoner og analysene av prøvene på standard SDS-PAGE, ble Flt1(1-3)-Fc i en konsentrasjon på 1,5 mg/ml omsatt ved pH 8,1 med 20K SPA-PEG (PEG-suksinimidylpropionat)-molekyler ved et molart forhold mellom PEG og Flt1(1-3)-Fc-monomer på 1:6. Reaksjonen fikk fremskri ved 8°C over natten. For en første rensing ble reaksjonsproduktene påført på en 10 mm x 30 cm Superose 6-kolonne som var ekvilibrert med PBS som inneholdt 5% glycerol. Kolonnen virket å separere pegylerte Flt1(1-3)-Fc-molekyler på grunnlag av pegyleringsomfanget. Fraksjoner som tilsvarte hva som virker å være primært mono-pegylert og di-pegylert Flt1(1-3)-Fc, bedømt i henhold til båndmønstre på reduserende og ikke-reduserende SDS-PAGE-geler, ble samlet. Proteinkonsentrasjonen ble bestemt ved å måle absorbansen ved 280 nm. Det pegylerte Flt1(1-3)-Fc-protein ble sterilfiltrert, alikvotert og lagret ved -40°C.

Eksempel 6:Binding av umodifisert, acetyliert og pegyliert Flt1(1-3)-Fc i et "Biacore"-basert assay

Umodifiserte, acetylierte og pegylierte Flt1(1-3)-Fc-proteiner ble testet i et "Biacore"-basert assay for å bedømme deres evne til å bindes til Flt1-liganden VEGF. I dette assay ble umodifisert Flt1(1-3)-Fc-protein immobilisert på overflaten av et "Biacore"-flak (se Biacore-instruksmanualen, Pharmacia, Ing., Piscataway, NJ, for standardprosedyrer), og en prøve som inneholdt 0,2 µg/ml VEGF og enten umodifisert Flt1(1-3)-Fc, acetyliert Flt1(1-3)-Fc eller pegyliert Flt1(1-3)-Fc (hver i konsentrasjonen 25 µg/ml), ble ført over det Flt1(1-3)-Fc-bestrøkte flak. For å minimere virkningene av ikke-spesifikk binding, ble de bundne prøver vasket med en 0,5M NaCl-vasking. I én prøve ble umodifisert Flt1(1-3)-Fc blandet med heparin. Heparin er et negativt ladet molekyl, og Flt1(1-3)-Fc-protein er et positivt ladet molekyl, slik at når de to molekyler blandes sammen, bør de vekselvirke gjennom sine ladninger. Dette nøytraliserer i det vesentlige Flt1(1-3)-Fc's iboende positive ladning, og får molekylet til å bete seg som om det var blitt kjemisk eller genetisk modifisert for å nedsette ladningen og dets tendens til å bindes via ladningsvekselvirkninger. Slik det fremgår fra fig. 3, har både acetyliert (kolonnene 13-16), pegyliert (kolonnene 17-20) og heparinbehandlet Flt1(1-3)-Fc (kolonnene 21-24) evnen til å fullstendig konkurrere med et "Biacore"-flak-bundne Flt1(1-3)-Fc om VEGF-binding, sammenlignet med kontrollen (kolonnene 1-4) og irrelevant protein (kolonnene 5-8). Umodifisert Flt1(1-3)-Fc (kolonnene 5-6) virket å kun delvis konkurrere med "Biacore"-flak-bundet Flt1(1-3)-Fc om VEGF-bindingen. Imidlertid førte en vasking av de bundne prøver med 0,5M NaCl (kolonnene 7-8) til en bindingsprofil som lignet profilen av de modifiserte former for Flt1(1-3)-Fc, hvilket tydet på at det umodifiserte protein oppviste en ikke-spesifikk binding til flaket som kunne elimineres ved saltvasking.

Eksempel 7:Binding av umodifisert, acetyliert og pegyliert Flt1(1-3)-Fc i et ELISA-basert assay

Umodifiserte, acetylierte og pegylierte Flt1(1-3)-Fc-proteiner ble testet i et standard ELISA-basert assay for å bedømme deres evne til å binde Flt1-reseptorliganden VEGF. Slik det fremgår fra fig. 4, har både pegylierte og acetylierte Flt1(1-3)-Fc-proteiner evnen til å bindes til VEGF, hvilket demonstrerer at modifikasjon av proteinet enten ved pegylering eller acetylering ikke ødelegger dets evne til å binde dets ligand.

Eksempel 8:Farmakokinetisk analyse av umodifisert Flt1(1-3)-Fc, acetyliert Flt1(1-3)-Fc og pegyliert Flt1(1-3)-Fc

In vivo-eksperimenter ble utviklet for å bedømme den farmakokinetiske profil av umodifisert Flt1(1-3)-Fc, acetyliert Flt1(1-3)-Fc og pegyliert Flt1(1-3)-Fc-protein. Balb/c-mus (23-28 g; 3 mus/gruppe) fikk subkutan injisert 4 mg/kg umodifisert, acetyliert eller pegyliert Flt1(1-3)-Fc. Man tok blodprøver fra musenes haler 1, 2, 4, 6 og 24 timer og 2 dager og 3 dager etter injeksjonen av protein. Seraene ble testet i et standard ELISA-basert assay som var utformet for å påvise Flt1(1-3)-Fc-protein. Kort sagt omfatter assayet å bstryke en ELISA-plate med VEGF, binde serumet som inneholder umodifisert, acetyliert eller pegyliert Flt1(1-3)-Fc, og rapportere med et anti-Fc-antistoff som er bundet til alkalifosfatase. Slik det fremgår fra fig. 5, er T_{maks} -verdien for alle Flt1(1-3)-Fc-proteinene mellom 6-timers og 24-timers tidspunktet. C_{maks} -verdien for de forskjellige proteiner var som følger: umodifisert: 0,05 µg/ml - 0,15 µg/ml; acetyliert: 1,5 µg/ml - 4,0 µg/ml; og pegyliert: ca. 5 µg/ml.

Eksempel 9:Trinnvis acetylering av Flt1(1-3)-Fc

For å bestemme hvilken minimale acetylasjonsgrad som er nødvendig for å eliminere bindingen til ekstracellulære matrikskomponenter, utviklet man et eksperiment som acetylierte Flt1(1-3)-Fc-proteinet trinnvis ved bruk av økende mengder av et molart overskudd av acetyleringsreagensmiddel i acetyleringsreaksjonsblandingen. Området av det molare overskudd var som følger: 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 og 100 mol acetyleringsreagensmiddel pr. 1 mol Flt1(1-3)-Fc-monomer. Omsetningene ble utført slik det beskrives i instruksmanualen som leveres sammen med sulfo-NHS-acetat-modifikasjonssettet (Pierce Chemical Co., Rockford, IL, kat.-nr. 26777).

Eksempel 10:Karakterisering av trinnvis acetyliert Flt1(1-3)-Fc30 (a) IEF-analyse

Umodifisert Flt1(1-3)-Fc og trinnvis acetyliert Flt1(1-3)-Fc-protein ble analysert ved standard IEF-analyse. Slik det fremgår fra fig. 6A-6B, hadde umodifisert Flt1(1-3)-

5 Fc-protein ikke evnen til å migrere inn i gelen på grunn av dets ekstremt høye pI-verdi (over 9,3). Imidlertid hadde de fleste trinnvis acetylerede Flt1(1-3)-Fc-prøver (prøver med 30-100 gangers molart overskudd) evnen til å migrere inn i gelen og ekvilibrere ved en pI-verdi fra 4,55-8,43, avhengig av acetyleringsgraden av proteinet. Dette resultat demonstrerer at en acetylering kan endre den positive ladning av proteinet på doseavhengig måte, og at en reduksjon av pI-verdien kan styres ved å styre acetyleringsgraden.

(b) Binding av trinnvis acetyleret Flt1(1-3)-Fc til ekstracellulære matrikskomponenter

10 For å teste bindingen til ekstracellulære matrikskomponenter, ble Flt1(1-3)-Fc og trinnvis acetyleret Flt1(1-3)-Fc testet i det ovennevnte assay som var blitt utformet til å etterligne vekselvirkningen med ekstracellulære matrikskomponenter. Forskjellige konsentrasjoner av enten umodifisert Flt1(1-3)-Fc, trinnvis acetyleret Flt1(1-3)-Fc (prøver med 10, 20 og 30 gangers molart overskudd) eller rTie2-Fc (et irrelevant kontrollprotein) ble tilsatt til prøvene. Platene ble inkubert i 1-2 timer ved romtemperatur eller 37°C, og deretter ble en påvisning av bundne proteiner oppnådd ved å tilsette et sekundært alkalifosfatase-konjugert anti-humant Fc-antistoff til brønnene. Alkalifosfatase-substrat ble deretter tilsatt til brønnene, og den optiske tetthet ble målt. Fig. 7 viser resultatene av dette assay. Slik som også det irrelevante kontrollprotein rTie2-Fc, oppviste heller ikke trinnvis acetyleret Flt1(1-3)-Fc (prøver med 20 og 30 gangers molart overskudd) noen signifikant binding til den "Matrigel"-bestrøket plate, mens det ikke-acetylerede Flt1(1-3)-Fc-protein oppviste en betraktelig binding. Bindingen er mettbart, hvilket tyder på at Flt1(1-3)-Fc-protein eventuelt bindes til bestemte seter, heller enn til en mer generell ladningsmediert vekselvirkning, som eventuelt ikke er mettbart. Prøven med 10 gangers molart overskudd oppviste en nedsatt binding, men acetyleringsgraden var ikke tilstrekkelig for å fullstendig blokkere bindingen til de ekstracellulære matrikskomponenter. Prøvene med 20 gangers molart overskudd og mer, oppviste ingen påvisbar binding, til tross for at prøvene med de laveste molare overskuddene fortsatt hadde en positiv nettoladning ifølge IEF-analyse (fig. 6A og 6B). Dette resultat demonstrerer at det ikke er nødvendig å fullstendig acetylere alle tilgjengelige basiske aminosyrer for å eliminere bindingen til ekstracellulære matrikskomponenter.

(c) Binding av trinnvis acetyleret Flt1(1-3)-Fc i et "Biacore"-basert assay

Umodifiserte og trinnvis acetylerete Flt1(1-3)-Fc-proteiner ble testet i et "Biacore"-basert assay for å bedømme deres evne til å binde til Flt1-liganden VEGF. I dette assay ble umodifisert Flt1(1-3)-Fc-protein (0,5, 1,0 eller 5,0 µg/ml) immobilisert på overflaten av et "Biacore"-flak (se Biacore-instruksmanualen, Pharmacia, Inc., Piscataway, NJ for standarprosedyrer) og en oppløsning som inneholdt 0,2 µg/ml VEGF og enten umodifisert Flt1(1-3)-Fc (i enten 0,5, 1,0 eller 5,0 µg/ml konsentrasjon) eller 10 forskjellige trinnvis acetylerete Flt1(1-3)-Fc-prøver (hver i 0,5, 1,0 eller 5,0 µg/ml konsentrasjon) ble ført over det Flt1(1-3)-Fc-bestrøkne flak. Slik det fremgår fra fig. 8, finnes det ved et støkiometrisk forhold (0,5 µg/ml umodifisert Flt1(1-3)-Fc eller trinnvis acetyleret Flt1(1-3)-Fc vs. 0,2 µg/ml VEGF) ikke tilstrekkelig Flt1(1-3)-Fc (enten umodifisert eller trinnvis acetyleret) i oppløsningen for å fullstendig binde VEGF'et. I konsentrasjonen 1,0 µg/ml, som omtrent tilsvarer et 1:1 støkiometrisk forhold, har både umodifisert og trinnvis acetyleret Flt1(1-3)-Fc en bedre evne til å konkurrere om VEGF-bindingen, men det foreligger fortsatt ikke tilstrekkelig Flt1(1-3)-Fc-protein (enten umodifisert eller trinnvis acetyleret) til å fullstendig binde det tilgjengelige VEGF. Ved 5,0 µg/ml, som er flere ganger høyere enn et 1:1 støkiometrisk forhold, har imidlertid både Flt1(1-3)-Fc og de trinnvis acetylerete Flt1(1-3)-Fc-proteiner evnen til å binde VEGF'et, uavhengig av acetyleringsgraden. Dette demonstrerer klart at acetyleringen ikke endrer Flt1(1-3)-Fc's evne til å binde VEGF.

(d) Farmakokinetisk analyse av trinnvis acetyleret Flt1(1-3)-Fc

In vivo-eksperimenter ble utviklet for å bedømme den farmakokinetiske profil av umodifisert Flt1(1-3)-Fc og trinnvis acetyleret Flt1(1-3)-Fc-protein. Balb/c-mus (23-28 g) fikk subkutan injisert 4 mg/kg umodifisert Flt1(1-3)-Fc eller prøver av trinnvis acetyleret Flt1(1-3)-Fc med 10, 20, 40, 60 eller 100 gangers molart overskudd (3 mus for umodifisert og prøvene med 10, 20 og 40 gangers molart overskudd, og 2 mus for prøver med 60 og 100 gangers molart overskudd). Man tok blodprøver fra musenes haler 1, 2, 4, 6 og 24 timer og 2 dager og 3 dager etter injeksjonen. Serumene ble analysert i et ELISA-basert assay som var utformet for å påvise Flt1(1-3)-Fc (beskrevet ovenfor). Fig. 9 viser resultatene av denne undersøkelse. T_{maks} -verdien for alle de testede Flt1(1-3)-Fc-proteiner var på 6-timers tidspunktet, men C_{maks} -verdien var som følger: umodifisert Flt1(1-3)-Fc: 0,06 µg/ml; prøve med 10 gangers molart overskudd: 0,7 µg/ml, prøve med 20 gangers molart overskudd: 2 µg/ml, prøve med 40 gangers molart overskudd: 4 µg/ml, prøve med 60 gangers

molart overskudd: 2 µg/ml, prøve med 100 gangers molart overskudd: 1 µg/ml. Disse resultater demonstrerer at en acetylering eller pegylering av Flt1(1-3)-Fc forbedrer dets farmakokinetiske profil vesentlig.

Eksempel 11:

5 Konstruksjon av Flt1(1-3)-Fc-basisk region-delesjonsmutant benevnt Mut1: Flt1(1-3_{AB})-Fc

På grunnlag av observasjonen at acetylering av Flt1(1-3)-Fc, som har en pI-verdi under 6, har meget bedre farmakokinetiske egenskaper enn det høyt positive, umodifisert Flt1(1-3)-Fc (pI >9,3), spurte man seg om forskjellen i farmakokinetikken ikke
10 kunne tilskrives nettoladningen av proteinet, som gjorde at det klebet til negativt ladede ekstracellulære matrikskomponenter, eller om det eventuelt forelå bestemte plasseringer på overflaten av Flt1(1-3)-Fc-protein som utgjorde spesifikke bindings-
seter for ekstracellulære matrikskomponenter. F.eks. er mange proteiner kjent for å ha heparinbindende seter, ofte bestående av en klynge av basiske residuer. Iblant
15 finnes disse residuer i en klynge på den primære sekvens av proteinet; noen publikasjoner har identifisert "konsenssekvenser" for slike heparinbindende seter (se f.eks. Hileman *et al.*, 1998, Bioessays 20 (2): 156-167). I andre tilfeller oppviser den kjente krystallstruktur av et protein en klynge med positivt ladede residuer på
20 overflaten av et protein, men residuene stammer fra forskjellige regioner av den primære sekvens, og bringes kun sammen når proteinet folder seg til sin tertiære struktur. Dermed er det vanskelig å bedømme om et isolert aminosyreresiduum utgjør en del av en klynge av basiske residuer på overflaten av proteinet. Hvis det imidlertid foreligger en klynge av positivt ladede aminosyreresiduer i den primære
25 sekvens, er det ikke urimelig å anta at residuene ligger i et romslig nært forhold til hverandre, og at de derfor kan tenkes å utgjøre en del av et bindingssete for ekstracellulære matrikskomponenter. Flt1-reseptor er blitt grundig undersøkt, og forskjellige domener er blitt beskrevet (se f.eks. Tanaka *et al.*, Jpn. J. Cancer Res 88: 867-876). Idet det vises til nukleinsyre- og aminosyresekvensen som vises på fig. 10A-10D i foreliggende søknad, kan man identifisere signalsekvensen for utsondering, som er plassert i starten av sekvensen og strekker seg til glycinet som kodes
30 for av nukleotidene 76-78. Det modne protein starter med Ser-Lys-Leu-Lys, begynnende ved nukleotid 79 av nukleinsyresekvensen. Flt1-Ig-domene 1 strekker seg fra nukleotid 79 til 393 og slutter med aminosyrene Ser-Asp-Thr. Flt1-Ig-domene 2 strekker seg fra nukleotid 394 til 687 (som koder for Gly-Arg-Pro til Asn-Thr-Ile),
35 og Flt1-Ig-domene 3 strekker seg fra nukleotidene 688 til 996 (som koder for Ile-Asp-Val til Asp-Lys-Ala). Det foreligger en brodannende aminosyresekvens, Gly-

Pro-Gly, som kodes for av nukleotidene 997-1005, fulgt av nukleotidsekvensen som koder for humant Fc (nukleotidene 1006-1701 eller aminosyrene Glu-Pro-Lys til Pro-Gly-Lys-stop).

En mer detaljert analyse av Flt1-aminosyresekvensen viser at det foreligger en klynge, nemlig aminosyrene 272-281 (KNKRASVRR) i SEQ ID NO. 1, hvor 6 av 10 aminosyreresiduer er basiske. Denne sekvens er plassert i Flt1-Ig-domene 3 av reseptoren (se fig. 10), som i og for seg ikke er nødvendig for bindingen av VEGF-ligand, men som formidler en høyere affinitet for bindingen til liganden. En linjestilling av sekvensen av Ig-domene 3 med sekvensen av Ig-domene 2 viser at i dette parti, er det en meget dårlig overensstemmelse mellom de to Ig-domener, og at det foreligger ca. 10 tilleggsaminosyrer i Ig-domene 3. En analyse av hydrofilisitetprofilene (MacVector-programvare) av disse to domener viser tydelig et nærvær av et hydrofilt område i proteinet (fig. 11A-11B). Disse observasjoner førte til spørsmålet om det var mulig at den faktiske tredimensjonale konformasjon av Flt1-Ig-domene 3 muliggjorde en type utstikker som ikke foreligger i Flt1-Ig-domene 2. For å teste denne hypotese ble de 10 tilleggsaminosyrene fjernet, og det dannede protein ble testet for å se om delesjonen ville påvirke farmakokinetikken på gunstig måte uten å alvorlig kompromittere affiniteten av reseptoren for VEGF. Dette DNA-konstrukt, som ble konstruert ved bruk av standard molekylærbiologiske teknikker (se f.eks. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (Sambrook *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory), *Current Protocols in Molecular Biology* (utg. Ausubel *et al.*, Greene Publ. Assoc., Wiley-Interscience, NY)) i pattedyr-ekspresjonsvektoren pMT21 (Genetics Institute, Inc., Cambridge, MA) benevnes Mut1: Flt1(1-3_{ΔB})-Fc. Mut1: Flt1(1-3_{ΔB})-Fc-konstruktet ble avledet fra Flt1(1-3)-Fc ved delesjon av nukleotidene 814-843 (vist i SEQ ID NO. 1), som fjerner den høyt basiske 10-aminosyreresiduers sekvens Lys-Asn-Lys-Arg-Ala-Ser-Val-Arg-Arg-Arg fra Flt1-Ig-domene 3.

Det endelige DNA-konstrukt ble sekvensverifisert ved bruk av en ABI 373A-DNA-sekvensierer og Taq-dideoksy-terminatorsyklus-sekvensieringssettet (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA). Sekvensen av Mut1: Flt1(1-3_{ΔB})-Fc vises i SEQ ID NO. 2.

Eksempel 12:Konstruksjon av Flt1(1-3)-Fc-basisk region-delesjonsmutanten benevnt Mut2: Flt1(2-3_{ΔB})-Fc

Et andre delesjonsmutant-konstrukt, benevnt Mut2: Flt1(2-3_{ΔB})-Fc, ble avledet fra
 5 Mut1: Flt1(1-3_{ΔB})-Fc-konstruktet ved delesjon av Flt1-Ig-domene 1 som kodes for
 av nukleotidene 79-393 (se SEQ ID NO. 1); for enkelthetens skyld ble nukleotidene
 73-78 (TAC GGT) endret til TCC GGA. Dette innførte et restriksjonssete (BspE1)
 uten å endre den forbundne aminosyresekvens, Ser-Gly. Dette DNA-konstrukt, som
 ble konstruert ved bruk av standard molekylærbiologiske teknikker (se f.eks. Mole-
 10 cular Cloning, A Laboratory Manual (Sambrook *et al.*, Cold Spring Harbor Laborato-
 ry), Current Protocols in Molecular Biology (utg. Ausubel *et al.*, Greene Publ. Assoc.,
 Wiley-Interscience, NY)) i pattedyr-ekspresjonsvektoren pMT21 (Genetics Institute,
 Inc., Cambridge, MA) og ble også sekvensverifisert ved bruk av en ABI 373A-DNA-
 sekvensierer og Taq-dideoksy-terminatorsyklus-sekvensieringssettet (Applied Bio-
 15 systems, Inc., Foster City, CA). Sekvensen av Mut2: Flt1(2-3_{ΔB})-Fc vises på SEQ ID
 NO. 3.

Eksempel 13:Konstruksjon av Flt1(1-3)-Fc-delesjonsmutanten benevnt Mut3: Flt1(2-3)-Fc

Et tredje delesjonsmutantkonstrukt, benevnt Mut3: Flt1(2-3)-Fc, ble konstruert på
 20 samme måte som Mut2: Flt1(2-3_{ΔB})-Fc-konstruktet, unntatt at man lot Flt1-Ig-
 domene 3 være intakt (basisk region-aminosyrene ble ikke fjernet). Konstruktet ble
 konstruert ved bruk av standard molekylærbiologiske teknikker, og sluttkonstruktet
 ble sekvensverifisert som beskrevet ovenfor. Sekvensen av Mut3: Flt1(2-3)-Fc vi-
 ses i SEQ ID NO. 4.

Eksempel 14:Konstruksjon av Flt1(1-3)-Fc-basisk region-N-glykosylasjonsmutanten benevnt Mut4: Flt1(1-3_{R→N})-Fc

Et siste konstrukt ble fremstilt, hvor et N-glykosylasjonssete ble innført i midten av
 den basiske region av Flt1-Ig-domene 3. Dette konstrukt ble benevnt Mut4:
 30 Flt1(1-3_{R→N})-Fc, og ble fremstilt ved å endre nukleotidene 824-825 fra GA til AC, og
 dermed å endre det kodede Arg-residuum (AGA) til et Asn-residuum (AAC) (se SEQ
 ID NO. 1). Den dannede aminosyresekvens endres dermed fra Arg-Ala-Ser til Asn-
 Ala-Ser, hvilket passer til det kanoniske signal (Asn-Xxx-Ser/Thr) for tilføyelse av

et N-glykosylasjonssete ved Asn-residuet. Sekvensen av Mut4: Flt1(1-3_{R→N})-Fc vises i SEQ ID NO. 5.

Eksempel 15:

Karakterisering av acetyleret Flt1(1-3)-Fc, Mut1: Flt1(1-3_{ΔB})-Fc- og Mut4:

Flt1(1-3_{R→N})-Fc-mutanter

(a) Binding til ekstracellulære matrikskomponenter

For å bestemme om de tre modifiserte proteiner var mer eller mindre sannsynlige til å ha forbedrede farmakokinetiske egenskaper, ble "Matrigel"-bestrøkne 96-brønners skåler (som beskrevet ovenfor) inkubert med forskjellige konsentrasjoner av mutantproteinene og påvist med anti-humant Fc/alkalifosfatase-konjugerte anti-stoffer. Slik det fremgår fra fig. 13, viste dette eksperiment at selv om det umodifiserte Flt1(1-3)-Fc-protein kunne bindes sterkt til disse brønner, ble Mut3: Flt1(2-3)-Fc-protein bundet noe svakere, Mut1: Flt1(1-3_{ΔB})-Fc-protein ble bundet enda svakere, og Mut2: Flt1(2-3_{ΔB})-Fc-protein oppviste den beste profil i det det ble svakere bundet enn noe annet av de mutante proteiner. Mut4: Flt1(1-3_{R→N})-Fc-glykosylasjonsmutantprotein oppviste kun en marginell forbedring på "Matrigel"-assayet. Disse resultater bekrefter hypotesen om at en lineær sekvens av positive aminosyrer kan fjernes fra den primære sekvens, hvilket vil føre til en nedsatt ladningsvekselvirkning med ekstracellulære matrikskomponenter.

(b) Binding av Mut1: Flt1(1-3_{ΔB})-Fc og Mut4: Flt1(1-3_{R→N})-Fc i et "Biacore"-basert assay

Umodifisert og acetyleret Flt1(1-3)-Fc og genetisk modifisert Mut1: Flt1(1-3_{ΔB})-Fc og Mut4: Flt1(1-3_{R→N})-Fc-protein ble testet i et "Biacore"-basert assay for å bedømme deres evne til å bindes til Flt1-liganden VEGF. I dette assay ble umodifisert Flt1(1-3)-Fc-protein (0,25, 0,5 eller 1,0 µg/ml) immobilisert på overflaten av et "Biacore"-flak (se Biacore-instruksmanualen, Pharmacia, Inc., Piscataway, NJ, for standardprosedyrer) og en oppløsning som inneholdt 0,1 µg/ml VEGF og enten rensset eller COS-celle-supernatant som inneholdt umodifisert Flt1(1-3)-Fc (i ca. 0,25, 0,5 eller 1,0 µg/ml konsentrasjon), rensset acetyleret Flt1(1-3)-Fc (i konsentrasjonen 0,25, 0,5 eller 1,0 µg/ml), COS-cellesupernatant som inneholdt Mut1: Flt1(1-3_{ΔB})-Fc (i ca. 0,25, 0,5 eller 1,0 µg/ml konsentrasjon) eller COS-cellesupernatant som inneholdt Mut4: Flt1(1-3_{R→N})-Fc (i ca. 0,25, 0,5 eller 1,0 µg/ml konsentrasjon), ble ført over det Flt1(1-3)-Fc-bestrøkne flak. Slik det fremgår fra fig. 12, foreligger det

ved det substøkiometriske forhold (0,25 µg/ml Flt1(1-3)-Fc fra umodifiserte, acetyler-
 lerte eller genetisk modifiserte prøver mot 0,1 µg/ml VEGF) ikke tilstrekkelig
 Flt1(1-3)-Fc-protein til å blokkere bindingen av VEGF til Flt1(1-3)-Fc'et som var
 immobilisert på "Biacore"-flaket. Ved 0,5 µg/ml umodifisert, acetyler- eller genetisk
 5 modifisert Flt1(1-3)-Fc-protein, er det støkiometriske forhold ca. 1:1, og det fore-
 ligger en forsterket evne til å blokkere VEGF-bindingen til "Biacore"-flaket. Ved 1,0
 µg/ml umodifisert, acetyler- eller genetisk modifisert Flt1(1-3)-Fc-protein, som er
 et ca. 10:1 støkiometrisk forhold, har Flt1(1-3)-Fc-proteinene evnen til å blokkere
 bindingen av VEGF til "Biacore"-flaket, men de er ikke like gode. Umofisert, ace-
 10 tylert og Mut1: Flt1(1-3_{AB})-Fc er i det vesentlige like gode i sin evne til å blokkere
 VEGF-bindingen, mens Mut4: Flt1(1-3_{R→N})-Fc er noe mindre virksam på å blokkere
 bindingen. Disse resultater bekrefter hypotesen om at det er mulig å redusere den
 ikke-spesifikke binding av et positivt ladet molekyll ved å genetisk fjerne en lineær
 sekvens av overveiende negativt ladede aminosyrer.

15 (c) Binding av Mut1: Flt1(1-3_{AB})-Fc, Mut2: Flt1(2-3_{AB})-Fc og Mut3: Flt1(2-3)-Fc i
 et ELISA-basert assay

For å bestemme om de tre mutante proteiner kunne binde Flt1-liganden VEGF, ut-
 førte man bindingseksperimenter hvor 96-brønners plater som var bestrøket med
 VEGF, ble inkubert med forskjellige konsentrasjoner av det aktuelle mutante pro-
 20 tein, og etter vasking, ble mengden av bundet protein påvist ved inkubasjon med
 et alkalifosfatase-konjugert anti-humant Fc-antistoff og kvantifisert kolorimetrisk
 ved tilsetning av et egnet alkalifosfatase-substrat. Slik det fremgår fra fig. 14, viste
 dette eksperiment at alle de mutante proteiner kunne binde VEGF på lignende måte
 ved de testede konsentrasjoner.

25 Eksempel 16:

Farmakokinetisk analyse av acetyler- Flt1(1-3)-Fc, Mut1: Flt1(1-3_{AB})-Fc og umodifi-
 sert Flt1(1-3)-Fc

In vivo-eksperimenter ble utviklet for å bedømme den farmakokinetiske profil av
 umodifisert Flt1(1-3)-Fc, Mut1: Flt1(1-3_{AB})-Fc og Flt1(1-3)-Fc-protein som var ace-
 30 tylert med et 40 gangers molart overskudd. Balb/c-mus (25-30 g) fikk subkutan-
 injisert 4 mg/kg umodifisert Flt1(1-3)-Fc, 40 gangers molart overskudd-acetyler-
 Flt1(1-3)-Fc eller Mut1: Flt1(1-3_{AB})-Fc (4 mus hver). Man tok blodprøver fra disse
 musene 1, 2, 4, 6 og 24 timer og 2 dager, 3 dager og 5 dager etter injeksjonen.
 Seraene ble testet i et ELISA-assay som var utformet til å påvise Flt1(1-3)-Fc-

protein, hvilket omfattet å bestryke en ELISA-plate med VEGF, binde Flt1(1-3)-Fc og rapportere med et anti-Fc-antistoff bundet til alkalifosfatase. Slik det fremgår fra fig. 15, var C_{maks} -verdien for disse reagensmidler som følger: umodifisert Flt1(1-3)-Fc: 0,15 µg/ml; 40 gangers molart overskudd-acetyliert Flt1(1-3)-Fc: 1,5 µg/ml og Mut1: Flt1(1-3_{ΔB})-Fc: 0,7 µg/ml.

Eksempel 17:

Modifisert Flt1-reseptorvektor-konstruksjon

Tanken bak å konstruere modifiserte versjoner av Flt1-reseptor (også kjent som VEGFR1) grunnet seg på observasjonen at proteinsekvensen av Flt1 var meget basisk, og dermed sannsynligvis ville klebe til den ekstracellulære matriks (ECM). Den sterkt basiske natur av Flt1 forklarer sannsynligvis hvorfor umodifisert Flt1(1-3)-Fc (beskrevet ovenfor) har dårlige farmakokinetiske egenskaper som gjør det vanskelig å bruke som terapeutisk middel. Slik det ble beskrevet ovenfor, oppviste den kjemisk modifiserte form for 40 gangers molart overskudd-acetyliert Flt1(1-3)-Fc, heretter benevnt A40, en sterkt forbedret farmakokinetisk (PK) profil sammenlignet med det ikke-acetylierte Flt1(1-3)-Fc. Derfor gjorde man forsøk på å konstruere DNA-molekyler som kunne brukes til å rekombinant uttrykke modifiserte former for et Flt1-reseptormolekyl som ville ha den forbedrede PK-profil som oppvises av A40, og fortsatt beholde sin evne til å bindes sterkt til VEGF.

Det er kjent i litteraturen at den første Ig-domene av Flt1 (som har en nettoladning på +5 ved nøytral pH) ikke er vesentlig for en sterk binding til VEGF, og derfor ble dette domene fjernet. Det tredje Ig-domene (som har en nettoladning på +11) er ikke nødvendig for bindingen, men formidler en høyere affinitet for VEGF enn den andre Ig-domene, og istedenfor å fjerne denne fullstendig, ble den derfor erstattet med de likeverdige domener av Flt1-reseptor-slektningene Flk1 (også kjent som VEGFR2) og Flt4 (også kjent som VEGFR3). Disse kimære molekyler (benevnt henholdsvis R1R2 (Flt1.D2.FlklD3.FcΔC1(a) og VEGFR1R2-FcΔC1(a) og R1R3 (Flt1D2.VEGFR3D3.FcΔC1(a) og VEGFR1R3-FcΔC1(a), hvor R1 og Flt1D2 = Ig-domene 2 av Flt1 (VEGFR1); R2 og FlklD3 = Ig-domene 3 av Flk1 (VEGFR2) og R3 og VEGFR3D3 = Ig-domene 3 av Flt4 (VEGFR3)) klebet meget mindre til ECM, bedømt ifølge et *in vitro*-ECM-bindingsassay som skal beskrives i det følgende, og hadde en meget bedre PK, slik det skal beskrives i det følgende. I tillegg hadde disse molekylene evnen til å binde VEGF sterkt slik det skal beskrives i det følgende, og å blokkere fosforylasjonen av nativ Flk1-reseptor som uttrykkes i endotelceller, slik det skal beskrives i det følgende.

(a) Konstruksjon av ekspresjonsplasmidet pFlt1D2.Flk1D3.Fc Δ C1(a)

Ekspresjonsplasmidene pMT21.Flt1(1-3).Fc (6519 bp) og pMT21.Flk-1(1-3).Fc (5230 bp) er plasmider som koder for ampicillinresistens og Fc-merkede versjoner av Ig-domenene 1-3 av henholdsvis humant Flt1 og humant Flk1. Disse plasmider ble brukt til å konstruere et DNA-fragment som bestod av en fusjon av Ig-domene 2 av Flt1 med Ig-domene 3 av Flk1, ved bruk av PCR-amplifikasjon av den tilsvarende Ig-domene fulgt av ytterligere runder med PCR for å oppnå en fusjon av de to domener i ett enkelt fragment. For Ig-domene 2 av Flt1, var 5'- og 3'-amplifikasjonsprimerne som følger:

5': bsp/flt1D2 (5'-GACTAGCAGTCCGGAGGTAGACCTTTCGTAGAGATG-3')

3': Flt1D2-Flk1D3.as (5'-CGGACTCAGAACCACATCTATGATTGTATTGGT-3')

5'-amplifikasjonsprimeren koder for et BspE1-restriksjonsenzymsete oppstrøms for Ig-domene 2 av FFlt1(1-3)-Fc, definert ved aminosyresekvensen GRPFVEM (tilsvarende aminosyrene 27-33 på fig. 21A-21C). 3'-primeren koder for det reverse komplement av 3'-ende av Flt1-Ig-domene 2 kondensert direkte til 5'-starten av Flk1-Ig-domene 3, med fusjonspunktet definert som TIID av Flt1 (tilsvarende aminosyrene 123-126 i SEQ ID NO. 6) og fortsettende til VVLS (tilsvarende aminosyrene 127-130 i SEQ ID NO. 6) av Flk1.

For Ig-domene av Flk1, var 5'- og 3'-amplifikasjonsprimerne som følger:

5': Flt1D2-Flk1D3.s (5'-ACAATCATAGATGTGGTTCTGAGTCCGTCTCATGG-3')

3': Flk1D3/apa/srf.as (5'-GATAATGCCCGGGCCCTTTTCATGGACCCTGACAAATG-3')

5'-amplifikasjonsprimeren koder for enden av Flt1-Ig-domene 2 kondensert direkte til starten av Flk1-Ig-domene 3, som beskrevet ovenfor. 3'-amplifikasjonsprimeren koder for enden av Flk1-Ig-domene 3, definert ved aminosyrene VRVHEK (tilsvarende aminosyrene 223-228 i SEQ ID NO. 6), fulgt av en brodannende sekvens som omfatter en gjenkjenningssekvens for restriksjonsenzymet Srf1, og koder for aminosyrene GPG. Den brodannende sekvens tilsvarende aminosyrene 229-231 i SEQ ID NO. 6.

Etter en runde med PCR-amplifikasjon for å danne de enkelte domener, ble produktene kombinert i et rør og underkastet en ytterligere runde med pcr med primerne bsp/flt1D2 og flk1D3/apa/srf.as (beskrevet ovenfor) for å danne fusjonsproduktet. Dette PCR-produkt ble deretter spaltet med restriksjonsenzymene BspEI og SmaI, og det dannede 614 bp lange fragment ble delklonet inn i BspEI- til SrfI-restriksjonssetene av vektoren pMT21/ Δ B2.Fc for å danne plasmidet pMT21/Flt1D2.Flk1D3.Fc. Nukleotidsekvensen av Flt1D2-Flk1D3-genfusjonsinnføyelsen ble verifisert ved standard sekvensanalyse. Dette plasmid ble deretter spaltet med restriksjonsenzymene EcoRI og SrfI, og det dannede 702 bp lange fragment ble overført til EcoRI- til SrfI-restriksjonssetene av plasmidet pFlt1(1-3)B2-Fc Δ C1(a) for å danne plasmidet pFlt1D2.Flk1D3.Fc Δ C1(a). Den fullstendige DNA- og avledede aminosyresekvens av det kimære Flt1D2.Flk1D3.Fc Δ C1(a)-molekyl vises på fig. 21A-21C.

(b) Konstruksjon av ekspresjonsplasmidet pFlt1D2VEGFR3D3Fc Δ C1(a)

Ekspresjonsplasmidet pMT21.Flt1(1-3).Fc (6519 bp) koder for ampicillinresistens og en Fc-merket versjon av Ig-domenene 1-3 av human Flt1-reseptor. Dette plasmid ble brukt til å danne et DNA-fragment som inneholdt Ig-domene 2 av Flt1 ved PCR. RNA fra cellelinjen HEL921.7 ble brukt for å danne Ig-domene 3 av Flk1 ved bruk av standard RT-PCR-metoder. En ytterligere rundet med PCR-amplifikasjon ble brukt til å oppnå en fusjon av de to Ig-domener til ett enkelt kondensert fragment. For Ig-domene 2 av Flt1 var 5'- og 3'-amplifikasjonsprimerne som følger:

5': bsp/flt1D2 (5'-GACTAGCAGTCCGGAGGTAGACCTTTCGTAGAGATG-3')

3': Flt1D2.VEGFR3D3.as (TTCCTGGGCAACAGCTGGATATCTATGATTGTATTGGT)

5'-amplifikasjonsprimeren koder for et BspE1-restriksjonssete oppstrøms for Ig-domene 2 av Flt1, definert ved aminosyresekvensen GRPFVEM (tilsvarende aminosyrene 27-33 på fig. 22A-22C). 3'-Amplifikasjonsprimeren koder for reverskomplementet av enden av Flt1-Ig-domene 2 kondensert direkte til starten av VEGFR3-Ig-domene 3, hvor fusjonspunktet er definert som TIID av Flt1 (tilsvarende aminosyrene 123-126 på fig. 22A-22C) og fortsettende til IQLL av VEGFR3 (tilsvarende aminosyrene 127-130 i SEQ ID NO. 7).

For Ig-domene 3 av VEGFR3, var 5'- og 3'-primerne som ble brukt for RT-PCR, som følger:

5': R3D3.s (ATCCAGCTGTTGCCAGGAAGTCGCTGGAGCTGCTGGTA)

3': R3D3.as (ATTTTCATGCACAATGACCTCGGTGCTCTCCCGAAATCG)

Både 5'- og 3'-amplifikasjonsprimerne tilvarer sekvensen av VEGFR3. Det 296 bp lange amplifikasjonsprodukt av denne RT-PCR-reaksjon ble isolert ved standardteknikker og underkastet en andre runde av PCR for å tilføye egnede sekvenser for å tillate en fusjon av Flt1D2- med Flk1D3-domene og fusjon av Flk1D3- og Fc-domene via en GPG-bro (se nedenfor). Amplifikasjonsprimerne var som følger:

5': Flt1D2.VEGFR3D3.s (TCATAGATATCCAGCTGTTGCCAGGAAGTCGCTGGAG)

3': VEGFR3D3/srf.as (GATAATGCCCGGGCCATTTTCATGCACAATGACCTCGGT)

5'-amplifikasjonsprimeren koder for 3'-ende av Flt1-Ig-domene 2 kondensert direkte til starten (5'-ende) av VEGFR3-Ig-domene 3, slik det ble beskrevet ovenfor. 3'-amplifikasjonsprimeren koder for 3'-ende av VEGFR3-Ig-domene 3, definert ved aminosyrene VIVHEN (tilsvarende aminosyrene 221-226 på fig. 22A-22C), fulgt av en brodannende sekvens som omfatter en gjenkjenningssekvens for Srf1 og som koder for aminosyrene GPG. Den brodannende sekvens tilsvarende aminosyrene 227-229 i SEQ ID NO. 7.

Etter én runde (for Flt1-Ig-domene 2) eller to runder (for Flt4-Ig-domene 3) av PCR for å danne de enkelte Ig-domener, ble PCR-produktene kombinert i et rør og underkastet en ytterligere runde med PCR-amplifikasjon med amplifikasjonsprimerne bsp/flt1D2 og VEGFR3D3/srf.as som ble beskrevet ovenfor, for å danne fusjonsproduktet. Dette PCR-produkt ble deretter spaltet med restriksjonsenzymene BspEI og SmaI, og det dannede 625 bp lange fragment ble delklonet inn i BspEI- til SrfI-restriksjonssetene av vektoren pMT21/Flt1ΔB2.Fc (beskrevet ovenfor) for å danne plasmidet pMT21/Flt1D2.VEGFR3D3.Fc. Sekvensen av Flt1D2-VEGFR3D3-genfusjons-innføyselen ble verifisert ved standard sekvensanalyse. Dette plasmid ble deretter spaltet med restriksjonsenzymene EcoRI og SrfI, og det dannede 693 bp lange fragment ble delklonet inn i EcoRI- til SrfI-restriksjonssetene av plasmidet pFlt1(1-3)ΔB2-FcΔC1(a) for å danne plasmidet som benevnes pFlt1D2.VEGFR3D3.FcΔC1(a). Den fullstendige DNA og avledede aminosyresekvens av det kimære Flt1D2.VEGFR3D3.FcΔC1(a)-molekyl vises i SEQ ID NO. 7.

Eksempel 18:Ekstracellulær matriks (ECM)-bindingsassay

ECM-bestrøkne plater (Becton Dickinson, katalognr. 35-4607) ble rehydrert med varmt DME supplementert med glutamin (2 mM), 100 U penicillin, 100 U streptomycin og 10% BCS i minst 1 time før prøvene ble tilsatt. Platene ble deretter inkubert i 1 time ved romtemperatur med forskjellige konsentrasjoner av Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) og Flt1D2.VEGFR3D3.FcΔC1(a) startende med 10 nM og med påfølgende 2 gangers fortyndinger i PBS plus 10% BCS. Platene ble deretter vasket 3 ganger med PBS plus 0,1% Triton-X og inkubert med alkalifosfatase-konjugert anti-humant Fc-antistoff (Promega, 1:4000 i PBS plus 10% BCS) i 1 time ved romtemperatur. Platene ble deretter vasket 4 ganger med PBS 0,1% Triton-X, og alkalifosfatasebuffer/pNPP-oppløsning (Sigma) ble tilsatt for fargeutvikling. Platene ble avlest ved $\lambda = 405-570$ nm. Resultatene av dette eksperiment vises på fig. 23, og demonstrerer at Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a)- og Flt1D2.VEGFR3D3.FcΔC1(a)-protein kleber betydelig mindre til ECM sammenlignet med Flt1(1-3)-Fc-protein.

Eksempel 19:Forbigående ekspresjon av pFLT1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) i CHO-K1 (E1A)-celler

En kultur i stor skala (2 l) av *E. coli*-DH10B-celler som bar det ovenfor beskrevne pFlt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a)-plasmid som ble beskrevet ovenfor i eksempel 17(a), ble dyrket over natten i "Terrific Broth" (TB)-kraft plus 100 µg/ml ampicillin. Den følgende dag ble plasmid-DNA'et ekstrahert ved bruk av "QIAGEN Endofree Mega-prep"-settet idet man fulgte produsentens protokoll. Konsentrasjonen av rensed plasmid-DNA ble bestemt ved standardteknikker ved bruk av et UV-spektrofotometer og et fluorimeter. Plasmid-DNA'et ble verifisert ved standard restriksjonsenzymspaltningsanalyse av alikvoter ved bruk av restriksjonsenzymene EcoRI plus NotI og AseI. Alle restriksjonsenzym-spaltningsfragmentene tilsvarte den forutsagte størrelse ifølge analyse på en 1% agarosegel.

15 cm Petri-skåler (40 stykker) ble podet med CHO-K1/E1A-celler i en tetthet på 4×10^6 celler/plate. Platemediet var Gibco Ham's F-12 supplementert med 10% "Hyclone" føtalt bovint serum (FBS), 100 U penicillin/100 U streptomycin og glutamin (2 mM). Den følgende dag ble hver plate med celler transfisert med 6 µg pFlt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a)-plasmid-DNA ved bruk av "Optimem" fra Gibco og "Lipofectamine" fra Gibco i 12 ml volum, idet man fulgte produsentens protokoll. Fire timer etter at transfeksjonsblandingen var blitt tilsatt til cellene, ble 12 ml/plate

"Optimem" supplementert med 10% FBS tilsatt. Platene ble inkubert ved 37°C i en 5% CO₂-inkubator over natten. Den følgende dag ble mediene fjernet fra hver plate, og 25 ml ekspresjonsmedium (Gibco CHO-S-SFM II supplementert med glutamin (2 mM) og 1 mM natriumbutytrat) ble tilsatt. Platene ble inkubert ved 37°C i 3 dager. Etter 3 dagers inkubasjon, ble mediet sugd bort fra hver plate og sentrifugert ved 400 rpm i en rotor med dreierende bøtte for å pelletere cellene. Supernatanten ble dekantert inn i sterile 1 l-kolber, og rensing av det uttrykte protein ble utført slik det ble beskrevet ovenfor.

Eksempel 20:

10 Konstruksjon av pVEGFR1R2-FcΔC1(a)-ekspresjonsvektor

pVEGFR1R2-FcΔC1(a)-ekspresjonsplasmidet ble konstruert ved innføyelse av DNA som kodet for aminosyrene SDT (tilsvarende aminosyrene 27-29 i SEQ ID NO. 8) mellom Flt1d2-Flk1d3-FcΔC1(a)-aminosyrene 26 og 27 i SEQ ID NO. 6 (GG) og fjerning av DNA som kodet for aminosyrene GPG tilsvarende aminosyrene 229-231 på figuren. SDT-aminosyresekvensen er nativ for Flt1-reseptor, og ble ført tilbake for å nedsette sannsynligheten for en heterogen N-terminal prosessering. GPG (den brodannende sekvens) ble fjernet, slik at Flt1- og Flk1-Ig-domenene var kondensert direkte til hverandre. Den fullstendige DNA- og avledede aminosyresekvens av det kimære pVEGFR1R2-FcΔC1(a)-molekyl vises på fig. 24A-24C.

20 Eksempel 21:

Cellekulturprosess brukt til å danne modifiserte Flt1-reseptorer

(a) Cellekulturprosess bruk til å danne Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a)

Proessen for å danne Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a)-protein ved bruk av ekspresjonsplasmidet pFlt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) som ble beskrevet ovenfor i eksempel 1, omfatter en suspensjonskultur av rekombinante kinesisk hamster-ovarier (CHO K1/E1A)-celler som konstitutivt uttrykker proteinproduktet. Cellene dyrkes i bioreaktorer, og proteinproduktet isoleres og renses ved affinitets- og størrelsesseksklusjonskromatografi. Prosessen skal beskrives i større detalj i det følgende.

Celleekspansjon

30 To konfluente T-225 cm²-kolber som inneholdt den Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a)-uttrykkende cellelinje, ble ekspandert ved å føre cellene til åtte T-225 cm²-kolber i

medium (GMEM + 10% serum, GIBCO) og å inkubere dem ved 37°C og 5% CO₂. Når kolbene nærmet seg konfluens (ca. 3-4 dager), ble cellene løst ved bruk av trypsin. Ferskt medium ble tilsatt for å beskytte cellene for ytterligere utsettelse for trypsinet. Cellene ble sentrifugert og resuspendert i ferskt medium og deretter
 5 overført til åtte 850 cm²-rullekolber og inkubert ved 37°C og 5% CO₂ inntil de var konfluente.

Suspensjonskultur i bioreaktorer

Celler dyrket i rullekolber ble trypsinisert for å løsne dem fra overflaten, og vasket med suspensjonskulturmedium. Cellene ble aseptisk overført til en 5 l bioreaktor
 10 (New Brunswick Celligen Plus), hvor cellene ble dyrket i 3,5 l suspensjonskultur. Suspensjonskulturmediet var en glutamin-fri lavt glukoseholdig modifikasjon av IS-CHO (Irvine Scientific) til hvilket man hadde tilsatt 5% føtalt bovint serum (Hyclone), GS-supplement (Life Technologies) og 25 µM metioninsulfoksimin (Sigma). pH ble regulert til 7,2 ved tilsetning av kuldiksid til innstrømningsgassen,
 15 eller ved tilsetning av en flytende oppløsning av natriumkarbonat til bioreaktoren. Nivået av oppløst oksygen ble holdt ved 30% av metningspunktet ved tilsetning av oksygen eller nitrogen til innløpsgassen, og temperaturen ble holdt ved 37°C. Når en tetthet på 4×10^6 celler/ml var blitt oppnådd, ble cellene overført til en 40 l-bioreaktor som inneholdt det samme medium, og de samme justeringer for å styre
 20 bioreaktoren. Temperaturjusteringen ble senket til 34°C for å senke celleveksten og heve den relative rate av proteinekspressjon.

(b) Cellekulturprosess brukt til å produsere Flt1D2.VEGFR3D3.FcΔC1(a)

Den samme metode som ble beskrevet ovenfor for Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a), ble brukt for å produsere Flt1D2.VEGFR3D3.FcΔC1(a).

25 Eksempel 22:

Samling og rensing av modifiserte Flt1-reseptorer

(a) Samling og rensing av Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a)

Produktproteinet ble aseptisk samlet fra bioreaktoren mens cellene ble igjen, ved bruk av Millipore Prostak tangsialstrømnings-filtrasjonsmoduler og en mekanisk
 30 pumpe med lavt skjær (Fristam). Ferskt medium ble tilsatt til bioreaktoren for å erstatte hva som var blitt fjernet under innsamlingsfiltreringen. Ca. 40 l samlings-

filtrat ble deretter fylt på en 400 ml-kolonne som inneholdt Protein A-Sepharose-harpiks (Amersham Pharmacia). Etter påfyllingen ble harpiksen vasket med buffer som inneholdt 10 mM natriumfosfat, 500 mM natriumklorid, pH 7,2, for å fjerne eventuelt foreliggende, ubundne, forurensende proteiner. Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a)-protein ble eluert med en pH 3,0-citratbuffer. Det eluerte protein ble nøytralisert ved tilsetning av Tris-base og frosset ved -20°C.

Flere frosne batcher av Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a)-protein fra Protein A-trinnet ovenfor ble tint, samlet og konsentrert ved bruk av en 30 kD nominal molekylvekt-avskjæring (NMWCO) tangensialstrømnings-filtrasjonsmembran fra Millipore. Protein ble overført til en omrørt cellekonsentrator (Millipore) og ytterligere konsentrert til 30 mg/ml ved bruk av en 30 kD NMWCO-membran. Det konsentrerte protein ble fylt på en størrelseseksklusjonskolonne som var pakket med Superdex 200-harpiks (Amersham Pharmacia) som var ekvilibrert med fosfatbufret salin plus 5% glycerol. Den samme buffer ble brukt for å skylle kolonnen. Fraksjonene som tilsvarte Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a)-dimer, ble samlet, sterilfiltrert gjennom et 0,22 mikron-filter, alikvotert og frosset.

(b) Innsamling og rensing av Flt1D2.VEGFR3D3.FcΔC1(a)

De samme metoder som ble beskrevet ovenfor for Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a), ble brukt for å samle og rense Flt1D2.VEGFR3D3.FcΔC1(a).

20 Eksempel 23:

Fosforylasjonsassay for forbigående uttrykt VEGFR2

Primære humane navlestrengvene-endotelceller (HUVEC'er), passasje 4-6, ble holdt uten næring i 2 timer i serumfritt DME-høyt glukoseholdig medium. Prøver som inneholdt 40 ng/ml (1 nM) humant VEGF165, som er en ligand for VEGF-reseptorene Flt1, Flk1 og Flt4 (VEGFR3), ble preparert og forhåndsinkubert i 1 time ved romtemperatur med forskjellige mengder av de modifiserte Flt1-reseptorer Flt1(1-3)-Fc, Flt1(1-3)-Fc (A40), Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a) og Flt1D2VEGFR3D3.FcΔC1(a) i serumfritt DME-høyt glukoseholdig medium som inneholdt 0,1% BSA. Cellene ble behandlet i 5 minutter med de ovenfor preparerte prøver med eller uten VEGF165, fulgt av helcellelysis ved bruk av fullstendig lysisbuffer. Cellelysaten ble immunofelt med et antistoff rettet mot C-terminus av VEGFR2-reseptor. De immunofelte lysater ble plassert på 4-12% SDS-Page-"Novex"-gel og deretter overført på PVDF-membran ved bruk av standard over-

føringsmetoder. Påvisningen av fosforylert VEGFR2 ble utført ved immunoblotting med anti-fosfo-tyrosin-mAb'et som benevnes 4G10 (UBI), og utviklet ved bruk av ECL-reagens (Amersham).

Fig. 17A-17C og 18A-18B viser resultatene av dette eksperiment. Fig. 17A-17C viser at en påvisning ved "Western blot" av tyrosin-fosforylert VEGFR2(FIk1) ved VEGF165-ligandstimulering, viser at celleflatereseptorene er fosforylert i forskjellig grad avhengig av hvilken modifiserte Flt1-reseptor som brukes under forhåndsinkubasjonen med VEGF. Slik det fremgår fra fig. 17A, foreligger det ved et 1,5 molart overskudd av enten Flt1(1-3)-Fc, Flt1(1-3)-Fc (A40) eller ubestendig Flt1D2FIk1D3.FcΔC1(a) en fullstendig blokkering av disse modifiserte Flt1-reseptorers reseptorstimulering, sammenlignet med en behandling i kontrollmedium. Derimot oppviser ubestendig Flt1D2VEGFR3D3.FcΔC1(a) ingen vesentlig blokkering ved dette molare overskudd sammenlignet med den VEGF-positive kontrollbehandling. Lignende resultater fremgår fra fig. 17B, hvor de modifiserte Flt1-reseptorer foreligger i et 3 gangers molart overskudd i forhold til VEGF165-ligand. På fig. 17C, hvor de modifiserte Flt1-reseptorer foreligger i et 6 gangers molart overskudd i forhold til VEGF165-ligand, kan ubestendig Flt1D2VEGFR3D3.FcΔC1(a) nå observeres å delvis blokkere den VEGF165-induserte stimulering av celleflatereseptorer.

På fig. 18A-18B viser en påvisning ved "Western blot" av tyrosin-fosforylert VEGFR2(FIk1) ved VEGF165-ligandstimulering at celleflatereseptorer ikke fosforyleres av behandlingsprøver som har VEGF165 forhåndsinkubert med 1 og 2 gangers molart overskudd (fig. 18A) eller 3 eller 4 gangers molart overskudd (fig. 18B) av enten ubestendig Flt1D2FIk1D3.FcΔC1(a), stabilt Flt1D2FIk1D3.FcΔC1(a) eller ubestahdnig VEGFR1R2-FcΔC1(a). Ved alle de testede konsentrasjoner av modifisert Flt1-reseptor foreligger en fullstendig binding av VEGF165-ligand under forhåndsinkubasjonen som ikke fører til noen påvisbar stimulering av celleflatereseptorer med ubundet VEGF165 sammenlignet med behandling med kontrollmedium.

Eksempel 24: Celleproliferasjons-bioassay

Testcellepopulasjonen er MG87-celler som er blitt stabilt transisert med en ekspressionsplasmid som inneholder en DNA-innføytelse som koder for VEGFR2(FIk1)-ekstracellulær domene kondensert med TrkB-intracellulær kinasedomene, hvorved

det dannes et kimært molekyl. Grunnen til at man brukte TrkB-intracellulær kinasedomene istedenfor den native VEGFR2(Flk1)-intracellulære kinasedomene, er at den intracellulære kinasedomene av VEGFR2(Flk1) ikke forårsaker noen sterk proliferativ respons når den stimuleres med VEGF165 i disse celler. Det er kjent at

5 MG87-celler som inneholder hellengdes TrkB-reseptor, gir en robust proliferativ respons når de stimuleres med BDNF, slik at man erstattet den intracellulære kinasedomene av VEGFR2(Flk1) med TrkB-intracellulær kinasedomene for å dra nytte av denne evne til proliferativ respons.

5 x 10³ celler/brønn ble strøket på en 96-brønners plate og fikk akklimatisere seg i

10 2 timer ved 37°C. De følgende modifiserte Flt-reseptorer: Flt1(1-3)-Fc, Flt1D2.FlklD3.FcΔC1(a) og Flt1D2.VEGFR3D3.FcΔC1(a), plus en irrelevant reseptor benevnt Tie-Fc som negativkontroll, ble titrert fra 40 nM til 20 pM og inkubert på cellene i 1 time ved 37°C. Humant rekombinant VEGF165 i definert medium ble

15 deretter tilsatt til alle brønnene i konsentrasjonen 1,56 nM. Platene ble inkubert i 72 timer ved 37°C, deretter ble MTS (Owen's reagensmiddel, Promega) tilsatt, og platene ble inkubert i ytterligere 4 timer. Til slutt ble platene avlest på et spektrofotometer ved 450/570 nm. Resultatene av dette eksperiment vises på fig. 19. Kontrollreseptoren Tie2-Fc blokkerer ikke den VEGF165-induserte celleproliferasjon ved

20 noen konsentrasjon, mens Flt1D2.FlklD3.FcΔC1(a) blokkerer 1,56 nM VEGF165 med en halvmaksimal dose på 0,8 nM. Flt1(1-3)-Fc og Flt1D2.VEGFR3D3.FcΔC1(a) er mindre virksomme ved blokkering av VEGF165 i dette assay, med en halvmaksimal dose rundt 2 nM. VEGF165 alene gir en avlesning på 1,2 absorbansenheter, og bakgrunnsverdien er 0,38 absorbansenheter.

Eksempel 25:

25 Bindingsstøkiometri av modifiserte Flt-reseptorer til VEGF165

(a) BIAcore-analyse

Støkiometrien av Flt1D2FlklD3.FcΔC1(a) og VEGFR1R2-FcΔC1(a)-vekselvirkningen med humant VEGF165 ble bestemt ved å måle enten nivået av VEGF-

metningsbinding til Flt1D2FlklD3.FcΔC1(a)- eller VEGFR1R2-FcΔC1(a)-flater eller

30 måling av konsentrasjonen av VEGF165 som var nødvendig til å fullstendig forebygge en binding av Flt1D2FlklD3.FcΔC1(a) eller VEGFR1R2.FcΔC1(a) til VEGF-BIAcore-flakflaten.

De modifiserte Flt1-reseptorer Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a) og VEGFR1R2-FcΔC1(a) ble innfanget med et anti-Fc-spesifikt antistoff som først ble immobilisert på et BIAcore-flak (BIAcore) ved bruk av aminkoblingskjemi. En blindprøve-antistoff-flate ble brukt som negativkontroll. VEGF165 ble injisert i konsentrasjonen 1 nM, 10 nM og 50 nM over Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a)- og VEGFR1R2-FcΔC1(a)-flaten ved 10 l/min i 1 time. Et sanntids bindingssignal ble registrert, og metningsbinding ble oppnådd ved slutten av hver injeksjon. Bindingsstøkiometrien ble beregnet som det molare forhold mellom bundet VEGF165 og immobilisert Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a) eller VEGFR1R2-FcΔC1(a), ved bruk av konversjonsfaktoren 1.000 RU likeverdig med 1 ng/ml. Resultatene antydte en bindingsstøkiometri på ett toverdig VEGF165-molekyl per ett Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a)- eller VEGFR1R2-FcΔC1(a)-molekyl (fig. 28).

I oppløsning ble Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a) eller VEGFR1R2-FcΔC1(a) i en konsentrasjon på 1 nM (bedømt å være 1000 ganger høyere enn KD-verdien for Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a) eller VEGFR1R2-FcΔC1(a)/VEGF165-vekselvirkningen) blandet med forskjellige konsentrasjoner av VEGF165. Etter én times inkubasjon ble konsentrasjonene av fritt Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a) i oppløsning målt som et bindingssignal til en aminkoblet VEGF165-flate. En kalibreringskurve ble brukt til å omregne Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a)-BIAcore-bindingssignalet til sin molare konsentrasjon. Dataen viste at tilsetningen av 1 nM VEGF165 i Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a)-oppløsningen fullstendig blokkerte Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a)-bindingen til VEGF165-flaten. Dette resultat antydte en bindingsstøkiometri av ett VEGF165-molekyl per ett Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a)-molekyl (fig. 21 og fig. 22). Når konsentrasjonen av Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a) ble plottet som funksjon av den tilsatte konsentrasjon av VEGF165, var stigningen av det lineære parti -1,06 for Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a) og -1,07 for VEGFR1R2-FcΔC1(a). Størrelsesorden av stigningen, som var meget nær minus ett, tydet på at ett VEGF165-molekyl ble bundet til ett molekyl av enten Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a) eller VEGFR1R2-FcΔC1(a).

(b) Størrelseseksklusjonskromatografi

Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a) ble blandet med et 3 gangers overskudd av VEGF165, og reseptor/ligand-komplekset ble rensset ved bruk av en Pharmacia Superose 6-størrelseseksklusjonskromatografikolonne. Reseptor/ligand-komplekset ble deretter inkubert i en buffer som inneholdt 6M guanidinhydroklorid, for å adskille det til sine komponentproteiner. Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a) ble adskilt fra VEGF165 ved å føre det gjennom gjennom en Superose 6-størrelseseksklusjonskromatografikolonne i 6M

guanidiumklorid. For å bestemme kompleksets støkiometri foretok man flere injeksjoner av Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a) og VEGF165, og topphøyden eller den integrerte intensitets topp ble plottet som en funksjon av konsentrasjonen av injisert protein. Kalibreringen ble utført under betingelser som var identiske med hva som ble brukt ved separasjon av komponentene av Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a)/VEGF-komplekset. En kvantifisering av Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a)/VEGF-kompleks-sammensetningen var basert på kalibreringskurvene. Resultatene av dette eksperiment vises på fig. 20, som viser at forholdet mellom VEGF165 og Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a) i et kompleks er 1:1.

10 Eksempel 26:

Bestemmelse av bindingsstøkiometrien av Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a)/VEGF165-kompleks ved størrelseseksklusionskromatografi

Fremstilling av Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a)/VEGF165-kompleks

15 VEGF165 (konsentrasjon = 3,61 mg/ml) ble blandet med CHO-celle som ubestendig uttrykte Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) (konsentrasjon = 0,9 mg/ml), i det molare forhold 3:1 (VEGF165:Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a)), og det hele ble inkubert over natten ved 4°C.

(a) Størrelseseksklusionskromatografi (SEC) under native betingelser

20 For å adskille komplekset fra overflødig ubundet VEGF165, ble 50 µl av komplekset fylt på en Pharmacia Superose 12 Pc 3,2/30 som var blitt ekvilibrert i PBS-buffer. Prøven ble eluert med den samme buffer med strømningshastigheten 40 ml/min, ved romtemperatur. Resultatene av denne SEC vises på fig. 23. Topp nr. 1 representerer komplekset, og topp nr. 2 representerer ubundet VEGF165. Fraksjoner som ble eluert mellom 1,1 og 1,2 ml, ble slått sammen, og guanidiniumhydroklorid (GuHCl) ble tilsatt til den endelige konsentrasjon 4,5M, for å adskille komplekset.

(b) Størrelseseksklusionskromatografi (SEC) under dissosiative betingelser

30 For å adskille komponentene av reseptor/ligand-komplekset og for å bestemme deres molare forhold, ble 50 µl av det ovenfor beskrevne dissosierte kompleks fylt på en Superose 12 PC 3,2/30 som var ekvilibrert i 6M GuHCl, og eluert med den samme oppløsning med strømningshastigheten 40 µl/min, ved romtemperatur. Re-

sultatene av denne SEC vises på fig. 24. Topp nr. 1 representerer Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a), og topp nr. 2 representerer VEGF165.

(c) Beregning av Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a)/VEGF165-kompleksets støkiometri

Støkiometrien av reseptor/ligand-komplekset ble bestemt utfra topparealet eller
 5 topphøyden for komponentene. Konsentrasjoner av VEGF165 og
 Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a) som tilsvarte henholdsvis toppens høyde eller toppens area-
 le, ble erholdt fra standardkurvene for VEGF165 og Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a). For å
 oppnå en standardkurve ble fire forskjellige konsentrasjoner (0,04 mg/ml - 0,3
 mg/ml) av hver komponent injisert på en Pharmacia Superose 12 PC 3,2/30-
 10 kolonne som var blitt ekvilibrert i 6M guanidiniumklorid, og eluert med den samme
 oppløsning ved strømningshastigheten 40 µl/min, ved romtemperatur. Standard-
 kurven ble erholdt ved å plote topparealet eller topphøyden mot proteinkonsentra-
 sjonen. Det molare forhold mellom VEGF165 og Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a) som ble
 bestemt utfra topparealet for komponentene, var 1,16. Det molare forhold mellom
 15 VEGF165 og Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a) som ble bestemt utfra topphøyden for kompo-
 nentene, var 1,10.

Eksempel 27:

Bestemmelse av støkiometrien av Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a)/VEGF165-kompleks ved størrelseseksklusjonskromatografi med "online"-lysspredning

20 Fremstilling av komplekset

VEGF165 ble blandet med CHO som ubestendig uttrykte Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a)-
 protein, i det molare forhold 3:1 (VEGF165/Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a)), og inkubert
 over natten ved 4°C.

(a) Størrelseseksklusjonskromatografi (SEC) med "online"-lysspredning

25 Størrelseseksklusjonskromatografikolonne med en MiniDawn "online"-
 lysspredningsdetektor (Wyatt Technology, Santa Barbara, CA) og refraksjonsindeks
 (RI)-detektorer (Shimadzu, Kyoto, Japan) ble brukt for å bestemme molekylvekten
 (MW) av reseptor/ligand-komplekset. Prøver ble injisert på en Superose 12 HR
 10/30-kolonne (Pharmacia) som var blitt ekvilibrert i PBS-buffer, og eluert med den
 30 samme buffer med strømningshastigheten 0,5 ml/min, ved romtemperatur. Slik det
 fremgår fra fig. 25, oppviser elueringsprofilen to topper. Topp nr. 1 representerer

reseptor/ligand-komplekset, og topp nr. 2 representerer det ubundne VEGF165. MW ble beregnet utfra LS- og RI-signalene. Den samme fremgangsmåte ble brukt for å bestemme MW av de enkelte komponenter av reseptor/ligand-komplekset. Resultatene av disse bestemmelse er som følger: MW av

- 5 Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a)/VEGF165-komplekset i topp-posisjonen er 157.300 (fig. 25), MW av VEGF165 i topp-posisjonen er 44.390 (fig. 26), og MW av R1R2 ved toppen er 113.300 (fig. 27).

- Denne data antydte at støkiometrien av Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a)/VEGF-komplekset er 1:1, idet dette tilsvarer summen av molekylvekten av Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a) og VEGF165. Viktig er at denne metode på endelig beviste at
- 10 Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a)/VEGF165-komplekset faktisk kun bestod av ett molekyl av VEGF165-ligand og kun ett molekyl av Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a).

Eksempel 28:

Peptidkartlegging av Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a)

- 15 Disulfidstrukturene og glykosylasjonssetene i Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) ble bestemt ved en peptidkartleggingsmetode. I denne metode ble proteinet først spaltet med trypsin. Trypsinfragmenter ble analysert og identifisert ved kHPLC koblet med massespektrometri, i tillegg til en N-terminal-sekvensieringsteknikk. Reduksjon av trypsinspaltningsproduktet ble brukt for å hjelpe med å identifisere de disulfidbindings-
- 20 holdige fragmenter. En behandling av trypsinspaltningsproduktet med PNGase F (Glyko, Novato, CA) ble brukt for å hjelpe med å identifisere fragmenter som inneholdt N-bundne glykosylasjonsseter. Resultatene sammenfattes på den vedlagte fig. 36.

- Det finnes tilsammen ti cysteiner i Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a); seks av dem tilhører Fc-parti. Det er blitt bekreftet at Cys27 er disulfidbundet til Cys76. Det er blitt be-
- 25 kreftet at Cys121 er disulfidbundet til Cys182. De første to cysteiner i Fc-parti (Cys211 og Cys214) danner en intermolekylær disulfidbinding med de samme to cysteiner i en annen Fc-kjede. På grunn av at disse to cysteiner ikke kan separeres enzymatisk fra hverandre, kan man imidlertid ikke bekrefte om det finnes sted en
- 30 disulfidbinding mellom de samme cysteiner (f.eks. Cys 211 til Cys 211) eller mellom Cys211 og Cys214. Det er blitt bekreftet at Cys216 er disulfidbundet til Cys306. Det er blitt bekreftet at Cys352 er disulfidbundet til Cys410.

Det finnes fem mulig N-bundne glykosylasjonssteder i Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a). Alle fem viser seg å være glykosylert i forskjellig grad. En fullstendig glykosylasjon ble observert ved Asn33 (aminosyresekvens NIT), ASN193 (aminosyresekvens NST) og Asn282 (aminosyresekvens NST). I tillegg observeres en delvis glykosylasjon på

5 Asn65 og Asn120. Glykosylasjonssteder er merket ved understreking på fig. 28.

Eksempel 29:

Farmakokinetisk analyse av modifiserte Flt1(1-3)-Fc-reseptorer

(a) Farmakokinetisk analyse av Flt1(1-3)-Fc (A40), Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) og VEGFR1R2-FcΔC1(a)

10 Balb/c-mus (25-30 g) fikk subkutan injisert 4 mg/kg Flt1(1-3)-Fc (A40), ubestendig CHO-uttrykt Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a), stabilt CHO-uttrykt Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) og ubestendig CHO-uttrykt VEGFR1R2-FcΔC1(a). Man tok blodprøver fra musene 1, 2, 4, 6 og 24 timer, 2 dager, 3 dager og 6 dager etter injeksjonen. Seraene ble testet i et ELISA-assay som var utformet for å påvise

15 Flt1(1-3)-Fc (A40), Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) eller VEGFR1R2-FcΔC1(a). ELISA-assayet omfatter å bestryke en ELISA-plate med VEGF165, binde det påviste Flt1(1-3)-Fc (A40), Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) eller VEGFR1R2-FcΔC1(a) og rapportering med et anti-Fc-antistoff som var bundet til pepperrot-peroksidase. Resultatene av disse eksperimenter vises på fig. 37. T_{maks} -verdien for Flt1(1-3)-Fc (A40) var 6

20 timer, mens T_{maks} -verdien for ubestendig og stabilt Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) og ubestendig VEGFR1R2-FcΔC1(a) var 24 timer. C_{maks} -verdien for Flt1(1-3)-Fc (A40) var 8 g/ml. For begge de ubestendige molekyler (Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) og VEGFR1R2-FcΔC1(a)) var C_{maks} -verdien 18 g/ml, og C_{maks} -verdien for stabilt VEGFR1R2-FcΔC1(a) var 30 g/ml.

25 (b) Farmakokinetisk analyse av Flt1(1-3)-Fc (A40), Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) og Flt1D2.VEGFR3D3.FcΔC1(a)

Balb/c-mus (25-30 g) fikk subkutan injisert 4 mg/kg Flt1(1-3)-Fc (A40), ubestendig CHO-uttrykt Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) og ubestendig CHO-uttrykt Flt1D2.VEGFR3D3.FcΔC1(a). Man tok blodprøver fra musenes hale 1, 2, 5, 6, 7, 8,

30 12, 15 og 20 dager etter injeksjonen. Seraene ble testet i et ELISA-assay for å påvise Flt1(1-3)-Fc, Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) og Flt1D2.VEGFR3D3.FcΔC1(a). ELISA-assayet omfatter å bestryke en ELISA-plate med 165, binde Flt1(1-3)-Fc, Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) eller Flt1D2.VEGFR3D3.FcΔC1(a) og rapportere med et

anti-Fc-antistoff bundet til pepperrot-peroksidase. Flt1(1-3)-Fc (A40) kunne ikke lenger påvises i serum etter 5 dager, mens Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) og Flt1D2.VEGFR3D3.FcΔC1(a) var påvisbart i 15 dager eller lenger. Resultatene av dette eksperiment vises på fig. 29.

5 Eksempel 30:

Bedømmelse av evnen av Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) til å inhibere svulstvekst *in vivo*

For å bedømme evnen av Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) til å inhibere svulstvekst *in vivo*, brukte man en modell hvor svulstcellesuspensjoner implanteres subkutan i høyre flanke av hannlige mus med alvorlig kombinert immunsvikt (SCID-mus). To celle-
 10 linjer, nemlig human HT-1080-fibrosarkomacellelinje (ATCC-tilgangsnummer CCL-121) og rotte-C6-gliomacellelinje (ATCC-tilgangsnummer CCL-107), som hver oppviser meget forskjellige morfologier og vekstkarakteristikk, ble brukt i assayet. Den første dose av Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) (i konsentrasjonen 25 mg/kg eller slik det vises på fig. 39 og 40) ble gitt på dagen for svulstimplantasjonen. Dyrene fikk
 15 deretter subkutane injeksjoner av Flt1(1-3)-Fc (A40), Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) eller vehikkel enten annenhver dag (EOD) eller to ganger per uke (2 /uke) over et tidsrom på 2 uker. Etter 2 uker ble dyrene perfusert med fiksasjonsmiddel, svulstene ble fjernet, og prøvene ble blindgjort. Svulstvolumet ble bestemt ved å måle lengden og bredden av synlige subkutane svulster. Både Flt1(1-3)-Fc (A40) og
 20 Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) nedsatte veksten av svulster som ble dannet av HT-1080- og C6-celler, betydelig. Resultatene av disse eksperimenter vises på fig. 30 og 31.

Eksempel 31:

Virkningen av VEGF165 og modifiserte Flt1-reseptorer i det kvinnelige reproduksjonssystem

25 Det stereotype mønster av den vaskulære ommodellering som finner sted i uterus og ovarier i løpet av reproduksjonssyklusen, er velkarakterisert, hvilket gjør disse vev spesielt godt egnet for å undersøke mekanismene som regulerer angiogenese, den vaskulære ommodellering og den vaskulære regresjon. Faktisk var det *in situ*-hybridiseringsundersøkelser i reproduksjonsvevene som gav de første klare tegn på
 30 at VEGF virker som mediator av den fysiologiske angiogenese i modne gnagere samt i mennekser og ikke-humane primater (Phillips *et al.*, 1990; Ravindranath *et al.*, 1992; Shweiki *et al.*, 1993; Kamat *et al.*, 1995). Fordi en cyklisk angiogenese og vaskulær ommodellering er utpregede trekk av normal ovarie og uterus, er det ikke overraskende at en abnormal blodkarvekst og/eller vaskulær dysfunksjon har

vist seg å kjennetegne mange patologiske tilstander som rammer disse organer. Videre tror man at disse patogene vaskulære abnormaliteter forårsakes eller forverres av den dysregulerte ekspresjon av én eller flere angiogene eller anti-angiogene faktorer, mest utpreget VEGF.

5 For eksempel er en abnormal angiogenese et kjennetegn for polycystisk ovariesykdom og endometrisk karsinom, og i begge tilfellene overuttrykkes VEGF i det rammede vev (Kamat *et al.*, 1995; Shifren *et al.*, 1996; Guidi *et al.*, 1996; Donnez *et al.*, 1998). En overekspressjon av VEGF antas også å spille en patogen rolle ved etableringen av systemisk vaskulær hyperpermeabilitet i ovarisk hyperstimulasjonssyndrom (McClure *et al.*, 1994; Levin *et al.*, 1998) og preeklampsi (Baker *et al.*, 1995; Sharkey *et al.*, 1996). I tillegg er VEGF blitt implisert som den permeabilitetsfaktor som er ansvarlig for produksjon av askitter forbundet med ovariekarsinomer og andre svulster (Senger *et al.*, 1983; Boockchay *et al.*, 1995). Midler som virksomt nøytraliserer de biologiske virkninger av VEGF, kan rimelig tenkes å være
15 av terapeutisk nytte i de ovennevnte og beslektede tilstander.

Angiogenese og vaskulær ommodellering er også kjennetegn for blastocyst-implantasjon- og placentalt utvikling (Findlay, 1986). VEGF uttrykkes sterkt både i maternal decidua og i embryoniske trofoblaster, hvor man tror at det først stimulerer en ekspansjon og hyperpermeabilitet av uterusvaskulaturen under periimplantasjonsperioden og deretter medierer dannelsen av både de maternale og embryoniske bestanddeler av placentavaskulaturen (Shweiki *et al.*, 1993; Cullinan-Bove og Koos, 1993; Chakraborty *et al.*, 1995; Das *et al.*, 1997). VEGF er også nødvendig for en luteal angiogenese og den forbundne progesteronutsondring som er nødvendig for å forberede uterus på implantasjonen (Ferrara *et al.*, 1998). Dermed kan
25 midler som inhiberer de biologiske virkninger av VEGF vise seg å være nyttige som prevensjonsmidler (ved å forebygge implantasjon) eller som abortifaciens under de tidlige gestasjonsstadier. Den senere anvendelse kan finne spesiell bruk som ikke-kirurgisk inngrep for terminering av ektopiske svangerskap.

Selv om ekspresjonen av VEGF-reseptorer til stor del er begrenset til vaskulær endotelium i normale reproduksjonsvev, uttrykkes Flt1 også av trofoblaster i placenta av både mennesker og dyr (Clark *et al.*, 1996; He *et al.*, 1999), hvor det er blitt foreslått at det spiller en rolle ved trofoblastinvasjon. Det er interessant å bemerke at både Flt1 og KDR (Flk1) uttrykkes av koriokarsinomacellelinjen BeWo (Charnock-Jones *et al.*, 1994), og VEGF har vist seg å fremme en DNA-syntese og tyrosinforforylasjon av MPA-kinase i disse celler. Videre uttrykker primære og metastatiske
35

ovariekarsinomer ikke bare høye nivåer av VEGF, men, i tillegg til vaskulær endotelium, uttrykker også selve svulstcellene KDR og/eller Flt1 (Boock et al., 1995). Disse funn tyder på at VEGF ikke bare er kritisk omfattet i genereringen og vedlikeholdet av svulstvasculaturen, men at i det minste i noen svulster av reproduktivt opphav, kan VEGF undertjene en autokrin rolle og dermed direkte støtte overlevelsen og proliferasjonen av svulstcellene. Dermed kan midler som blokkerer virkningen av VEGF, ha spesielt fordelaktige anvendelser ved behandling av svulster av reproduktivt opphav.

Metoder og resultater

10 (a) Bedømmelse av VEGF-indusert uterushyperpermeabilitet

Gravid hesteserum-gonadotrofin (PMSG) ble injisert subkutan (5 IU) for å indusere ovulasjon i prepubertale rotter av hunnkjønn. Dette fører til en strøm av østradiol etter 2 dager, som i sin tur forårsaker en induksjon av VEGF i uterus. Det beskrives at denne induksjon fører til en hyperpermeabilitet av uterus og en økning av uterus' våtvekt 6 timer senere, og dermed potensielt kunne blokkeres ved hjelp av de modifiserte Flt-reseptorer Flt1(1-3)-Fc (A40), Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) og Flt1D2.VEGFR3D3.FcΔC1(a). I denne *in vivo*-modell er normalvekten av rotteuterus ca. 50 mg, og denne kan induseres til 300-350 mg med PMSG. En uttørring av vevet viser at alt dette er vannvekt. En subkutan injeksjon av Flt1(1-3)-Fc (A40), Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) og Flt1D2.VEGFR3D3.FcΔC1(a) i konsentrasjonen 25 mg/kg 1 time etter PMSG-injeksjonen fører til en ca. 50% inhibering av økningen av uterus-våttekten. En heving av dosen av modifisert Flt-reseptor nedsetter ikke økningen av våttekten ytterligere, hvilket tyder på at det finnes en VEGF-uavhengig komponent i denne modell. Resultatene av dette eksperiment vises på fig. 32.

(a) Bedømmelse av corpus luteum-angiogenese ved bruk av progesteron som avlesning

Gravid hesteserum-gonadotrofin (PMSG) injiseres subkutan (5 IU) for å indusere en ovulasjon i prepubertale rotter av hunnkjønn. Dette fører til en komplett fungerende corpus luteum som inneholder et tett nettverk av blodkar etter 4 dager, hvilket muliggjør en utsondring av progesteron i blodstrømmen for å forberede uterus på implantasjonen. Induksjonen av angiogenese i corpus luteum krever VEGF; derfor ville en blokkering av VEGF føre til en mangel på nye blodkar og dermed en

mangel på progesteron som utsondres i blodstrømmen. I denne *in vivo*-modell er hvilenivået av progesteron ca. 5 ng/ml, og dette kan induseres til et nivå på 25-40 ng/ml etter PMSG. En subkutan injeksjon av Flt1(1-3)-Fc (A40) eller Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) i konsentrasjonen 25 mg/kg eller 5 mg/kg 1 time etter PMSG-injeksjonen fører til en fullstendig inhibering av progesteroninduksjonen på dag 4. Resultatene av dette eksperiment vises på fig. 42A-42B.

Eksempel 33:

Farmakokinetisk analyse av Flt1(1-3)-Fc (A40) og PEGylert Flt1(1-3)-Fc

Flt1(1-3)-Fc ble PEGylert med enten 10 kD PEG eller 20 kD PEG og testet i balb/c-mus for sin farmakokinetiske profil. Begge de PEGylerte former for Flt1(1-3)-Fc viste seg å ha en meget bedre PK-profil enn Flt1(1-3)-Fc (A40), idet T_{maks} -verdien fant sted etter 24 timer for de PEGylerte molekyler, sammenlignet med 6 timer for Flt1(1-3)-Fc (A40).

Eksempel 34:

VEGF165-ELISA for å testge affiniteten av modifiserte Flt1-reseptorvarianter

10 pM VEGF165 ble inkubert over natten ved romtemperatur med modifiserte Flt1-reseptorvarianter i området 160 pM til 0,1 pM. De modifiserte Flt1-reseptorvarianter som ble brukt i dette eksperiment, var Flt1(1-3)-Fc, Flt1(1-3)-Fc (A40), ubestendig uttrykt Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a), ubestendig uttrykt Flt1D2VEGFR3D3-FcΔC1(a), Flt1(1-3_{NAS})-Fc, Flt1(1-3_{R→C})-Fc og Tie2-Fc. Flt1(1-3_{NAS})-Fc er en modifisert versjon av Flt1(1-3)-Fc, hvor den høyt basiske aminosyresekvens KNKRASVRRR er erstattet med NASVNGSR, hvilket fører til innlemmelse av to nye glykosylasjonssteder og en netto reduksjon av fem positive ladninger, begge med hensikt å nedsette de ugunstige virkninger av denne sekvens på PK-verdien. Flt1(1-3_{R→C})-Fc er en modifikasjon hvor et enkelt arginin (R)-residuum i den samme basiske aminosyresekvens er endret til cystein (C) (KNKRASVRRR → KNKCASVRRR) for å muliggjøre en PEGylering ved dette residuum, som da kunne beskytte det basiske parti fra å utøve sine ugunstige virkninger på PK-verdien. Etter inkubasjon, ble oppløsningen overført til en plate som inneholdt et innfangingsantistoff for VEGF165 (R&D). Mengden av fritt VEGF165 ble deretter bestemt ved bruk av et antistoff for å rapportere fritt VEGF165. Dette viste at den modifiserte Flt1-reseptorvariant med høyest affinitet for VEGF165 (bestemt som den minste mengde fritt VEGF165) var Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a), fulgt av Flt1(1-3)-Fc og

Flt1(1-3)-Fc (A40), og deretter av Flt1(1-3_{R→C})-Fc, Flt1(1-3_{NAS})-Fc og Flt1D2VEGFR3D3-FcΔC1(a). Tie2-Fc har ingen affinitet for VEGF165.

P a t e n t k r a v

1. Isolert nukleinsyremolekyl omfattende:
 - (a) en nukleotidsekvens som koder for en vaskulær endotelial vekstfaktor (VEGF) -reseptorkomponent som i det vesentlige består av et immunoglobulinliknende (Ig) domene 2 av en første VEGF-reseptor og Ig-domene 3 av en andre VEGF-reseptor; og
 - (b) en nukleotidsekvens som koder for en multimeriserende komponent,

hvor første VEGF-reseptor er Flt1 og andre VEGF-reseptor er Flk1 eller Flt4 og VEGF-reseptorkomponenten er den eneste VEGF-reseptorkomponent i fusjonspolypeptidet
2. Isolert nukleinsyremolekyl ifølge krav 1, hvor nukleotidsekvensen som koder for Ig-domene 2 av det ekstracellulære domene av den første VEGF-reseptor, er oppstrøms for nukleotidsekvensen som koder for Ig-domene 3 av det ekstracellulære domene av den andre VEGF-reseptor.
3. Isolert nukleinsyremolekyl ifølge krav 1, hvor nukleotidsekvensen som koder for Ig-domene 2 av det ekstracellulære domene av den første VEGF-reseptor, er nedstrøms for nukleotidsekvensen som koder for Ig-domene 3 av det ekstracellulære domene av den andre VEGF-reseptor.
4. Isolert nukleinsyremolekyl ifølge ethvert av de forutgående krav, hvor den multimeriserende komponent omfatter en immunoglobulindomene.
5. Isolert nukleinsyremolekyl ifølge krav 4, hvor immunoglobulindomenet er valgt fra gruppen omfattende Fc-domene av IgG og tung kjede av IgG.
6. Isolert nukleinsyremolekyl ifølge krav 1 omfattende en nukleotidsekvens valgt fra gruppen bestående av:
 - (a) nukleotidsekvensen som vises på fig. 21A-21C;
 - (b) nukleotidsekvensen som vises på fig. 22A-22C;
 - (c) nukleotidsekvensen som vises på fig. 24A-24C; og

- (d) en nukleotidsekvens som, som et resultat av degenerasjonen av den genetiske kode, skiller seg fra nukleotidsekvensen fra punkt (a), (b) eller (c).
7. Isolert nukleinsyremolekyl ifølge krav 1, hvor komponentene av fusjonspolypeptidet er arrangert som 1,2,3; 1,3,2; 2,1,3; 2,3,1; 3,1,2 eller 3,2,1, hvor 1 er den første VEGF reseptorkomponent, 2 er den andre VEGF reseptorkomponent og 3 er den multimeriserende komponent.
8. Fusjonspolypeptid som kodes for av et isolert nukleinsyremolekyl ifølge et av de forutgående krav.
9. Vektor som omfatter et nukleinsyremolekyl ifølge ethvert av kravene 1 til 7.
10. Ekspresjonsvektor omfattende et nukleinsyremolekyl ifølge ethvert av kravene 1 til 7, hvor nukleinsyremolekylet er operativt forbundet med en ekspresjonskontrollsekvens.
11. Vert/vektorsystem for produksjon av et fusjonspolypeptid, som omfatter en ekspresjonsvektor ifølge krav 10 i en egnet vertcelle.
12. Vert/vektorsystem ifølge krav 11, hvor den egnede vertscelle er en bakteriecelle, gjærcele, insektcelle eller pattedyrcele.
13. Vert/vektorsystem ifølge krav 12, hvor den egnede vertscelle er en *E. coli*- eller CHO-celle.
14. Fremgangsmåte ved fremstilling av et fusjonspolypeptid, omfattende å dyrke celler av vert/vektorsystemet ifølge ethvert av kravene 11 til 13 under betingelser som tillater en produksjon av fusjonspolypeptidet, og å gjenvinne det således dannede fusjonspolypeptid.
15. Dimerisk vaskulær endotelial vekstfaktor (VEGF) antagonist omfattende to fusjonspolypeptider som angitt i krav 8.
16. Dimerisk antagonist ifølge krav 15 som er modifisert ved acetylering eller pegylering.

17. Anvendelse av et fusjonspolypeptid ifølge krav 8 eller en dimerisk antagonist ifølge ethvert av kravene 15 eller 16 for fremstilling av et legemiddel for anvendelse for å svekke eller forebygge tumorvekst, for å svekke eller forebygge ødem eller for å svekke eller forebygge bukvæskedannelse, for å minske eller inhibere plasmalekkasje eller å blokkere blodkarvekst i et menneske.
- 5

SEQ ID NO. 1

```

      10      20      30      40      50      60
      *      *      *      *      *      *
ATG GTC AGC TAC TGG GAC ACC GGG GTC CTG CTG TGC GCG CTG CTC AGC TGT CTG CTT CTC
TAC CAG TCG ATG ACC CTG TGG CCC CAG GAC GAC ACG CGC GAC GAG TCG ACA GAC GAA GAG
Met Val Ser Tyr Trp Asp Thr Gly Val Leu Leu Cys Ala Leu Leu Ser Cys Leu Leu Leu>

      70      80      90     100     110     120
      *      *      *      *      *      *
ACA GGA TCT AGT TCA GGT TCA AAA TTA AAA GAT CCT GAA CTG AGT TTA AAA GGC ACC CAG
TGT CCT AGA TCA AGT CCA AGT TTT AAT TTT CTA GGA CTT GAC TCA AAT TTT CCG TGG GTC
Thr Gly Ser Ser Ser Gly Ser Lys Leu Lys Asp Pro Glu Leu Ser Leu Lys Gly Thr Gln>

     130     140     150     160     170     180
      *      *      *      *      *      *
CAC ATC ATG CAA GCA GGC CAG ACA CTG CAT CTC CAA TGC AGG GGG GAA GCA GCC CAT AAA
GTG TAG TAC GTT CGT CCG GTC TGT GAC GTA GAG GTT ACG TCC CCC CTT CGT CCG GTA TTT
His Ile Met Gln Ala Gly Gln Thr Leu His Leu Gln Cys Arg Gly Glu Ala Ala His Lys>

     190     200     210     220     230     240
      *      *      *      *      *      *
TGG TCT TTG OCT GAA ATG GTG AGT AAG GAA AGC GAA AGG CTG AGC ATA ACT AAA TCT GCC
ACC AGA AAC GGA CTT TAC CAC TCA TTC CTT TOG CTT TCC GAC TCG TAT TGA TTT AGA CCG
Trp Ser Leu Pro Glu Met Val Ser Lys Glu Ser Glu Arg Leu Ser Ile Thr Lys Ser Ala>

     250     260     270     280     290     300
      *      *      *      *      *      *
TGT GGA AGA AAT GGC AAA CAA TTC TGC AGT ACT TTA ACC TTG AAC ACA GCT CAA GCA AAC
ACA CCT TCT TTA CCG TTT GTT AAG ACG TCA TGA AAT TGG AAC TTG TGT CGA GTT CGT TTG
Cys Gly Arg Asn Gly Lys Gln Phe Cys Ser Thr Leu Thr Leu Asn Thr Ala Gln Ala Asn>

     310     320     330     340     350     360
      *      *      *      *      *      *
CAC ACT GGC TTC TAC AGC TGC AAA TAT CTA GCT GTA OCT ACT TCA AAG AAG AAG GAA ACA
GTG TGA CCG AAG ATG TCG ACG TTT ATA GAT CGA CAT GGA TGA AGT TTC TTC TTC CTT TGT
His Thr Gly Phe Tyr Ser Cys Lys Tyr Leu Ala Val Pro Thr Ser Lys Lys Lys Glu Thr>

     370     380     390     400     410     420
      *      *      *      *      *      *
GAA TCT GCA ATC TAT ATA TTT ATT AGT GAT ACA GGT AGA OCT TTC GTA GAG ATG TAC AGT
CTT AGA CGT TAG ATA TAT AAA TAA TCA CTA TGT CCA TCT GGA AAG CAT CTC TAC ATG TCA
Glu Ser Ala Ile Tyr Ile Phe Ile Ser Asp Thr Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser>

     430     440     450     460     470     480
      *      *      *      *      *      *
GAA ATC CCC GAA ATT ATA CAC ATG ACT GAA GGA AGG GAG CTC GTC ATT CCC TGC CCG GTT
CTT TAG GGG CTT TAA TAT GTG TAC TGA CTT CCT TCC CTC GAG CAG TAA GGG ACG GCC CAA
Glu Ile Pro Glu Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val>

     490     500     510     520     530     540
      *      *      *      *      *      *
ACG TCA CCT AAC ATC ACT GTT ACT TTA AAA AAG TTT CCA CTT GAC ACT TTG ATC CCT GAT
TGC AGT GGA TTG TAG TGA CAA TGA AAT TTT TTC AAA GGT GAA CTG TGA AAC TAG GGA CTA
Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp>

```

```

      550      560      570      580      590      600
      *      *      *      *      *      *
GGA AAA CGC ATA ATC TGG GAC AGT AGA AAG GGC TTC ATC ATA TCA AAT GCA ACG TAC AAA
CCT TTT GCG TAT TAG ACC CTG TCA TCT TTC CCG AAG TAG TAT AGT TTA CGT TGC ATG TTT
Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys>

      610      620      630      640      650      660
      *      *      *      *      *      *
GAA ATA GGG CTT CTG ACC TGT GAA GCA ACA GTC AAT GGG CAT TTG TAT AAG ACA AAC TAT
CTT TAT CCC GAA GAC TGG ACA CTT CGT TGT CAG TTA CCC GTA AAC ATA TTC TGT TTG ATA
Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr>

      670      680      690      700      710      720
      *      *      *      *      *      *
CTC ACA CAT CGA CAA ACC AAT ACA ATC ATA GAT GTC CAA ATA AGC ACA CCA CGC CCA GTC
GAG TGT GTA GCT GTT TGG TTA TGT TAG TAT CTA CAG GTT TAT TCG TGT GGT GCG GGT CAG
Leu Thr His Arg Gln Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Gln Ile Ser Thr Pro Arg Pro Val>

      730      740      750      760      770      780
      *      *      *      *      *      *
AAA TTA CTT AGA GGC CAT ACT CTT GTC CTC AAT TGT ACT GCT ACC ACT CCC TTG AAC ACG
TTT AAT GAA TCT CCG GTA TGA GAA CAG GAG TTA ACA TGA CGA TGG TGA GGG AAC TTG TGC
Lys Leu Leu Arg Gly His Thr Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Thr Thr Pro Leu Asn Thr>

      790      800      810      820      830      840
      *      *      *      *      *      *
AGA GTT CAA ATG ACC TGG AGT TAC CCT GAT GAA AAA AAT AAG AGA GCT TCC GTA AGG CGA
TCT CAA GTT TAC TGG ACC TCA ATG GGA CTA CTT TTT TTA TTC TCT CGA AGG CAT TCC GCT
Arg Val Gln Met Thr Trp Ser Tyr Pro Asp Glu Lys Asn Lys Arg Ala Ser Val Arg Arg>

      850      860      870      880      890      900
      *      *      *      *      *      *
CGA ATT GAC CAA AGC AAT TCC CAT GCC AAC ATA TTC TAC AGT GTT CTT ACT ATT GAC AAA
GCT TAA CTG GTT TCG TTA AGG GTA CGG TTG TAT AAG ATG TCA CAA GAA TGA TAA CTG TTT
Arg Ile Asp Gln Ser Asn Ser His Ala Asn Ile Phe Tyr Ser Val Leu Thr Ile Asp Lys>

      910      920      930      940      950      960
      *      *      *      *      *      *
ATG CAG AAC AAA GAC AAA GGA CTT TAT ACT TGT CGT GTA AGG AGT GGA CCA TCA TTC AAA
TAC GTC TTG TTT CTG TTT CCT GAA ATA TGA ACA GCA CAT TCC TCA CCT GGT AGT AAG TTT
Met Gln Asn Lys Asp Lys Gly Leu Tyr Thr Cys Arg Val Arg Ser Gly Pro Ser Phe Lys>

      970      980      990      1000      1010      1020
      *      *      *      *      *      *
TCT GTT AAC ACC TCA GTG CAT ATA TAT GAT AAA GCA GGC CCG GGC GAG CCC AAA TCT TGT
AGA CAA TTG TGG AGT CAC GTA TAT ATA CTA TTT CGT CCG GGC CCG CTC GGG TTT AGA ACA
Ser Val Asn Thr Ser Val His Ile Tyr Asp Lys Ala Gly Pro Gly Glu Pro Lys Ser Cys>

      1030      1040      1050      1060      1070      1080
      *      *      *      *      *      *
GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC
CTG TTT TGA GTG TGT ACG GGT GGC ACG GGT CGT GGA CTT GAG GAC CCC CCT GGC AGT CAG
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val>

```

1090				1100				1110				1120				1130				1140			
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		
TTC	CTC	TTC	CCC	CCA	AAA	CCC	AAG	GAC	ACC	CTC	ATG	ATC	TCC	CGG	ACC	CCT	GAG	GTC	ACA				
AAG	GAG	AAG	GGG	GGT	TTT	GGG	TTC	CTG	TGG	GAG	TAC	TAG	AGG	GCC	TGG	GGA	CTC	CAG	TGT				
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr>				
1150				1160				1170				1180				1190				1200			
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		
TGC	GTG	GTG	GTG	GAC	GTG	AGC	CAC	GAA	GAC	CCT	GAG	GTC	AAG	TTC	AAC	TGG	TAC	GTG	GAC				
ACG	CAC	CAC	CAC	CTG	CAC	TCG	GTG	CTT	CTG	GGA	CTC	CAG	TTC	AAG	TTG	ACC	ATG	CAC	CTG				
Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp>				
1210				1220				1230				1240				1250				1260			
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		
GGC	GTG	GAG	GTG	CAT	AAT	GCC	AAG	ACA	AAG	CCG	CGG	GAG	GAG	CAG	TAC	AAC	AGC	ACG	TAC				
CCG	CAC	CTC	CAC	GTA	TTA	CGG	TTC	TGT	TTC	GGC	GCC	CTC	CTC	GTC	ATG	TTG	TCG	TGC	ATG				
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr>				
1270				1280				1290				1300				1310				1320			
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		
CGT	GTG	GTC	AGC	GTC	CTC	ACC	GTC	CTG	CAC	CAG	GAC	TGG	CTG	AAT	GGC	AAG	GAG	TAC	AAG				
GCA	CAC	CAG	TCG	CAG	GAG	TGG	CAG	GAC	GTG	GTC	CTG	ACC	GAC	TTA	CCG	TTC	CTC	ATG	TTC				
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys>				
1330				1340				1350				1360				1370				1380			
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		
TGC	AAG	GTC	TCC	AAC	AAA	GCC	CTC	CCA	GCC	CCC	ATC	GAG	AAA	ACC	ATC	TCC	AAA	GCC	AAA				
ACG	TTC	CAG	AGG	TTG	TTT	CGG	GAG	GGT	CGG	GGG	TAG	CTC	TTT	TGG	TAG	AGG	TTT	CGG	TTT				
Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys>				
1390				1400				1410				1420				1430				1440			
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		
GGG	CAG	CCC	CGA	GAA	CCA	CAG	GTG	TAC	ACC	CTG	CCC	CCA	TCC	CGG	GAT	GAG	CTG	ACC	AAG				
CCC	GTG	GGG	GCT	CTT	GGT	GTG	CAC	ATG	TGG	GAC	GGG	GGT	AGG	GCC	CTA	CTC	GAC	TGG	TTC				
Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys>				
1450				1460				1470				1480				1490				1500			
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		
AAC	CAG	GTC	AGC	CTG	ACC	TGC	CTG	GTC	AAA	GGC	TTC	TAT	CCC	AGC	GAC	ATC	GCC	GTG	GAG				
TTG	GTG	CAG	TCG	GAC	TGG	ACG	GAC	CAG	TTT	CCG	AAG	ATA	GGG	TCG	CTG	TAG	CGG	CAC	CTC				
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu>				
1510				1520				1530				1540				1550				1560			
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		
TGG	GAG	AGC	AAT	GGG	CAG	CCG	GAG	AAC	AAC	TAC	AAG	ACC	ACG	CCT	CCC	GTG	CTG	GAC	TCC				
ACC	CTC	TCG	TTA	CCC	GTG	GGC	CTC	TTG	TTG	ATG	TTC	TGG	TGC	GGA	GGG	CAC	GAC	CTG	AGG				
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser>				
1570				1580				1590				1600				1610				1620			
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		
GAC	GGC	TCC	TTC	TTC	CTC	TAC	AGC	AAG	CTC	ACC	GTG	GAC	AAG	AGC	AGG	TGG	CAG	CAG	GGG				
CTG	CCG	AGG	AAG	AAG	GAG	ATG	TCG	TTC	GAG	TGG	CAC	CTG	TTC	TCG	TCC	ACC	GTC	GTC	CCC				
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly>				

1630				1640				1650				1660				1670				1680			
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
AAC	GTC	TTC	TCA	TGC	TCC	GTG	ATG	CAT	GAG	GCT	CTG	CAC	AAC	CAC	TAC	ACG	CAG	AAG	AGC				
TTG	CAG	AAG	AGT	ACG	AGG	CAC	TAC	GTA	CTC	CGA	GAC	GTG	TTG	GTG	ATG	TGC	GTC	TTC	TOG				
Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	>			

1690				1700			
*	*	*	*	*	*	*	*
CAC	TCC	CTG	TCT	CCG	GCT	AAA	TGA
GAG	AGG	GAC	AGA	GCC	CCA	TTT	ACT
Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	***>

SEQ ID No. 2

```

      10      20      30      40      50      60
      *      *      *      *      *      *
ATG GTC AGC TAC TGG GAC ACC GGG GTC CTG CTG TGC GCG CTG CTC AGC TGT CTG CTT CTC
TAC CAG TCG ATG ACC CTG TGG CCC CAG GAC GAC ACG CGC GAC GAG TCG ACA GAC GAA GAG
Met Val Ser Tyr Trp Asp Thr Gly Val Leu Leu Cys Ala Leu Leu Ser Cys Leu Leu Leu>

      70      80      90     100     110     120
      *      *      *      *      *      *
ACA GGA TCT AGT TCA GGT TCA AAA TTA AAA GAT CCT GAA CTG AGT TTA AAA GGC ACC CAG
TGT CCT AGA TCA AGT CCA AGT TTT AAT TTT CTA GGA CTT GAC TCA AAT TTT CCG TGG GTC
Thr Gly Ser Ser Ser Gly Ser Lys Leu Lys Asp Pro Glu Leu Ser Leu Lys Gly Thr Gln>

     130     140     150     160     170     180
      *      *      *      *      *      *
CAC ATC ATG CAA GCA GGC CAG ACA CTG CAT CTC CAA TGC AGG GGG GAA GCA GCC CAT AAA
GTG TAG TAC GTT CGT CCG GTC TGT GAC GTA GAG GTT ACG TCC CCC CTT CGT CCG GTA TTT
His Ile Met Gln Ala Gly Gln Thr Leu His Leu Gln Cys Arg Gly Glu Ala Ala His Lys>

     190     200     210     220     230     240
      *      *      *      *      *      *
TGG TCT TTG CCT GAA ATG GTG AGT AAG GAA AGC GAA AGG CTG AGC ATA ACT AAA TCT GCC
ACC AGA AAC GGA CTT TAC CAC TCA TTC CTT TCG CTT TCC GAC TCG TAT TGA TTT AGA CCG
Trp Ser Leu Pro Glu Met Val Ser Lys Glu Ser Glu Arg Leu Ser Ile Thr Lys Ser Ala>

     250     260     270     280     290     300
      *      *      *      *      *      *
TGT GGA AGA AAT GGC AAA CAA TTC TGC AGT ACT TTA ACC TTG AAC ACA GCT CAA GCA AAC
ACA CCT TCT TTA CCG TTT GTT AAG ACG TCA TGA AAT TGG AAC TTG TGT CGA GTT CGT TTG
Cys Gly Arg Asn Gly Lys Gln Phe Cys Ser Thr Leu Thr Leu Asn Thr Ala Gln Ala Asn>

     310     320     330     340     350     360
      *      *      *      *      *      *
CAC ACT GGC TTC TAC AGC TGC AAA TAT CTA GCT GTA CCT ACT TCA AAG AAG AAG GAA ACA
GTG TGA CCG AAG ATG TCG ACG TTT ATA GAT CGA CAT GGA TGA AGT TTC TTC TTC CTT TGT
His Thr Gly Phe Tyr Ser Cys Lys Tyr Leu Ala Val Pro Thr Ser Lys Lys Lys Glu Thr>

     370     380     390     400     410     420
      *      *      *      *      *      *
GAA TCT GCA ATC TAT ATA TTT ATT AGT GAT ACA GGT AGA CCT TTC GTA GAG ATG TAC AGT
CTT AGA CGT TAG ATA TAT AAA TAA TCA CTA TGT CCA TCT GGA AAG CAT CTC TAC ATG TCA
Glu Ser Ala Ile Tyr Ile Phe Ile Ser Asp Thr Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser>

     430     440     450     460     470     480
      *      *      *      *      *      *
GAA ATC CCC GAA ATT ATA CAC ATG ACT GAA GGA AGG GAG CTC GTC ATT CCC TGC CGG GTT
CTT TAG GGG CTT TAA TAT GTG TAC TGA CTT CCT TCC CTC GAG CAG TAA GGG ACG GCC CAA
Glu Ile Pro Glu Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val>

     490     500     510     520     530     540
      *      *      *      *      *      *
ACG TCA CCT AAC ATC ACT GTT ACT TTA AAA AAG TTT CCA CTT GAC ACT TTG ATC CCT GAT
TGC AGT GGA TTG TAG TGA CAA TGA AAT TTT TTC AAA GGT GAA CTG TGA AAC TAG GGA CTA
Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp>

```

```

      550      560      570      580      590      600
      *      *      *      *      *      *
GGA AAA CSC ATA ATC TGG GAC AGT AGA AAG GGC TTC ATC ATA TCA AAT GCA ACG TAC AAA
CCT TTT GCG TAT TAG ACC CTG TCA TCT TTC CCG AAG TAG TAT AGT TTA CGT TGC ATG TTT
Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys>

      610      620      630      640      650      660
      *      *      *      *      *      *
GAA ATA GGG CTT CTG ACC TGT GAA GCA ACA GTC AAT GGG CAT TTG TAT AAG ACA AAC TAT
CTT TAT CCC GAA GAC TGG ACA CTT CGT TGT CAG TTA CCC GTA AAC ATA TTC TGT TTG ATA
Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr>

      670      680      690      700      710      720
      *      *      *      *      *      *
CTC ACA CAT CGA CAA ACC AAT ACA ATC ATA GAT GTC CAA ATA AGC ACA CCA CGC CCA GTC
GAG TGT GTA GCT GTT TGG TTA TGT TAG TAT CTA CAG GTT TAT TCG TGT GGT GCG GGT CAG
Leu Thr His Arg Gln Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Gln Ile Ser Thr Pro Arg Pro Val>

      730      740      750      760      770      780
      *      *      *      *      *      *
AAA TTA CTT AGA GGC CAT ACT CTT GTC CTC AAT TGT ACT GCT ACC ACT CCC TTG AAC ACG
TTT AAT GAA TCT CCG GTA TGA GAA CAG GAG TTA ACA TGA CGA TGG TGA GGG AAC TTG TGC
Lys Leu Leu Arg Gly His Thr Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Thr Thr Pro Leu Asn Thr>

      790      800      810      820      830      840
      *      *      *      *      *      *
AGA GTT CAA ATG ACC TGG AGT TAC CCT GAT GAA ATT GAC CAA AGC AAT TCC CAT GCC AAC
TCT CAA GTT TAC TGG ACC TCA ATG GGA CTA CTT TAA CTG GTT TCG TTA AGG GTA CCG TTG
Arg Val Gln Met Thr Trp Ser Tyr Pro Asp Glu Ile Asp Gln Ser Asn Ser His Ala Asn>

      850      860      870      880      890      900
      *      *      *      *      *      *
ATA TTC TAC AGT GTT CTT ACT ATT GAC AAA ATG CAG AAC AAA GAC AAA GGA CTT TAT ACT
TAT AAG ATG TCA CAA GAA TGA TAA CTG TTT TAC GTC TTG TTT CTG TTT CCT GAA ATA TGA
Ile Phe Tyr Ser Val Leu Thr Ile Asp Lys Met Gln Asn Lys Asp Lys Gly Leu Tyr Thr>

      910      920      930      940      950      960
      *      *      *      *      *      *
TGT CGT GTA AGG AGT GGA CCA TCA TTC AAA TCT GTT AAC ACC TCA GTG CAT ATA TAT GAT
ACA GCA CAT TCC TCA CCT GGT AGT AAG TTT AGA CAA TTG TGG AGT CAC GTA TAT ATA CTA
Cys Arg Val Arg Ser Gly Pro Ser Phe Lys Ser Val Asn Thr Ser Val His Ile Tyr Asp>

      970      980      990      1000      1010      1020
      *      *      *      *      *      *
AAA GCA GGC CCG GGC GAG CCC AAA TCT TGT GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA
TTT CGT CCG GGC CCG CTC GGG TTT AGA ACA CTG TTT TGA GTG TGT ACG GGT GGC ACG GGT
Lys Ala Gly Pro Gly Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro>

      1030      1040      1050      1060      1070      1080
      *      *      *      *      *      *
GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC TTC CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACC
CGT GGA CTT GAG GAC CCC CCT GGC AGT CAG AAG GAG AAG GGG GGT TTT GGG TTC CTG TGG
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr>

```

1090				1100				1110				1120				1130				1140			
*		*		*		*		*		*		*		*		*		*		*			
CTC	ATG	ATC	TCC	CGG	ACC	CCT	GAG	GTC	ACA	TGC	GTG	GTG	GTG	GAC	GTG	AGC	CAC	GAA	GAC				
GAG	TAC	TAG	AGG	GCC	TGG	GGA	CTC	CAG	TGT	ACG	CAC	CAC	CAC	CTG	CAC	TCG	GTG	CTT	CTG				
Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp				
1150				1160				1170				1180				1190				1200			
*		*		*		*		*		*		*		*		*		*		*			
CCT	GAG	GTC	AAG	TTC	AAC	TGG	TAC	GTG	GAC	GGC	GTG	GAG	GTG	CAT	AAT	GCC	AAG	ACA	AAG				
GGA	CTC	CAG	TTC	AAG	TTG	ACC	ATG	CAC	CTG	COG	CAC	CTC	CAC	GTA	TTA	CGG	TTC	TGT	TTC				
Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys				
1210				1220				1230				1240				1250				1260			
*		*		*		*		*		*		*		*		*		*		*			
COG	CGG	GAG	GAG	CAG	TAC	AAC	AGC	ACG	TAC	CGT	GTG	GTC	AGC	GTC	CTC	ACC	GTC	CTG	CAC				
GGC	GCC	CTC	CTC	GTC	ATG	TTG	TCG	TGC	ATG	GCA	CAC	CAG	TCG	CAG	GAG	TGG	CAG	GAC	GTG				
Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His				
1270				1280				1290				1300				1310				1320			
*		*		*		*		*		*		*		*		*		*		*			
CAG	GAC	TGG	CTG	AAT	GGC	AAG	GAG	TAC	AAG	TGC	AAG	GTC	TCC	AAC	AAA	GCC	CTC	CCA	GCC				
GTG	CTG	ACC	GAC	TTA	COG	TTC	CTC	ATG	TTC	ACG	TTC	CAG	AGG	TTG	TTT	CGG	GAG	GGT	CGG				
Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala				
1330				1340				1350				1360				1370				1380			
*		*		*		*		*		*		*		*		*		*		*			
CCC	ATC	GAG	AAA	ACC	ATC	TCC	AAA	GCC	AAA	GGG	CAG	CCC	CGA	GAA	CCA	CAG	GTG	TAC	ACC				
GGG	TAG	CTC	TTT	TGG	TAG	AGG	TTT	COG	TTT	CCC	GTC	GGG	GCT	CTT	GGT	GTC	CAC	ATG	TGG				
Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr				
1390				1400				1410				1420				1430				1440			
*		*		*		*		*		*		*		*		*		*		*			
CTG	CCC	CCA	TCC	CGG	GAT	GAG	CTG	ACC	AAG	AAC	CAG	GTC	AGC	CTG	ACC	TGC	CTG	GTC	AAA				
GAC	GGG	GGT	AGG	GCC	CTA	CTC	GAC	TGG	TTC	TTG	GTC	CAG	TCG	GAC	TGG	ACG	GAC	CAG	TTT				
Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys				
1450				1460				1470				1480				1490				1500			
*		*		*		*		*		*		*		*		*		*		*			
GGC	TTC	TAT	CCC	AGC	GAC	ATC	GCC	GTG	GAG	TGG	GAG	AGC	AAT	GGG	CAG	CCG	GAG	AAC	AAC				
CCG	AAG	ATA	GGG	TCG	CTG	TAG	CGG	CAC	CTC	ACC	CTC	TCG	TTA	CCC	GTC	GGC	CTC	TTG	TTG				
Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn				
1510				1520				1530				1540				1550				1560			

	1630		1640		1650		1660		1670								
	*	*	*	*	*	*	*	*	*								
GCT	CTG	CAC	AAC	CAC	TAC	ACG	CAG	AAG	AGC	CTC	TCC	CTG	TCT	CCG	GGT	AAA	TGA
CGA	GAC	GTG	TTG	GTG	ATG	TGC	GTC	TTC	TGG	GAG	AGG	GAC	AGA	GGC	CCA	TTT	ACT
Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	***>

SEQ ID NO. 3

```

      10      20      30      40      50      60
      *      *      *      *      *      *
ATG GTC AGC TAC TGG GAC ACC GGG GTC CTG CTG TGC GCG CTG CTC AGC TGT CTG CTT CTC
TAC CAG TCG ATG ACC CTG TGG CCC CAG GAC GAC ACG CGC GAC GAG TCG ACA GAC GAA GAG
Met Val Ser Tyr Trp Asp Thr Gly Val Leu Leu Cys Ala Leu Leu Ser Cys Leu Leu Leu>

      70      80      90     100     110     120
      *      *      *      *      *      *
ACA GGA TCT AGT TCC GGA GGT AGA CCT TTC GTA GAG ATG TAC AGT GAA ATC CCC GAA ATT
TGT CCT AGA TCA AGG CCT CCA TCT GGA AAG CAT CTC TAC ATG TCA CTT TAG GGG CTT TAA
Thr Gly Ser Ser Ser Gly Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile>

     130     140     150     160     170     180
      *      *      *      *      *      *
ATA CAC ATG ACT GAA GGA AGG GAG CTC GTC ATT CCC TGC CGG GTT ACG TCA CCT AAC ATC
TAT GTG TAC TGA CTT CCT TCC CTC GAG CAG TAA GGG ACG GCC CAA TGC AGT GGA TTG TAG
Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser Pro Asn Ile>

     190     200     210     220     230     240
      *      *      *      *      *      *
ACT GTT ACT TTA AAA AAG TTT CCA CTT GAC ACT TTG ATC CCT GAT GGA AAA CGC ATA ATC
TGA CAA TGA AAT TTT TTC AAA GGT GAA CTG TGA AAC TAG GGA CTA CCT TTT GCG TAT TAG
Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile>

     250     260     270     280     290     300
      *      *      *      *      *      *
TGG GAC AGT AGA AAG GGC TTC ATC ATA TCA AAT GCA ACG TAC AAA GAA ATA GGG CTT CTG
ACC CTG TCA TCT TTC CCG AAG TAG TAT AGT TTA CGT TGC ATG TTT CTT TAT CCC GAA GAC
Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu>

     310     320     330     340     350     360
      *      *      *      *      *      *
ACC TGT GAA GCA ACA GTC AAT GGG CAT TTG TAT AAG ACA AAC TAT CTC ACA CAT CGA CAA
TGG ACA CTT CGT TGT CAG TTA CCC GTA AAC ATA TTC TGT TTG ATA GAG TGT GTA GCT GTT
Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg Gln>

     370     380     390     400     410     420
      *      *      *      *      *      *
ACC AAT ACA ATC ATA GAT GTC CAA ATA AGC ACA CCA CGC CCA GTC AAA TTA CTT AGA GGC
TGG TTA TGT TAG TAT CTA CAG GTT TAT TCG TGT GGT GCG GGT CAG TTT AAT GAA TCT CCG
Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Gln Ile Ser Thr Pro Arg Pro Val Lys Leu Leu Arg Gly>

     430     440     450     460     470     480
      *      *      *      *      *      *
CAT ACT CTT GTC CTC AAT TGT ACT GCT ACC ACT CCC TTG AAC ACG AGA GGT CAA ATG ACC
GTA TGA GAA CAG GAG TTA ACA TGA CGA TGG TGA GGG AAC TTG TGC TCT CAA GTT TAC TGG
His Thr Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Thr Thr Pro Leu Asn Thr Arg Val Gln Met Thr>

     490     500     510     520     530     540
      *      *      *      *      *      *
TGG AGT TAC CCT GAT GAA ATT GAC CAA AGC AAT TCC CAT GCC AAC ATA TTC TAC AGT GTT
ACC TCA ATG GGA CTA CTT TAA CTG GTT TCG TTA AGG GTA CGG TTG TAT AAG ATG TCA CAA
Trp Ser Tyr Pro Asp Glu Ile Asp Gln Ser Asn Ser His Ala Asn Ile Phe Tyr Ser Val>

```

550	560	570	580	590	600
* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
CTT ACT ATT GAC AAA ATG CAG AAC AAA GAC AAA GGA CTT TAT ACT TGT CGT GTA AGG AGT					
GAA TGA TAA CTG TTT TAC GTC TTG TTT CTG TTT CCT GAA ATA TGA ACA GCA CAT TCC TCA					
Leu Thr Ile Asp Lys Met Gln Asn Lys Asp Lys Gly Leu Tyr Thr Cys Arg Val Arg Ser>					
610	620	630	640	650	660
* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
GGA CCA TCA TTC AAA TCT GTT AAC ACC TCA GTG CAT ATA TAT GAT AAA GCA GGC CCG GGC					
CCT GGT AGT AAG TTT AGA CAA TTG TGG AGT CAC GTA TAT ATA CTA TTT CGT CCG GGC CCG					
Gly Pro Ser Phe Lys Ser Val Asn Thr Ser Val His Ile Tyr Asp Lys Ala Gly Pro Gly>					
670	680	690	700	710	720
* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
GAG CCC AAA TCT TGT GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA GCA CCT GAA CTC CTG					
CTC GGG TTT AGA ACA CTG TTT TGA GTG TGT ACG GGT GGC ACG GGT CGT GGA CTT GAG GAC					
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu>					
730	740	750	760	770	780
* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
GGG GGA CCG TCA GTC TTC CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACC CTC ATG ATC TCC CGG					
CCC CCT GGC AGT CAG AAG GAG AAG GGG GGT TTT GGG TTC CTG TGG GAG TAC TAG AGG GCC					
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg>					
790	800	810	820	830	840
* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
ACC CCT GAG GTC ACA TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAC GAA GAC OCT GAG GTC AAG TTC					
TGG GGA CTC CAG TGT ACG CAC CAC CAC CTG CAC TCG GTG CTT CTG GGA CTC CAG TTC AAG					
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe>					
850	860	870	880	890	900
* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
AAC TGG TAC GTG GAC GGC GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG					
TTG ACC ATG CAC CTG CCG CAC CTC CAC GTA TTA CCG TTC TGT TTC GGC GCC CTC CTC GTC					
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln>					
910	920	930	940	950	960
* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
TAC AAC AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAT					
ATG TTG TCG TGC ATG GCA CAC CAG TCG CAG GAG TGG CAG GAC GTG GTC CTG ACC GAC TTA					
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn>					
970	980	990	1000	1010	1020
* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GCC CTC CCA GCC CCC ATC GAG AAA ACC					
CCG TTC CTC ATG TTC ACG TTC CAG AGG TTG TTT CCG GAG GGT CCG GGG TAG CTC TTT TGG					
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr>					
1030	1040	1050	1060	1070	1080
* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAA CCA CAG GTG TAC ACC CTC CCC CCA TCC CGG					
TAG AGG TTT CCG TTT CCC GTC GGG GCT CTT GGT GTC CAC ATG TGG GAC GGG GGT AGG GCC					
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg>					

1090				1100				1110				1120				1130				1140				
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
GAT	GAG	CTG	ACC	AAG	AAC	CAG	GTC	AGC	CTG	ACC	TGC	CTG	GTC	AAA	GGC	TTC	TAT	CCC	AGC					
CTA	CTC	GAC	TGG	TTC	TTG	GTC	CAG	TCG	GAC	TGG	ACG	GAC	CAG	TTT	CCG	AAG	ATA	GGG	TOG					
Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	>				
1150				1160				1170				1180				1190				1200				
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
GAC	ATC	GCC	GTG	GAG	TGG	GAG	AGC	AAT	GGG	CAG	CCG	GAG	AAC	AAC	TAC	AAG	ACC	ACG	CCT					
CTG	TAG	CGG	CAC	CTC	ACC	CTC	TCG	TTA	CCC	GTC	GGC	CTC	TTG	TTG	ATG	TTC	TGG	TGC	GGA					
Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	>				
1210				1220				1230				1240				1250				1260				
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
CCC	GTG	CTG	GAC	TCC	GAC	GGC	TCC	TTC	TTC	CTC	TAC	AGC	AAG	CTC	ACC	GTG	GAC	AAG	AGC					
GGG	CAC	GAC	CTG	AGG	CTG	CCG	AGG	AAG	AAG	GAG	ATG	TOG	TTC	GAG	TGG	CAC	CTG	TTC	TOG					
Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	>				
1270				1280				1290				1300				1310				1320				
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
AGG	TGG	CAG	CAG	GGG	AAC	GTC	TTC	TCA	TGC	TCC	GTG	ATG	CAT	GAG	GCT	CTG	CAC	AAC	CAC					
TCC	ACC	GTC	GTC	CCC	TTG	CAG	AAG	AGT	ACG	AGG	CAC	TAC	GTA	CTC	CGA	GAC	GTG	TTG	GTG					
Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	>				
1330				1340				1350																
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*													
TAC	ACG	CAG	AAG	AGC	CTC	TCC	CTG	TCT	CCG	GGT	AAA	TGA												
ATG	TGC	GTC	TTC	TCG	GAG	AGG	GAC	AGA	GGC	CCA	TTT	ACT												
Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	***>												

SEQ ID NO. 4

```

      10      20      30      40      50      60
      *      *      *      *      *      *
ATG GTC AGC TAC TGG GAC ACC GGG GTC CTG CTG TGC GCG CTG CTC AGC TGT CTG CTT CTC
TAC CAG TCG ATG ACC CTG TGG CCC CAG GAC GAC ACG CGC GAC GAG TCG ACA GAC GAA GAG
Met Val Ser Tyr Trp Asp Thr Gly Val Leu Leu Cys Ala Leu Leu Ser Cys Leu Leu Leu>

      70      80      90     100     110     120
      *      *      *      *      *      *
ACA GGA TCT AGT TCC GGA GGT AGA CCT TTC GTA GAG ATG TAC AGT GAA ATC CCC GAA ATT
TGT CCT AGA TCA AGG CCT CCA TCT GGA AAG CAT CTC TAC ATG TCA CTT TAG GGG CTT TAA
Thr Gly Ser Ser Ser Gly Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile>

     130     140     150     160     170     180
      *      *      *      *      *      *
ATA CAC ATG ACT GAA GGA AGG GAG CTC GTC ATT CCC TGC CGG GTT ACG TCA CCT AAC ATC
TAT GTG TAC TGA CTT CCT TCC CTC GAG CAG TAA GGG ACG GCC CAA TGC AGT GGA TTG TAG
Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser Pro Asn Ile>

     190     200     210     220     230     240
      *      *      *      *      *      *
ACT GTT ACT TTA AAA AAG TTT CCA CTT GAC ACT TTG ATC CCT GAT GGA AAA CGC ATA ATC
TGA CAA TGA AAT TTT TTC AAA GGT GAA CTG TGA AAC TAG GGA CTA CCT TTT GCG TAT TAG
Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile>

     250     260     270     280     290     300
      *      *      *      *      *      *
TGG GAC AGT AGA AAG GGC TTC ATC ATA TCA AAT GCA ACG TAC AAA GAA ATA GGG CTT CTG
ACC CTG TCA TCT TTC CCG AAG TAG TAT AGT TTA CGT TGC ATG TTT CTT TAT CCC GAA GAC
Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu>

     310     320     330     340     350     360
      *      *      *      *      *      *
ACC TGT GAA GCA ACA GTC AAT GGG CAT TTG TAT AAG ACA AAC TAT CTC ACA CAT CGA CAA
TGG ACA CTT CGT TGT CAG TTA CCC GTA AAC ATA TTC TGT TTG ATA GAG TGT GTA GCT GTT
Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg Gln>

     370     380     390     400     410     420
      *      *      *      *      *      *
ACC AAT ACA ATC ATA GAT GTC CAA ATA AGC ACA CCA CGC CCA GTC AAA TTA CTT AGA GGC
TGG TTA TGT TAG TAT CTA CAG GTT TAT TCG TGT GGT GCG GGT CAG TTT AAT GAA TCT CCG
Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Gln Ile Ser Thr Pro Arg Pro Val Lys Leu Leu Arg Gly>

     430     440     450     460     470     480
      *      *      *      *      *      *
CAT ACT CTT GTC CTC AAT TGT ACT GCT ACC ACT CCC TTG AAC ACG AGA GTT CAA ATG ACC
GTA TGA GAA CAG GAG TTA ACA TGA CGA TGG TGA GGG AAC TTG TGC TCT CAA GTT TAC TGG
His Thr Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Thr Thr Pro Leu Asn Thr Arg Val Gln Met Thr>

     490     500     510     520     530     540
      *      *      *      *      *      *
TGG AGT TAC CCT GAT GAA AAA AAT AAG AGA GCT TCC GTA AGG CGA CGA ATT GAC CAA AGC
ACC TCA ATG GGA CTA CTT TTT TTA TTC TCT CGA AGG CAT TCC GCT GCT TAA CTG GTT TCG
Trp Ser Tyr Pro Asp Glu Lys Asn Lys Arg Ala Ser Val Arg Arg Arg Ile Asp Gln Ser>

```

```

      550      560      570      580      590      600
      *      *      *      *      *      *
AAT TCC CAT GCC AAC ATA TTC TAC AGT GTT CTT ACT ATT GAC AAA ATG CAG AAC AAA GAC
TTA AGG GTA CGG TTG TAT AAG ATG TCA CAA GAA TGA TAA CTG TTT TAC GTC TTG TTT CTG
Asn Ser His Ala Asn Ile Phe Tyr Ser Val Leu Thr Ile Asp Lys Met Gln Asn Lys Asp>

      610      620      630      640      650      660
      *      *      *      *      *      *
AAA GGA CTT TAT ACT TGT CGT GTA AGG AGT GGA CCA TCA TTC AAA TCT GTT AAC ACC TCA
TTT CCT GAA ATA TGA ACA GCA CAT TCC TCA CCT GGT AGT AAG TTT AGA CAA TTG TGG AGT
Lys Gly Leu Tyr Thr Cys Arg Val Arg Ser Gly Pro Ser Phe Lys Ser Val Asn Thr Ser>

      670      680      690      700      710      720
      *      *      *      *      *      *
GTG CAT ATA TAT GAT AAA GCA GGC CCG GGC GAG CCC AAA TCT TGT GAC AAA ACT CAC ACA
CAC GTA TAT ATA CTA TTT CGT CCG GGC CCG CTC GGG TTT AGA ACA CTG TTT TGA GTG TGT
Val His Ile Tyr Asp Lys Ala Gly Pro Gly Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr>

      730      740      750      760      770      780
      *      *      *      *      *      *
TGC CCA CCG TGC CCA GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC TTC CTC TTC CCC CCA
ACG GGT GGC ACG GGT CGT GGA CTT GAG GAC CCC CCT GGC AGT CAG AAG GAG AAG GGG GGT
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro>

      790      800      810      820      830      840
      *      *      *      *      *      *
AAA CCC AAG GAC ACC CTC ATG ATC TCC CCG ACC CCT GAG GTC ACA TGC GTG GTG GTG GAC
TTT GGG TTC CTG TGG GAG TAC TAG AGG GCC TGG GGA CTC CAG TGT ACG CAC CAC CAC CTG
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp>

      850      860      870      880      890      900
      *      *      *      *      *      *
GTG AGC CAC GAA GAC OCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC GTG GAG GTG CAT
CAC TCG GTG CTT CTG GGA CTC CAG TTC AAG TTG ACC ATG CAC CTG CCG CAC CTC CAC GTA
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His>

      910      920      930      940      950      960
      *      *      *      *      *      *
AAT GCC AAG ACA AAG CCG CCG GAG GAG CAG TAC AAC AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC
TTA CGG TTC TGT TTC GGC GCC CTC CTC GTC ATG TTG TCG TGC ATG GCA CAC CAG TCG CAG
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val>

      970      980      990      1000      1010      1020
      *      *      *      *      *      *
CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAT GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC
GAG TGG CAG GAC GTG GTC CTG ACC GAC TTA CCG TTC CTC ATG TTC ACG TTC CAG AGG TTG
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn>

      1030      1040      1050      1060      1070      1080
      *      *      *      *      *      *
AAA GCC CTC CCA GCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAA
TTT CGG GAG GGT CCG GGG TAG CTC TTT TGG TAG AGG TTT CCG TTT CCC GTC GGG GCT CTT
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu>

```

1090	1100	1110	1120	1130	1140
* * *	* *	* *	* *	* *	* *
CCA CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CGG GAT GAG CTG ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG					
GGT GTC CAC ATG TGG GAC GGG GGT AGG GCC CTA CTC GAC TGG TTC TTG GTC CAG TCG GAC					
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu>					
1150	1160	1170	1180	1190	1200
* * *	* *	* *	* *	* *	* *
ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG					
TGG ACG GAC CAG TTT CCG AAG ATA GGG TCG CTG TAG CCG CAC CTC ACC CTC TCG TTA CCC					
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly>					
1210	1220	1230	1240	1250	1260
* * *	* *	* *	* *	* *	* *
CAG CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC					
GTC GGC CTC TTG TTG ATG TTC TGG TGC GGA GGG CAC GAC CTG AGG CTG CCG AGG AAG AAG					
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe>					
1270	1280	1290	1300	1310	1320
* * *	* *	* *	* *	* *	* *
CTC TAC AGC AAG CTC ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC					
GAG ATG TCG TTC GAG TGG CAC CTG TTC TCG TCC ACC GTC GTC CCC TTG CAG AAG AGT ACG					
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys>					
1330	1340	1350	1360	1370	1380
* * *	* *	* *	* *	* *	* *
TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CCG					
AGG CAC TAC GTA CTC CGA GAC GTG TTG GTG ATG TGC GTC TTC TCG GAG AGG GAC AGA GGC					
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro>					
* GGT AAA TGA CCA TTT ACT Gly Lys ***>					

SEQ ID NO. 5

```

      10      20      30      40      50      60
      *      *      *      *      *      *
ATG GTC AGC TAC TGG GAC ACC GGG GTC CTG CTG TGC GCG CTG CTC AGC TGT CTG CTT CTC
TAC CAG TCG ATG ACC CTG TGG CCC CAG GAC GAC ACG CGC GAC GAG TCG ACA GAC GAA GAG
Met Val Ser Tyr Trp Asp Thr Gly Val Leu Leu Cys Ala Leu Leu Ser Cys Leu Leu Leu>

      70      80      90     100     110     120
      *      *      *      *      *      *
ACA GGA TCT AGT TCA GGT TCA AAA TTA AAA GAT CCT GAA CTG AGT TTA AAA GGC ACC CAG
TGT CCT AGA TCA AGT CCA AGT TTT AAT TTT CTA GGA CTT GAC TCA AAT TTT CCG TGG GTC
Thr Gly Ser Ser Ser Gly Ser Lys Leu Lys Asp Pro Glu Leu Ser Leu Lys Gly Thr Gln>

     130     140     150     160     170     180
      *      *      *      *      *      *
CAC ATC ATG CAA GCA GGC CAG ACA CTG CAT CTC CAA TGC AGG GGG GAA GCA GCC CAT AAA
GTG TAG TAC GTT CGT CCG GTC TGT GAC GTA GAG GTT ACG TCC CCC CTT CGT CCG GTA TTT
His Ile Met Gln Ala Gly Gln Thr Leu His Leu Gln Cys Arg Gly Glu Ala Ala His Lys>

     190     200     210     220     230     240
      *      *      *      *      *      *
TGG TCT TTG CCT GAA ATG GTG AGT AAG GAA AGC GAA AGG CTG AGC ATA ACT AAA TCT GCC
ACC AGA AAC GGA CTT TAC CAC TCA TTC CTT TCG CTT TCC GAC TCG TAT TGA TTT AGA CGG
Trp Ser Leu Pro Glu Met Val Ser Lys Glu Ser Glu Arg Leu Ser Ile Thr Lys Ser Ala>

     250     260     270     280     290     300
      *      *      *      *      *      *
TGT GGA AGA AAT GGC AAA CAA TTC TGC AGT ACT TTA ACC TTG AAC ACA GCT CAA GCA AAC
ACA CCT TCT TTA CCG TTT GTT AAG ACG TCA TGA AAT TGG AAC TTG TGT CGA GTT CGT TTG
Cys Gly Arg Asn Gly Lys Gln Phe Cys Ser Thr Leu Thr Leu Asn Thr Ala Gln Ala Asn>

     310     320     330     340     350     360
      *      *      *      *      *      *
CAC ACT GGC TTC TAC AGC TGC AAA TAT CTA GCT GTA CCT ACT TCA AAG AAG AAG GAA ACA
GTG TGA CCG AAG ATG TCG ACG TTT ATA GAT CGA CAT GGA TGA AGT TTC TTC TTC CTT TGT
His Thr Gly Phe Tyr Ser Cys Lys Tyr Leu Ala Val Pro Thr Ser Lys Lys Lys Glu Thr>

     370     380     390     400     410     420
      *      *      *      *      *      *
GAA TCT GCA ATC TAT ATA TTT ATT AGT GAT ACA GGT AGA OCT TTC GTA GAG ATG TAC AGT
CTT AGA CGT TAG ATA TAT AAA TAA TCA CTA TGT CCA TCT GGA AAG CAT CTC TAC ATG TCA
Glu Ser Ala Ile Tyr Ile Phe Ile Ser Asp Thr Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser>

     430     440     450     460     470     480
      *      *      *      *      *      *
GAA ATC CCC GAA ATT ATA CAC ATG ACT GAA GGA AGG GAG CTC GTC ATT CCC TGC CGG GTT
CTT TAG GGG CTT TAA TAT GTG TAC TGA CTT CCT TCC CTC GAG CAG TAA GGG ACG GCC CAA
Glu Ile Pro Glu Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val>

     490     500     510     520     530     540
      *      *      *      *      *      *
ACG TCA CCT AAC ATC ACT GTT ACT TTA AAA AAG TTT CCA CTT GAC ACT TTG ATC CCT GAT
TGC AGT GGA TTG TAG TGA CAA TGA AAT TTT TTC AAA GGT GAA CTG TGA AAC TAG GGA CTA
Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp>

```

```

      550      560      570      580      590      600
      *      *      *      *      *      *
GGA AAA CGC ATA ATC TGG GAC AGT AGA AAG GGC TTC ATC ATA TCA AAT GCA ACG TAC AAA
CCT TTT GCG TAT TAG ACC CTG TCA TCT TTC CCG AAG TAG TAT AGT TTA CGT TGC ATG TTT
Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys>

      610      620      630      640      650      660
      *      *      *      *      *      *
GAA ATA GGG CTT CTG ACC TGT GAA GCA ACA GTC AAT GGG CAT TTG TAT AAG ACA AAC TAT
CTT TAT CCC GAA GAC TGG ACA CTT CGT TGT CAG TTA CCC GTA AAC ATA TTC TGT TTG ATA
Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr>

      670      680      690      700      710      720
      *      *      *      *      *      *
CTC ACA CAT CGA CAA ACC AAT ACA ATC ATA GAT GTC CAA ATA AGC ACA CCA CGC CCA GTC
GAG TGT GTA GCT GTT TGG TTA TGT TAG TAT CTA CAG GTT TAT TCG TGT GGT GCG GGT CAG
Leu Thr His Arg Gln Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Gln Ile Ser Thr Pro Arg Pro Val>

      730      740      750      760      770      780
      *      *      *      *      *      *
AAA TTA CTT AGA GGC CAT ACT CTT GTC CTC AAT TGT ACT GCT ACC ACT CCC TTG AAC ACG
TTT AAT GAA TCT CCG GTA TGA GAA CAG GAG TTA ACA TGA CGA TGG TGA GGG AAC TTG TGC
Lys Leu Leu Arg Gly His Thr Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Thr Thr Pro Leu Asn Thr>

      790      800      810      820      830      840
      *      *      *      *      *      *
AGA GTT CAA ATG ACC TGG AGT TAC CCT GAT GAA AAA AAT AAG AAC GCT TCC GTA AGG CGA
TCT CAA GTT TAC TGG ACC TCA ATG GGA CTA CTT TTT TTA TTC TTG CGA AGG CAT TCC GCT
Arg Val Gln Met Thr Trp Ser Tyr Pro Asp Glu Lys Asn Lys Asn Ala Ser Val Arg Arg>

      850      860      870      880      890      900
      *      *      *      *      *      *
CGA ATT GAC CAA AGC AAT TCC CAT GCC AAC ATA TTC TAC AGT GTT CTT ACT ATT GAC AAA
GCT TAA CTG GTT TCG TTA AGG GTA CCG TTG TAT AAG ATG TCA CAA GAA TGA TAA CTG TTT
Arg Ile Asp Gln Ser Asn Ser His Ala Asn Ile Phe Tyr Ser Val Leu Thr Ile Asp Lys>

      910      920      930      940      950      960
      *      *      *      *      *      *
ATG CAG AAC AAA GAC AAA GGA CTT TAT ACT TGT CGT GTA AGG AGT GGA CCA TCA TTC AAA
TAC GTC TTG TTT CTG TTT CCT GAA ATA TGA ACA GCA CAT TCC TCA CCT GGT AGT AAG TTT
Met Gln Asn Lys Asp Lys Gly Leu Tyr Thr Cys Arg Val Arg Ser Gly Pro Ser Phe Lys>

      970      980      990      1000      1010      1020
      *      *      *      *      *      *
TCT GTT AAC ACC TCA GTG CAT ATA TAT GAT AAA GCA GGC CCG GGC GAG CCC AAA TCT TGT
AGA CAA TTG TGG AGT CAC GTA TAT ATA CTA TTT CGT CCG GGC CCG CTC GGG TTT AGA ACA
Ser Val Asn Thr Ser Val His Ile Tyr Asp Lys Ala Gly Pro Gly Glu Pro Lys Ser Cys>

      1030      1040      1050      1060      1070      1080
      *      *      *      *      *      *
GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC
CTG TTT TGA GTG TGT ACG GGT GGC ACG GGT CGT GGA CTT GAG GAC CCC CCT GGC AGT CAG
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val>

```

1090				1100				1110				1120				1130				1140			
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
TTC	CTC	TTC	CCC	CCA	AAA	CCC	AAG	GAC	ACC	CTC	ATG	ATC	TCC	CGG	ACC	CCT	GAG	GTC	ACA				
AAG	GAG	AAG	GGG	GGT	TTT	GGG	TTC	CTG	TGG	GAG	TAC	TAG	AGG	GCC	TGG	GGA	CTC	CAG	TGT				
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr>				
1150				1160				1170				1180				1190				1200			
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
TGC	GTG	GTG	GTG	GAC	GTG	AGC	CAC	GAA	GAC	CCT	GAG	GTC	AAG	TTC	AAC	TGG	TAC	GTG	GAC				
ACG	CAC	CAC	CAC	CTG	CAC	TCG	GTG	CTT	CTG	GGA	CTC	CAG	TTC	AAG	TTG	ACC	ATG	CAC	CTG				
Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp>				
1210				1220				1230				1240				1250				1260			
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
GGC	GTG	GAG	GTG	CAT	AAT	GCC	AAG	ACA	AAG	CCG	CGG	GAG	GAG	CAG	TAC	AAC	AGC	ACG	TAC				
CCG	CAC	CTC	CAC	GTA	TTA	CGG	TTC	TGT	TTC	GGC	GCC	CTC	CTC	GTC	ATG	TTG	TCG	TGC	ATG				
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr>				
1270				1280				1290				1300				1310				1320			
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CGT	GTG	GTC	AGC	GTC	CTC	ACC	GTC	CTG	CAC	CAG	GAC	TGG	CTG	AAT	GGC	AAG	GAG	TAC	AAG				
GCA	CAC	CAG	TCG	CAG	GAG	TGG	CAG	GAC	GTG	GTC	CTG	ACC	GAC	TTA	CCG	TTC	CTC	ATG	TTC				
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys>				
1330				1340				1350				1360				1370				1380			
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
TGC	AAG	GTC	TCC	AAC	AAA	GCC	CTC	CCA	GCC	CCC	ATC	GAG	AAA	ACC	ATC	TCC	AAA	GCC	AAA				
ACG	TTC	CAG	AGG	TTG	TTT	CGG	GAG	GGT	CGG	GGG	TAG	CTC	TTT	TGG	TAG	AGG	TTT	CGG	TTT				
Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys>				
1390				1400				1410				1420				1430				1440			
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
GGG	CAG	CCC	CGA	GAA	CCA	CAG	GTG	TAC	ACC	CTG	CCC	CCA	TCC	CGG	GAT	GAG	CTG	ACC	AAG				
CCC	GTC	GGG	GCT	CTT	GGT	GTC	CAC	ATG	TGG	GAC	GGG	GGT	AGG	GCC	CTA	CTC	GAC	TGG	TTC				
Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys>				
1450				1460				1470				1480				1490				1500			
*	*	*	*	*	*</																		

1630				1640				1650				1660				1670				1680			
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
AAC	GTC	TTC	TCA	TGC	TCC	GTG	ATG	CAT	GAG	GCT	CTG	CAC	AAC	CAC	TAC	ACG	CAG	AAG	AGC				
TTG	CAG	AAG	AGT	ACG	AGG	CAC	TAC	GTA	CTC	CGA	GAC	GTG	TTG	GTG	ATG	TGC	GTC	TTC	TCG				
Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	>			

1690				1700			
*	*	*	*	*	*	*	*
CTC	TCC	CAG	TCT	GGG	GCT	AAA	TAA
GAG	AGG	GAG	AGA	GCC	CCA	TCT	ACT
Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	***>

SEQ ID NO. 6

>EcoRI_site
|

10 20 30 40 50 60 70 80
AAGCTTGGGCTGCAGGTCGATCGACTCTAGAGGATCGATCCCCGGGGGAGCTCGAATTGGCAACCACCATGGTCAGCTAC
TTCGAACCCGACGTCCAGCTAGCTGAGATCTCCTAGCTAGGGGGCCCGCTCGAGCTTAAGCGTTGGTGGTACCAGTCGATG
M V S Y>
1 4

>BspEI_bridge
|

90 100 110 120 130 140 150 160
TGGGACACCGGGGTCTGCTGTGCGCGCTGCTCAGCTGTCTGCTTCTCAGAGATCTAGTTCCGGAGGTAGACCTTTTCGT
ACCCTGTGGCCCCAGGACGACACGCGCGACGAGTCGACAGACGAAGAGTGTCTCTAGATCAAGGCCTCCATCTGGAAAGCA
W D T G V L L C A L L S C L L L T G S S>
FLT1 SS

S G>

G R P F V>
31

170 180 190 200 210 220 230 240
AGAGATGTACAGTGAAATCCCCGAAATTATACACATGACTGAAGGAAGGGAGCTCGTTCATTCCTGCCGGGTACGTCAC
TCTCTACATGTCACTTTAGGGGCTTTAATATGTGTACTGACTTCCCTTCCTCGAGCAGTAAGGGACGGCCCCAATGCAGTG
E M Y S E I P E I I H M T E G R E L V I P C R V T S>
57
HFLT1 D2

250 260 270 280 290 300 310 320
CTAACATCACTGTTACTTTAAAAAAGTTTCCACTTGACACTTTTGATCCCTGATGGAAAACGCATAATCTGGGACAGTAGA
GATTGTAGTGACAATGAAATTTTTCACAAAGGTGAACGTGTGAAACTAGGGACTACCTTTTGGCGTATTAGACCTGTTCATCT
P N I T V T L K K F P L D T L I P D G K R I I W D S R>
84
HFLT1 D2

330 340 350 360 370 380 390 400
AAGGGCTTCATCATATCAAATGCAACGTACAAAGAAATAGGGCTTCTGACCTGTGAAGCAACAGTCAATGGGCATTGTGTA
TTCCCGAAGTAGTATAGTTTACGTTGCATGTTTCTTTATCCCGAAGACTGGACACTTCGTTGTCACTTACCGGTAAACAT
K G F I I S N A T Y K E I G L L T C E A T V N G H L Y>
111
HFLT1 D2

410 420 430 440 450 460 470 480
TAAGACAACTATCTCACACATCGACAAACCAATACAATCATAGATGTGGTTCCTGAGTCCGTCTCATGGAATTGAACTAT
ATTCTGTTTGATAGAGTGTGTAGCTGTTTGGTTATGTGTATCTACACCAAGACTCAGGCAGAGTACCTTAACTTGATA
K T N Y L T H R Q T N T I I D>
HFLT1 D2

V V L S P S H G I E L>
137
HFLK1 D3

490 500 510 520 530 540 550 560
 CTGTTGGAGAAAAGCTTGTCTTAAATTGTACAGCAAGAACTGAACTAAATGTGGGGATTGACTTCAACTGGGAATACCCT
 GACAACCTCTTTTCGAACAGAATTTAACATGTCGTTCTTGACTTGATTACACCCCTAACTGAAGTTGACCCCTTATGGGA
 S V G E K L V L N C T A R T E L N V G I D F N W E Y P>
 164
 _____HFLK1 D3_____>

570 580 590 600 610 620 630 640
 TCTTCGAAGCATCAGCATAAGAACTTGTAACCCGAGACCTAAAAACCCAGTCTGGGAGTGAAGATGAAGAAATTTTGTAG
 AGAAGCTTCGTAGTCGTATTCTTTGAACATTTGGCTCTGGATTTTTGGGTCAGACCCCTCACTCTACTTCTTTAAAAACTC
 S S K H Q H K K L V N R D L K T Q S G S E M K K F L S>
 191
 _____HFLK1 D3_____>

650 660 670 680 690 700 710 720
 CACCTTAACTATAGATGGTGTAAACCCGAGTGACCAAGGATTGTACACCTGTGCAGCATCCAGTGGGCTGATGACCAAGA
 GTGGAATTGATATCTACCACATTTGGGCTCACTGGTTCTTAACATGTGGACACGTCTAGGTCAACCCGACTACTGGTTCT
 T L T I D G V T R S D Q G L Y T C A A S S G L M T K>
 217
 _____HFLK1 D3_____>

>Srf_Bridge_

730 740 750 760 770 780 790 800
 AGAACAGCACATTTGTTCAGGGTCCATGAAAAGGGCCCGGGGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAA
 TCTTGTGCGTGTAAACAGTCCAGGTACTTTTCCCGGGCCCGCTGTTTGTAGTGTGTACGGGTGGCAGGGTTCGTGGACTT
 K N S T F V R V H E K>
 _____HFLK1 D3_____>

G P G>

D K T H T C P P C P A P E>
 244
 _____FCAC1 (A)_____>

810 820 830 840 850 860 870 880
 CTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAC
 GAGGACCCCCCTGGCAGTCAGAAGGAGAAGGGGGGTTTGGGTTCCTGTGGGAGTACTAGAGGGCCTGGGGACTCCAGTG
 L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T>
 271
 _____FCAC1 (A)_____>

890 900 910 920 930 940 950 960
 ATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATG
 TACGCACCAACCTGCACTCGGTGCTTCTGGGACTCCAGTTCAAGTTGACCATGCACCTGCCGCACCTCCACGTATTAC
 C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N>
 297
 _____FCAC1 (A)_____>

970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040
 CCAAGACAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTTCAGCGTCCCTCACCGTCCCTGCACCAGGACTGG
 GGTCTCTGTTTCGGCGCCCTCCCTCGTCATGTTGTGCGTGCATGGCACACAGTCCGAGGAGTGGCAGGACGTGGTCTCTGACC
 A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W>
 324
 _____FCAC1 (A)_____>

1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120
 CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAA
 GACTTACCGTTCCTCATGTTACGTTCCAGAGGTGTGTTTCGGGAGGGTTCGGGGGTAGCTCTTTTGGTAGAGGTTTCGGTT
 L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K>
 351

FCAC1 (A)

>A>C_A_allotype

>G>T_A_allotype

1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 AGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCT
 TCCCGTCGGGGCTCTTGGTGTCCACATGTGGGACGGGGGTAGGGCCCTACTCGACTGGTTCCTTGGTCCAGTCCGACTGGA
 G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T>
 377

FCAC1 (A)

1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280
 GCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACC
 CGGACCAGTTTCCGAAGATAGGGTCCGTGTAGCGGCACCTCACCCCTCTCGTTACCCGTCCGGCTCTTGTGTGATGTTCTGG
 C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T>
 404

FCAC1 (A)

>T>C

1290 1300 1310 1320 1330 1340 1350 1360
 ACGCTCCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAAGAGCAGGTGGCAGCAGGG
 TCGGAGGGCAGACCTGAGGCTGCCGAGGAGAGAGGAGATATCGTTCCAGTGGCACCTGTTCTCGTCCACCGTCTGTTCC
 T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G>
 431

FCAC1 (A)

1370 1380 1390 1400 1410 1420 1430 1440
 GAACGTCCTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAAGAGCCCTCTCCCTGTCTCCGGGT
 CTTCGAGAAGAGTACGAGGCACCTACGTACTCCGAGACGTGTGGTGTGATGTGCGTCTTCTCGGAGAGGGACAGAGGCCCAT
 N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G>
 457

FCAC1 (A)

>NotI_site

|1450

AATGAGCGGCGCG

TTACTCGCGGCG

K *>

458

SEQ ID NO. 7

>EcoRI_site

10 20 30 40 50 60 70 80

AAGCTTGGGCTGCAGGTGATCGACTCTAGAGGATCGATCCCGGGCGAGCTCGAATTCGCAACCACCATGGTCAGCTAC
TTCGAACCCGACGTCAGCTAGCTGAGATCTCCTAGCTAGGGGCCCGCTCGAGCTTAAGCGTTGGTGGTACCACTCGATG
M V S Y>
1 4

>BspEI_bridge

90 100 110 120 130 140 150 160

TGGGACACCGGGGTCCTGCTGTGCGCGCTGCTCAGCTGTCTGCTTCTCACAGGATCTAGTTCCGGAGGTAGACCTTTCGT
ACCCGTGTGGCCCCAGGACGACACGCGCGACGATCGACAGACGAAGAGTGTCTAGATCAAGGCCTCCATCTCGAAAGCA
W D T G V L L C A L L S C L L L T G S S>
_____ FLT1 SIGNAL SEQUENCE _____>
S G>
_____>
G R P F V>
31

170 180 190 200 210 220 230 240

AGAGATGTACAGTGAAATCCCGAAATTATACACATGACTGAAGGAAGGGAGCTCGTTCATTCCTGCGGGGTTACGTCAC
TCTCTACATGTCACTTTAGGGGCTTTAATATGTGTACTGACTTCCTTCCTCGAGCAGTAAGGGACGGCCCAATGCAGTG
E M Y S E I P E I I H M T E G R E L V I P C R V T S>
57

_____ FLT1 IG DOMAIN 2 _____>

250 260 270 280 290 300 310 320

CTACATCACTGTTACTTTAAAAAAGTTTCCACTTGACACTTTGATCCCTGATGGAAAACGCATAATCTGGGACAGTAGA
GATTGTAGTGACAATGAAATTTTTCAAAGGTGAAGTGTGAACTAGGGACTACCTTTTGOGTATTAGACCTGTCTATCT
P N I T V T L K K F P L D T L I P D G K R I I W D S R>
84

_____ FLT1 IG DOMAIN 2 _____>

330 340 350 360 370 380 390 400

AAGGGCTTCATCATATCAAATGCAACGTACAAAGAAATAGGGCTTCTGACCTGTGAAGCAACAGTCAATGGGCATTGTGA
TTCCCGAAGTAGTATAGTTTACGTTGCATGTTTCCTTATCCCGAAGACTGGACACTTCGTTGTTCAGTTACCCGTAACAT
K G F I I S N A T Y K E I G L L T C E A T V N G H L Y>
111

_____ FLT1 IG DOMAIN 2 _____>

410 420 430 440 450 460 470 480

TAAGACAACTATCTCACACATCGACAAACCAATACATCATAGATATCCAGCTGTTGOCAGGAAGTCGCTGGAGCTGC
ATTCTGTTTGATAGAGTGTGTAGCTGTTTGGTTATGTTAGTATCTATAGGTGACAAACGGGTCCTTCAGCGACCTCGACG
K T N Y L T H R Q T N T I I D>
_____ FLT1 IG DOMAIN 2 _____>
I Q L L P R K S L E L>
137

_____ VEGFR3 (FLT4) IG DOMAIN 3 _____>

490 500 510 520 530 540 550 560
 TGGTAGGGGAGAAGCTGGTCCTCAACTGCACCGTGTGGGCTGAGTTTAACTCAGGTGTCACCTTTGACTGGGACTACCCA
 ACCATCCCCTCTTCGACCAGGAGTTGACGTGGCACACCCGACTCAAATTGAGTCCACAGTGGAAGTGAACCTGATGGGT
 L V G E K L V L N C T V W A E F N S G V T F D W D Y P>
 164

____VEGFR3 (FLT4) IG DOMAIN 3____>

570 580 590 600 610 620 630 640
 GGGAGCAGGCAGAGCGGGGTAAGTGGGTGCCCGAGCGACGCTCCCAACAGACCCACACAGAAGTCTCCAGCATCCTGAC
 CCCTTCGTCCGTCTCGCCCCATTCACCCACGGGCTCGCTGCGAGGGTTGTCTGGGTGTGTCTTGAGAGGTCTGAGGACTG
 G K Q A E R G K W V P E R R S Q Q T H T E L S S I L T>
 191

____VEGFR3 (FLT4) IG DOMAIN 3____>

650 660 670 680 690 700 710 720
 CATCCACAACGTCAGCCAGCAGACCTGGGCTCGTATGTGTGCAAGGCCAACAAACGGCATCCAGCGATTTCGGGAGAGCA
 GTAGGTGTTGCAGTCCGTTCGTGCTGGACCGAGCATACACAGTTCCGGTTGTGTCCTAGGTTCGCTAAAGCCCTCTCGT
 I H N V S Q H D L G S Y V C K A N N G I Q R F R E S>
 217

____VEGFR3 (FLT4) IG DOMAIN 3____>

730 740 750 760 770 780 790 800
 CCGAGGTCATTGTGCATGAAATGGCCCGGGGACAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACCTCCTGGGG
 GGCTCCAGTAACACGTACTTTTACCGGGCCCGCTGTTTGTAGTGTGTACGGGTGGCACGGGTCTGAGGACTTGAGGACCCC
 T E V I V H E N>

____VEGFR3 (FLT4) IG____>

G P G>

____>
 D K T H T C P P C P A P E L L G>
 244

____FCAC1 - A ALLOTYPE____>

810 820 830 840 850 860 870 880
 GGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGT
 CCTGGCAGTCAGAAGGAGAGAGGGGGTTTGGGTTCTGTGGGAGTACTAGAGGGCCTGGGGACTCCAGTGTACGCACCA
 G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V>
 271

____FCAC1 - A ALLOTYPE____>

890 900 910 920 930 940 950 960
 GGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAA
 CCACCTGCACCTCGGTGCTTCTGGGACTCCAGTTCAAGTTGACCATGCACCTGCCGCACCTCCACGTATTACGGTTCGTGT
 V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T>
 297

____FCAC1 - A ALLOTYPE____>

970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040
 AGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAGCTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGC
 TCGGCGCCCTCTCTGTCATGTTGTCTGTCATGGCACACCAAGTCGCAGGAGTGGCAGGACGTGGTCTCTGACCGACTTACCG
 K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G>
 324

____FCAC1 - A ALLOTYPE____>

1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120
 AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCC
 TTCCTCATGTTACAGTTCAGAGGTGTGTTTCGGGAGGGTCGGGGGTAGCTCTTTTGGTAGAGGTTTCGGTTTCCCGTCGG
 K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P>
 351

FCAC1 - A ALLOTYPED

>A>C_A_allotype

>G>T_A_allotype

1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 COGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCA
 GGCTCTTGGTGTCCACATGTGGGACGGGGGTAGGGCCCTACTCGACTGGTTCTTGGTCCAGTCGGACTGGACGGACCACT
 R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V>
 377

FCAC1 - A ALLOTYPED

1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280
 AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAGACCACCCCTCCC
 TTCCGAAGATAGGGTCGCTGTAGGGCACCTCACCTCTCGTTACCCGTGGCCCTCTTGTGTGATGTTCTGGTGGCGAGGG
 K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P>
 404

FCAC1 - A ALLOTYPED

>T>C

1290 1300 1310 1320 1330 1340 1350 1360
 GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGCTCTT
 CACGACCTGAGGCTGCCGAGGAAGAAGGAGATATCGTTCGAGTGGCACCTGTTCTCGTCCACCGTCTGTCCTCCCTTGCAGAA
 V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F>
 431

FCAC1 - A ALLOTYPED

>NotI_site

1370 1380 1390 1400 1410 1420 1430 1440
 CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGCGG
 GAGTACGAGGCACTACGTACTCCGAGACGTGTGGTGTATGTGGTCTCTCTCGGAGAGGGACAGAGGCCCATTTACTCGCC
 S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K *>
 455

FCAC1 - A ALLOTYPED

CCGC
 GGCG

SEQ ID NO. 8

```

      10      20      30      40      50      60
      *      *      *      *      *      *
ATG GTC AGC TAC TGG GAC ACC GGG GTC CTG CTG TGC GCG CTG CTC AGC TGT CTG CTT CTC
TAC CAG TCG ATG ACC CTG TGG CCC CAG GAC GAC ACG CGC GAC GAG TCG ACA GAC GAA GAG
M  V  S  Y  W  D  T  G  V  L  L  C  A  L  L  S  C  L  L  L>
1_____5_____hFLT1 SIGNAL SEQUENCE_____15_____20>

      70      80      90      100      110      120
      *      *      *      *      *      *
ACA GGA TCT AGT TCC GGA AGT GAT ACC GGT AGA CCT TTC GTA GAG ATG TAC AGT GAA ATC
TGT CCT AGA TCA AGG CCT TCA CTA TGG CCA TCT GGA AAG CAT CTC TAC ATG TCA CTT TAG
T  G  S  S  S  G>
21_hFLT1 SIGNAL SEQ_26>

      S  D  T  G  R  P  F  V  E  M  Y  S  E  I>
     27_____30_____hFLT1 IG DOMAIN 2_____40>

     130      140      150      160      170      180
     *      *      *      *      *      *
CCC GAA ATT ATA CAC ATG ACT GAA GGA AGG GAG CTC GTC ATT CCC TGC CGG GTT ACG TCA
GGG CTT TAA TAT GTG TAC TGA CTT CCT TCC CTC GAG CAG TAA GGG ACG GCC CAA TGC AGT
P  E  I  I  H  M  T  E  G  R  E  L  V  I  P  C  R  V  T  S>
41_____45_____hFLT1 IG DOMAIN 2_____55_____60>

     190      200      210      220      230      240
     *      *      *      *      *      *
CCT AAC ATC ACT GTT ACT TTA AAA AAG TTT CCA CTT GAC ACT TTG ATC CCT GAT GGA AAA
GGA TTG TAG TGA CAA TGA AAT TTT TTC AAA GGT GAA CTG TGA AAC TAG GGA CTA CCT TTT
P  N  I  T  V  T  L  K  K  F  P  L  D  T  L  I  P  D  G  K>
61_____65_____hFLT1 IG DOMAIN 2_____75_____80>

     250      260      270      280      290      300
     *      *      *      *      *      *
CGC ATA ATC TGG GAC AGT AGA AAG GGC TTC ATC ATA TCA AAT GCA ACG TAC AAA GAA ATA
GCG TAT TAG ACC CTG TCA TCT TTC CCG AAG TAG TAT AGT TTA CGT TGC ATG TTT CTT TAT
R  I  I  W  D  S  R  K  G  F  I  I  S  N  A  T  Y  K  E  I>
81_____85_____hFLT1 IG DOMAIN 2_____95_____100>

     310      320      330      340      350      360
     *      *      *      *      *      *
GGG CTT CTG ACC TGT GAA GCA ACA GTC AAT GGG CAT TTG TAT AAG ACA AAC TAT CTC ACA
CCC GAA GAC TGG ACA CTT CGT TGT CAG TTA CCC GTA AAC ATA TTC TGT TTG ATA GAG TGT
G  L  L  T  C  E  A  T  V  N  G  H  L  Y  K  T  N  Y  L  T>
101_____105_____hFLT1 IG DOMAIN 2_____115_____120>

     370      380      390      400      410      420
     *      *      *      *      *      *
CAT CGA CAA ACC AAT ACA ATC ATA GAT GTG GTT CTG AGT CCG TCT CAT GGA ATT GAA CTA
GTA GCT GTT TGG TTA TGT TAG TAT CTA CAC CAA GAC TCA GGC AGA GTA CCT TAA CTT GAT
H  R  Q  T  N  T  I  I  D>
121_____hFLT1 IG DOMAIN 2_____129>

      V  V  L  S  P  S  H  G  I  E  L>
     130_____hFLKL IG DOMAIN 3_____140>

```

```

      430      440      450      460      470      480
      *      *      *      *      *      *
TCT GTT GGA GAA AAG CTT GTC TTA AAT TGT ACA GCA AGA ACT GAA CTA AAT GTG GGG ATT
AGA CAA CCT CTT TTC GAA CAG AAT TTA ACA TGT CGT TCT TGA CTT GAT TTA CAC CCC TAA
S V G E K L V L N C T A R T E L N V G I>
141_____145_____hFLK1 IG DOMAIN 3_____155_____160>

      490      500      510      520      530      540
      *      *      *      *      *      *
GAC TTC AAC TGG GAA TAC CCT TCT TOG AAG CAT CAG CAT AAG AAA CTT GTA AAC CGA GAC
CTG AAG TTG ACC CTT ATG GGA AGA AGC TTC GTA GTC GTA TTC TTT GAA CAT TTG GCT CTG
D F N W E Y P S S K H Q H K K L V N R ID>
161_____165_____hFLK1 IG DOMAIN 3_____175_____180>

      550      560      570      580      590      600
      *      *      *      *      *      *
CTA AAA ACC CAG TCT GGG AGT GAG ATG AAG AAA TTT TTG AGC ACC TTA ACT ATA GAT GGT
GAT TTT TGG GTC AGA CCC TCA CTC TAC TTC TTT AAA AAC TCG TGG AAT TGA TAT CTA CCA
L K T Q S G S E M K K F L S T L T I D G>
181_____185_____hFLK1 IG DOMAIN 3_____195_____200>

      610      620      630      640      650      660
      *      *      *      *      *      *
GTA ACC CGG AGT GAC CAA GGA TTG TAC ACC TGT GCA GCA TCC AGT GGG CTG ATG ACC AAG
CAT TGG GCC TCA CTG GTT OCT AAC ATG TGG ACA CGT CGT AGG TCA CCC GAC TAC TGG TTC
V T R S D Q G L Y T C A A S S G L M T K>
201_____205_____hFLK1 IG DOMAIN 3_____215_____220>

      670      680      690      700      710      720
      *      *      *      *      *      *
AAG AAC AGC ACA TTT GTC AGG GTC CAT GAA AAG GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC
TTC TTG TOG TGT AAA CAG TCC CAG GTA CTT TTC CTG TTT TGA GTG TGT ACG GGT GGC ACG
K N S T F V R V H E K>
221_____hFLK1 IG DOMAIN 3_____231>
      D K T H T C P P C>
      232_____hFCAC1 A_____240>

      730      740      750      760      770      780
      *      *      *      *      *      *
CCA GCA OCT GAA CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC TTC CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC
GGT CGT GGA CTT GAG GAC CCC OCT GGC AGT CAG AAG GAG AAG GGG GGT TTT GGG TTC CTG
P A P E L L G G P S V F L F P P K P K ID>
241_____245_____hFCAC1 A_____255_____260>

      790      800      810      820      830      840
      *      *      *      *      *      *
ACC CTC ATG ATC TOC CGG ACC OCT GAG GTC ACA TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAC GAA
TGG GAG TAC TAG AGG GCC TGG GGA CTC CAG TGT ACG CAC CAC CAC CTG CAC TCG GTG CTT
T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E>
261_____265_____hFCAC1 A_____275_____280>

      850      860      870      880      890      900
      *      *      *      *      *      *
GAC OCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA
CTG GGA CTC CAG TTC AAG TTG ACC ATG CAC CTG CCG CAC CTC CAC GTA TTA OGG TTC TGT
D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T>
281_____285_____hFCAC1 A_____295_____300>

```

```

          910          920          930          940          950          960
          *          *          *          *          *          *
AAG CCG CGG GAG GAG CAG TAC AAC AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG
TTC GGC GCC CTC CTC GTC ATG TTG TCG TGC ATG GCA CAC CAG TCG CAG GAG TGG CAG GAC
K  P  R  E  E  Q  Y  N  S  T  Y  R  V  V  S  V  L  T  V  L>
301_____305_____hFCAC1 A _____315_____320>

          970          980          990          1000          1010          1020
          *          *          *          *          *          *
CAC CAG GAC TGG CTG AAT GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GCC CTC CCA
GTG GTC CTG ACC GAC TTA CCG TTC CTC ATG TTC ACG TTC CAG AGG TTG TTT CCG GAG GGT
H  Q  D  W  L  N  G  K  E  Y  K  C  K  V  S  N  K  A  L  P>
321_____325_____hFCAC1 A _____335_____340>

          1030          1040          1050          1060          1070          1080
          *          *          *          *          *          *
GCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAA CCA CAG GTG TAC
CGG GGG TAG CTC TTT TGG TAG AGG TTT CCG TTT CCC GTC GGG GCT CTT GGT GTC CAC ATG
A  P  I  E  K  T  I  S  K  A  K  G  Q  P  R  E  P  Q  V  Y>
341_____345_____hFCAC1 A _____355_____360>

          1090          1100          1110          1120          1130          1140
          *          *          *          *          *          *
ACC CTG CCC CCA TCC CGG GAT GAG CTG ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC
TGG GAC GGG GGT AGG GCC CTA CTC GAC TGG TTC TTG GTC CAG TCG GAC TGG ACG GAC CAG
T  L  P  P  S  R  D  E  L  T  K  N  Q  V  S  L  T  C  L  V>
361_____365_____hFCAC1 A _____375_____380>

          1150          1160          1170          1180          1190          1200
          *          *          *          *          *          *
AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC
TTT CCG AAG ATA GGG TCG CTG TAG CCG CAC CTC ACC CTC TCG TTA CCC GTC GGC CTC TTG
K  G  F  Y  P  S  D  I  A  V  E  W  E  S  N  G  Q  P  E  N>
381_____385_____hFCAC1 A _____395_____400>

          1210          1220          1230          1240          1250          1260
          *          *          *          *          *          *
AAC TAC AAG ACC ACG OCT OCC GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC AGC AAG
TTG ATG TTC TGG TGC GGA GGG CAC GAC CTG AGG CTG CCG AGG AAG AAG GAG ATG TOG TTC
N  Y  K  T  T  P  P  V  L  D  S  D  G  S  F  F  L  Y  S  K>
401_____405_____hFCAC1 A _____415_____420>

          1270          1280          1290          1300          1310          1320
          *          *          *          *          *          *
CTC ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT
GAG TGG CAC CTG TTC TCG TCC ACC GTC GTC CCC TTG CAG AAG AGT ACG AGG CAC TAC GTA
L  T  V  D  K  S  R  W  Q  Q  G  N  V  F  S  C  S  V  M  H>
421_____425_____hFCAC1 A _____435_____440>

          1330          1340          1350          1360          1370
          *          *          *          *          *
GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CCG GGT AAA TGA
CTC CGA GAC GTG TTG GTG ATG TGC GTC TTC TCG GAG AGG GAC AGA GGC CCA TTT ACT
E  A  L  H  N  H  Y  T  Q  K  S  L  S  L  S  P  G  K  *>
441_____445_____hFCAC1 A _____455_____458>

```

SEQ ID NO. 9

50 GRPFVEMYSEIPEIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLD TLIPDG
100 KRIIWD SRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQNTID
150 VVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNR
200 DLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVH
250 EKGPGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
300 VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
350 GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL
400 TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

1 / 27

Fig.1.

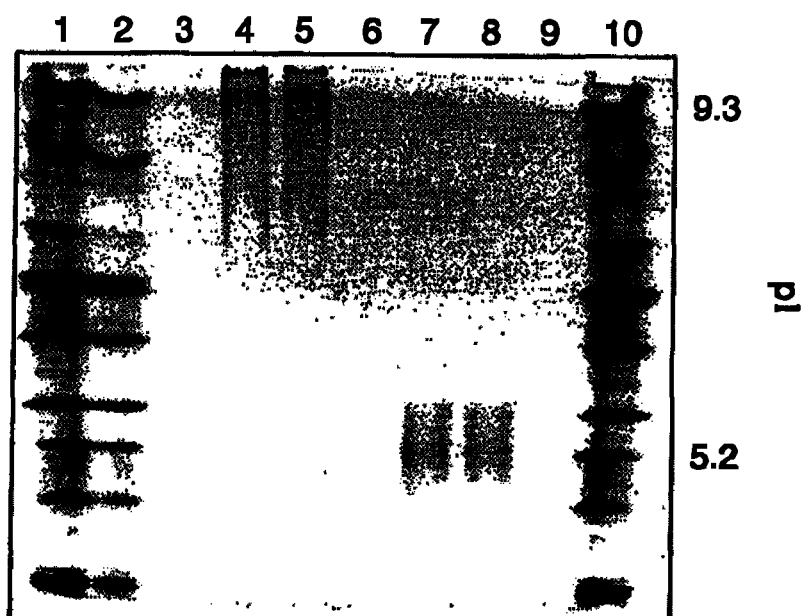


Fig.2.

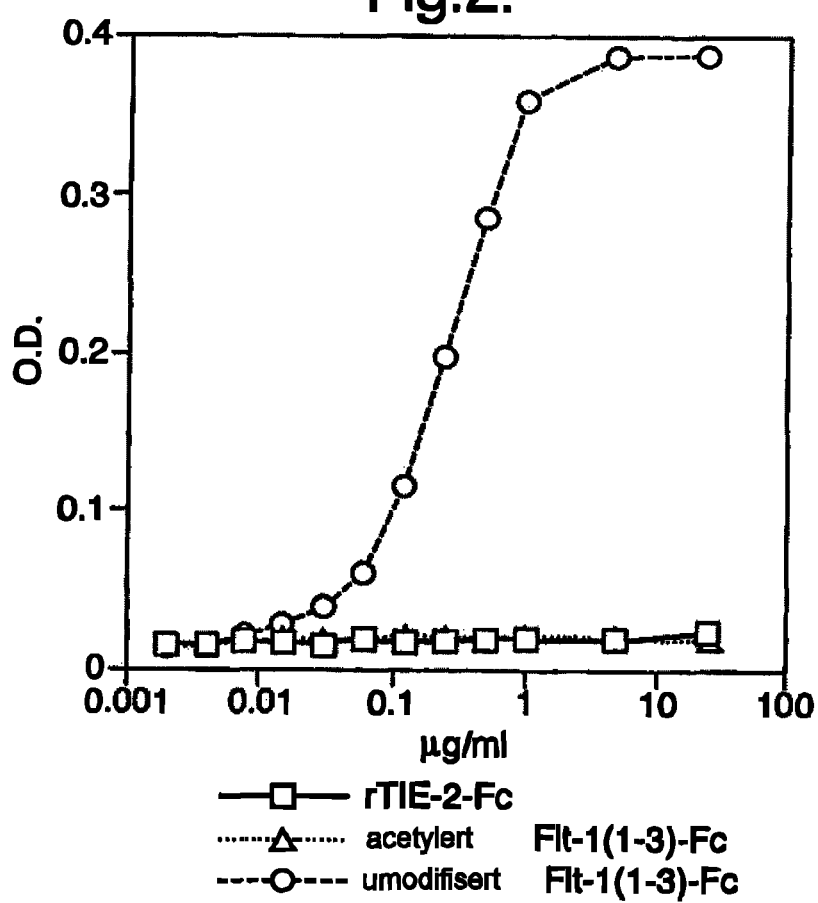


Fig.3.

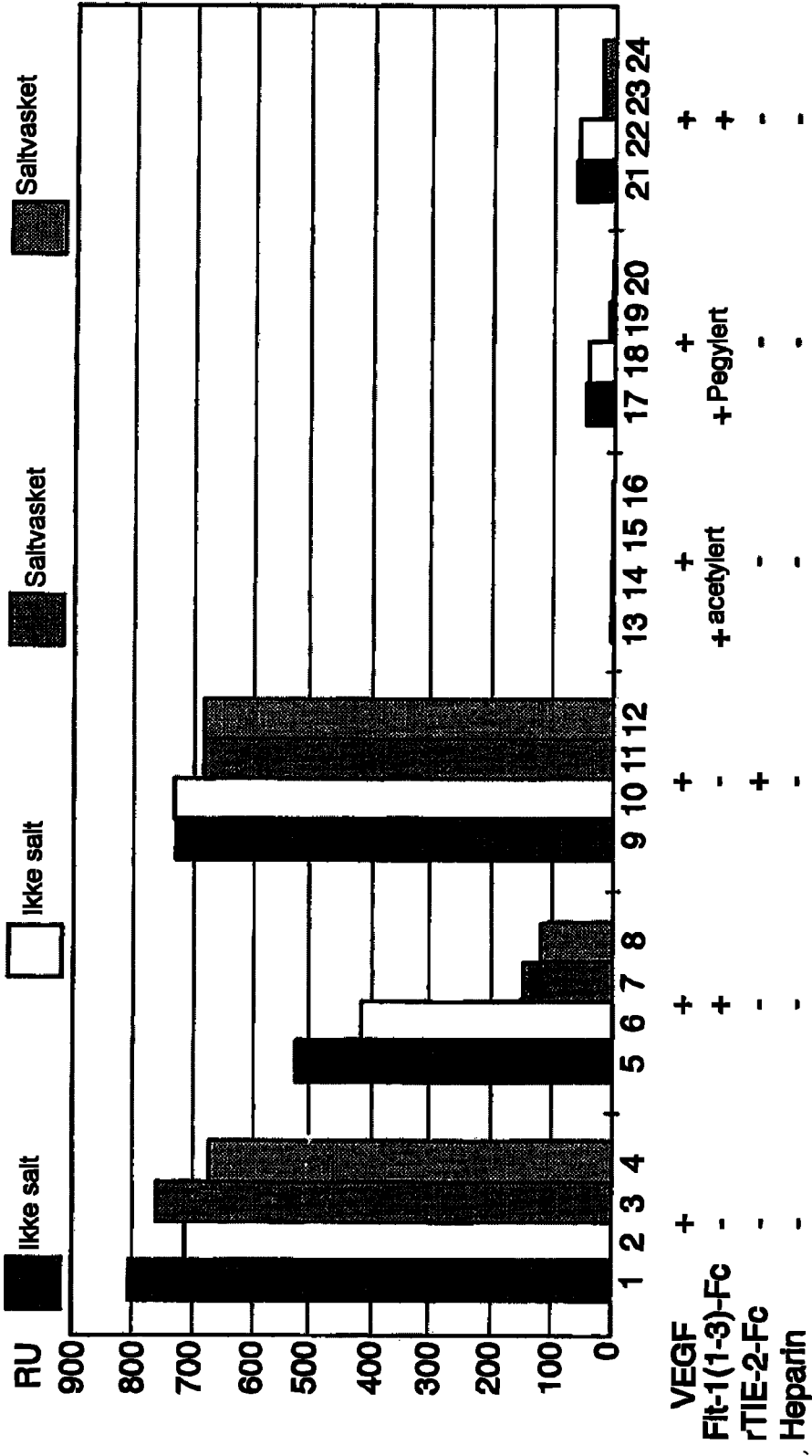


Fig.4.

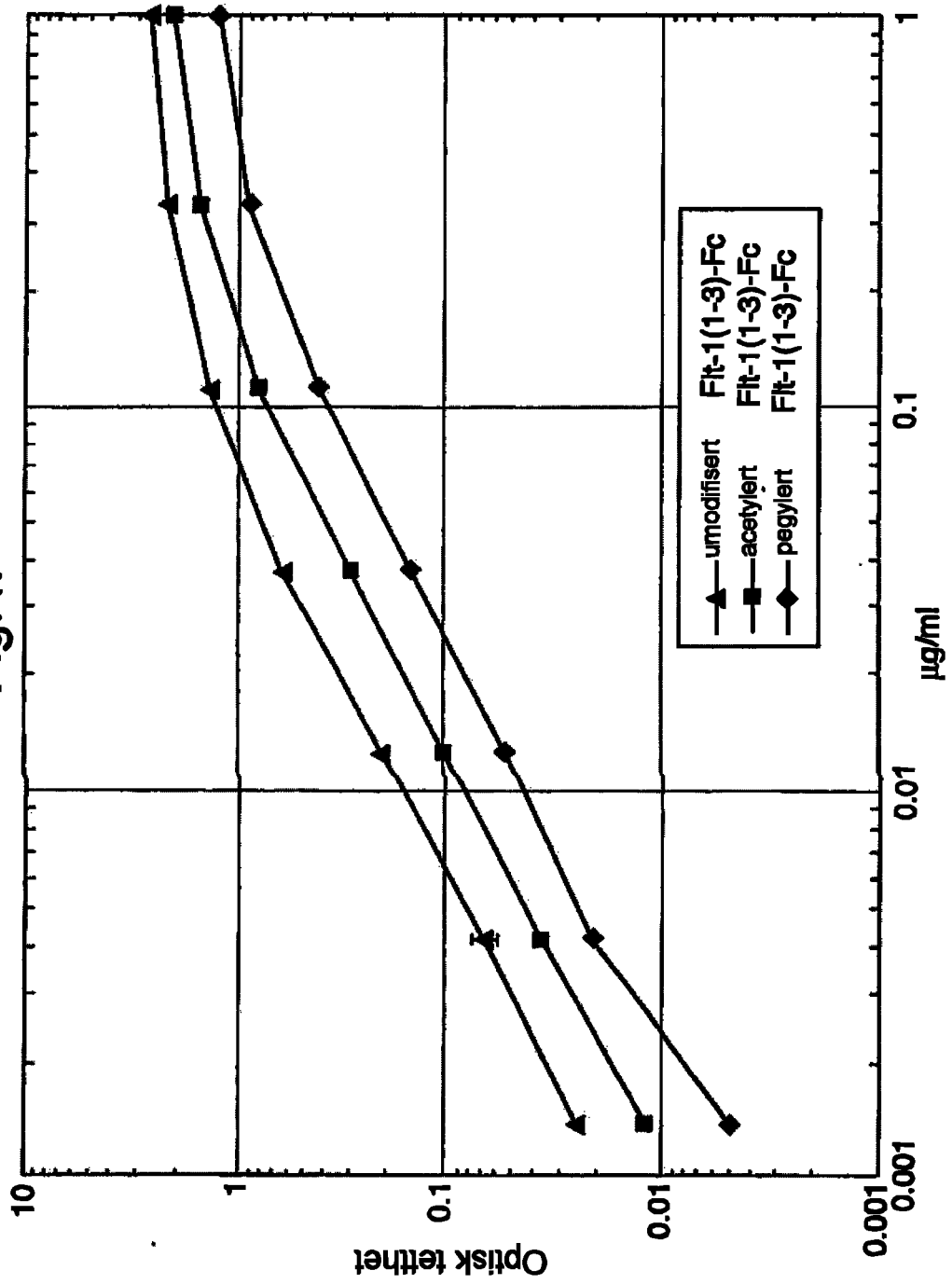


Fig.5.

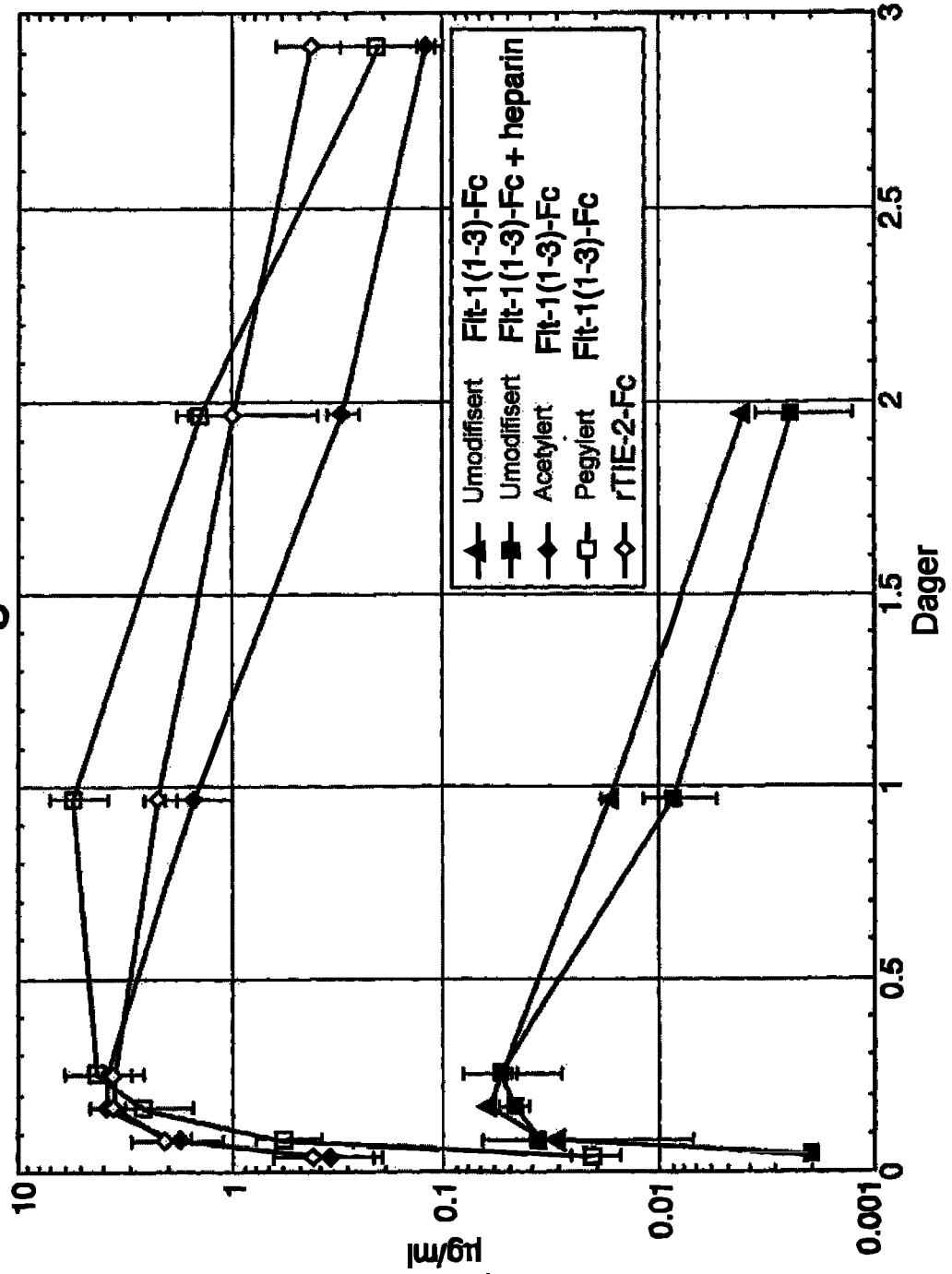


Fig.6A.

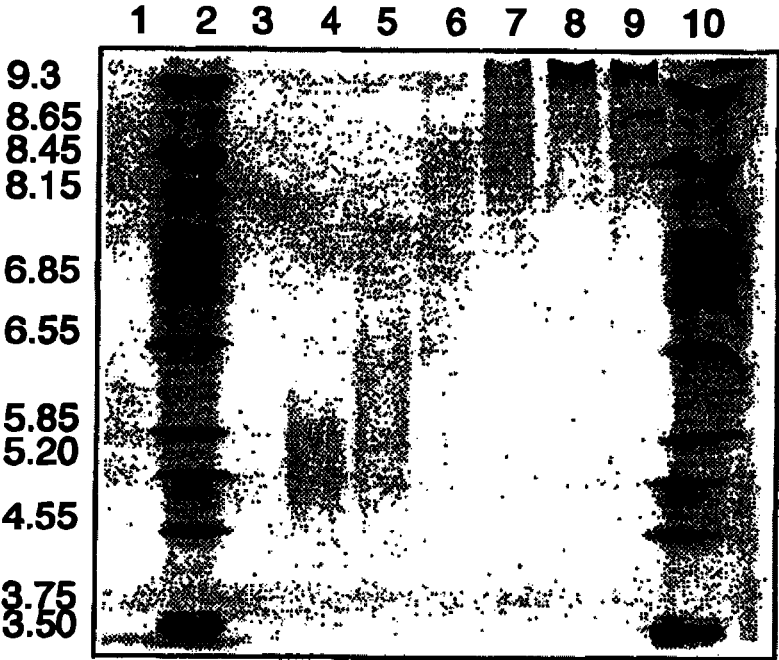
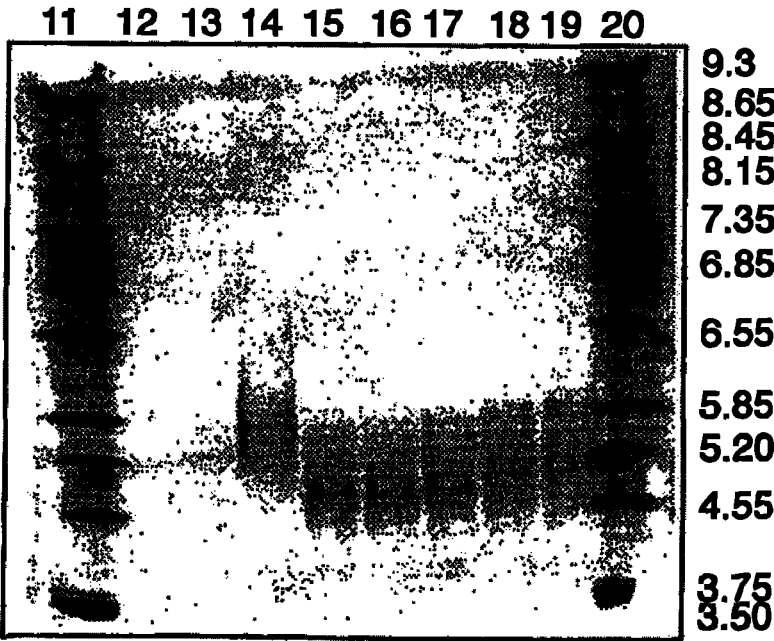
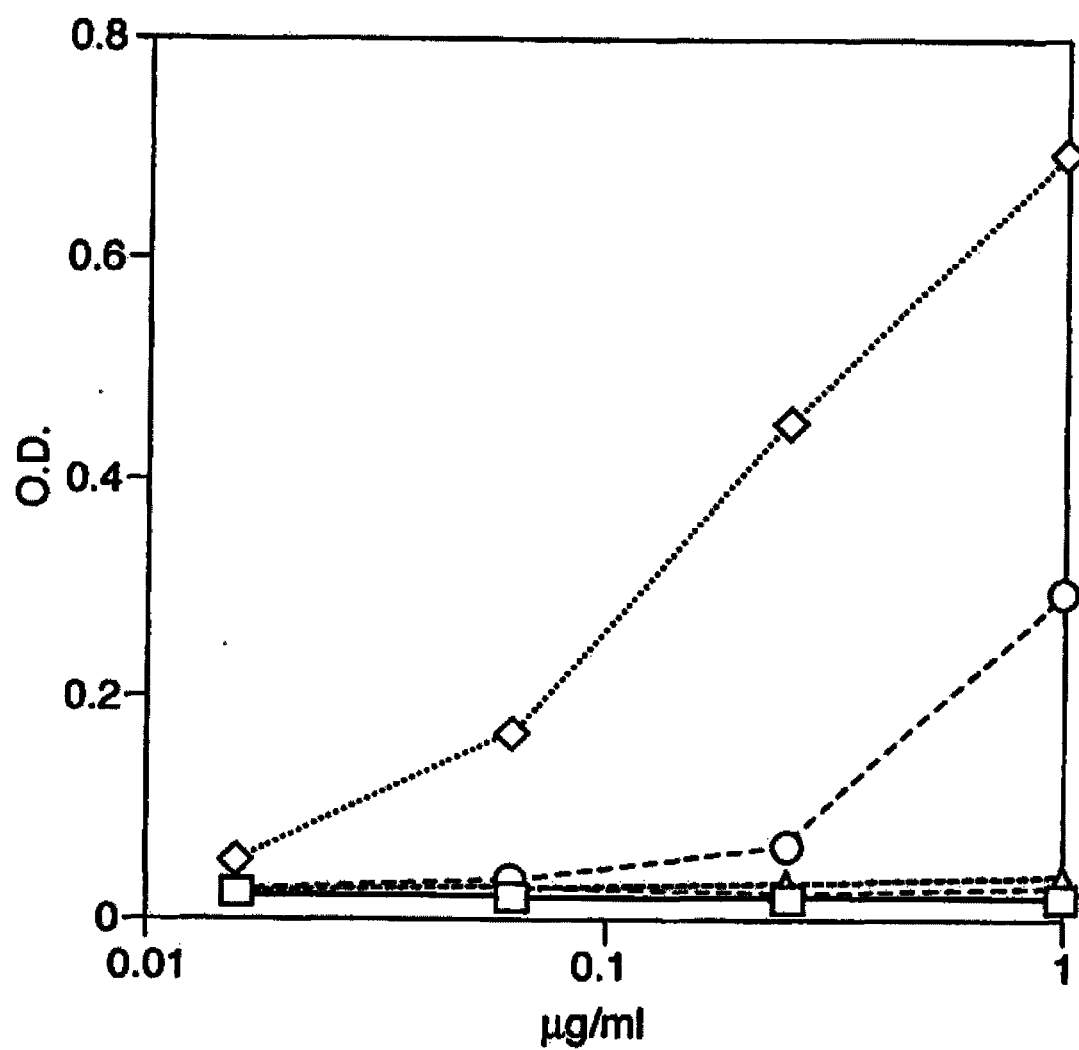


Fig.6B.



6 / 27

Fig.7.



—□—	rTIE-2-Fc	
····◇····	unmodifisert	Flt-1(1-3)-Fc
---○---	acetyliert	Flt-1(1-3)-Fc (10X)
---△---	acetyliert	Flt-1(1-3)-Fc (20X)
---⊞---	acetyliert	Flt-1(1-3)-Fc (30X)

[illegible]

Fig.10.

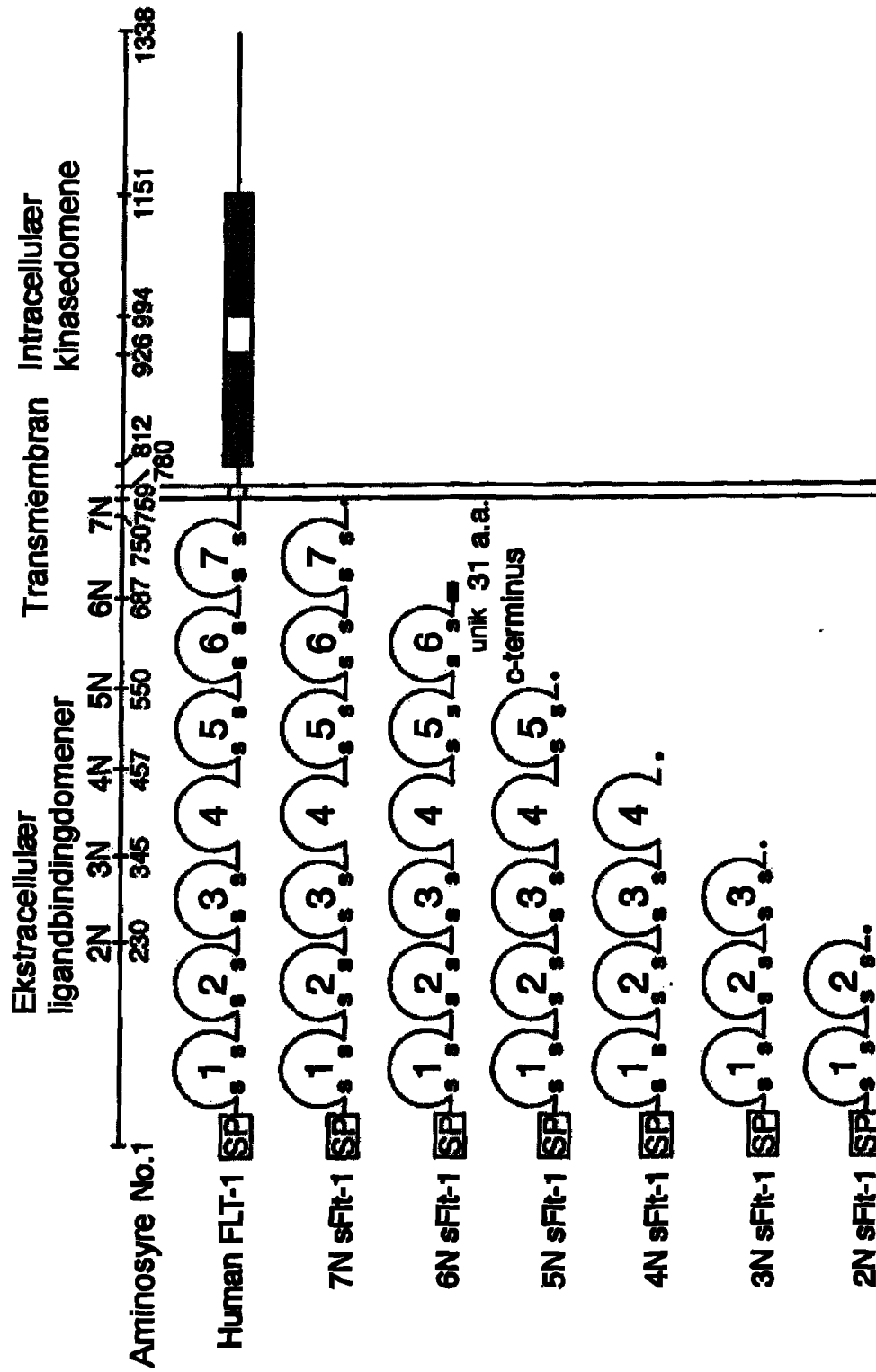


Fig.11A.

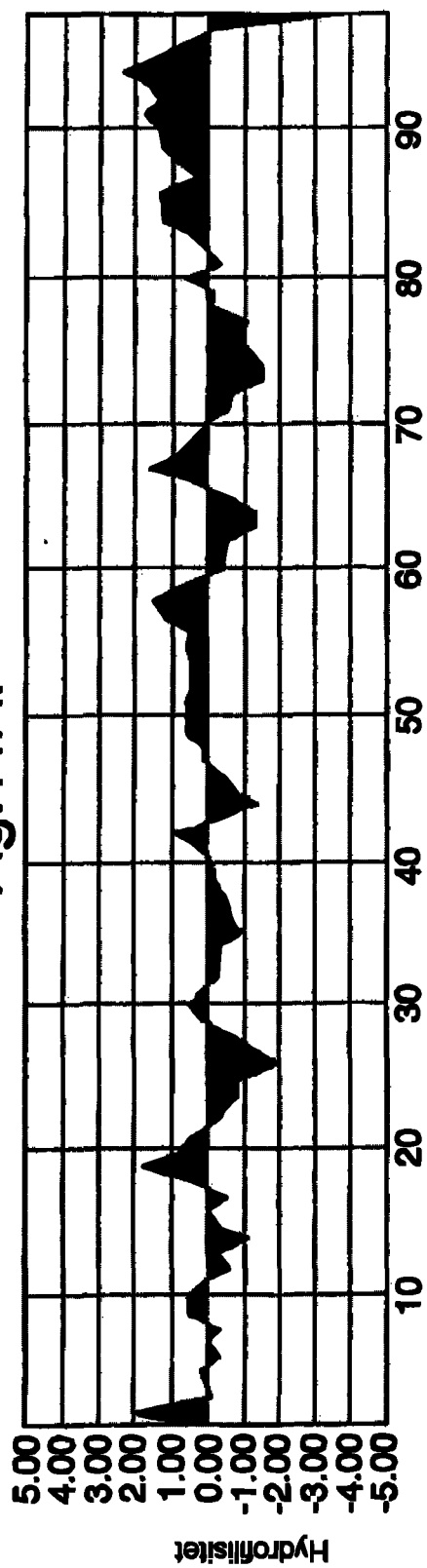


Fig.11B.

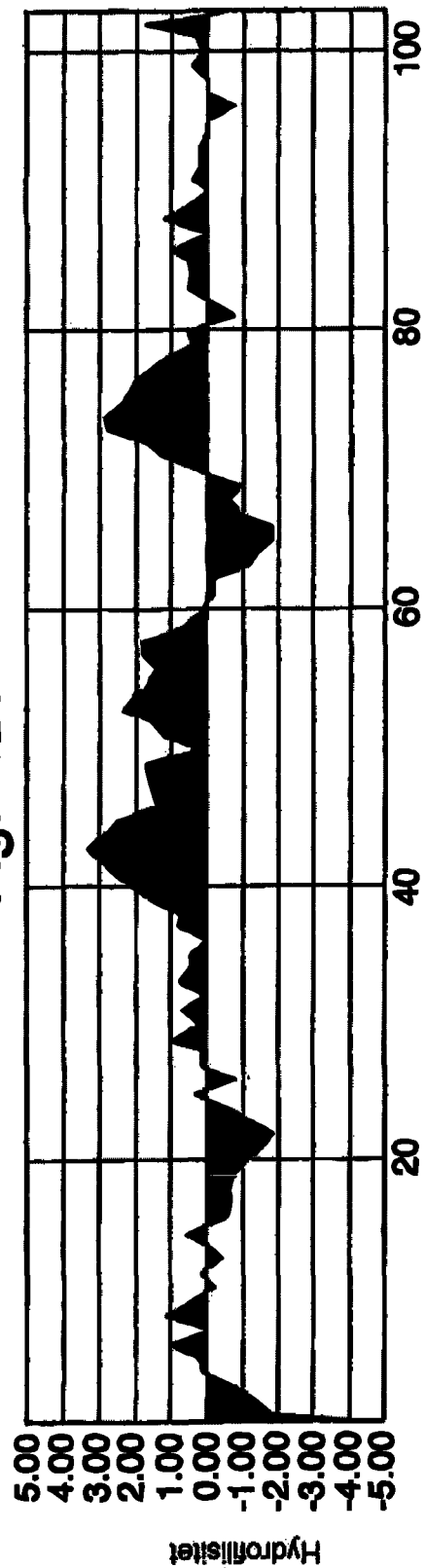
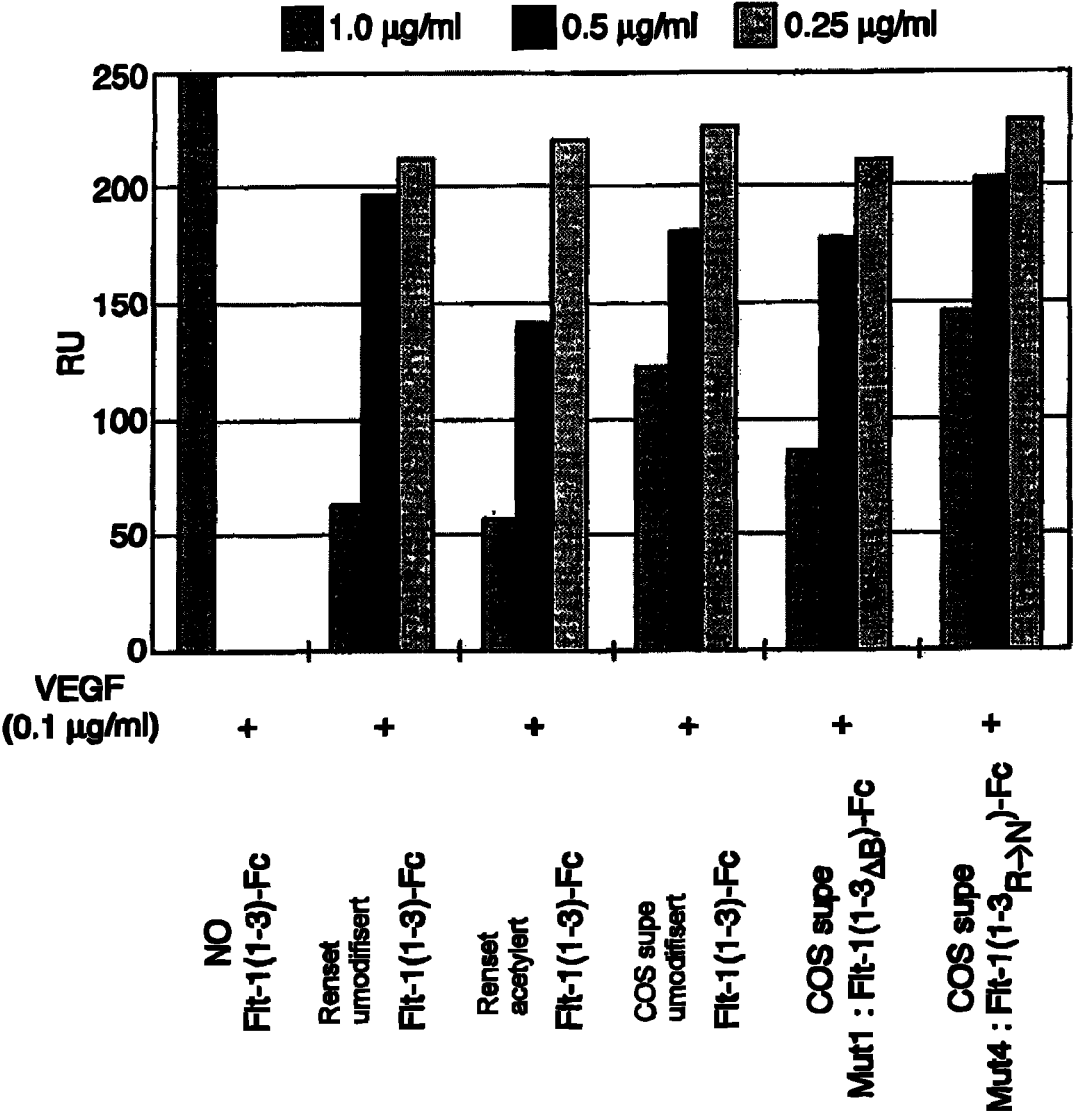


Fig.12.



12 / 27

Fig.13.

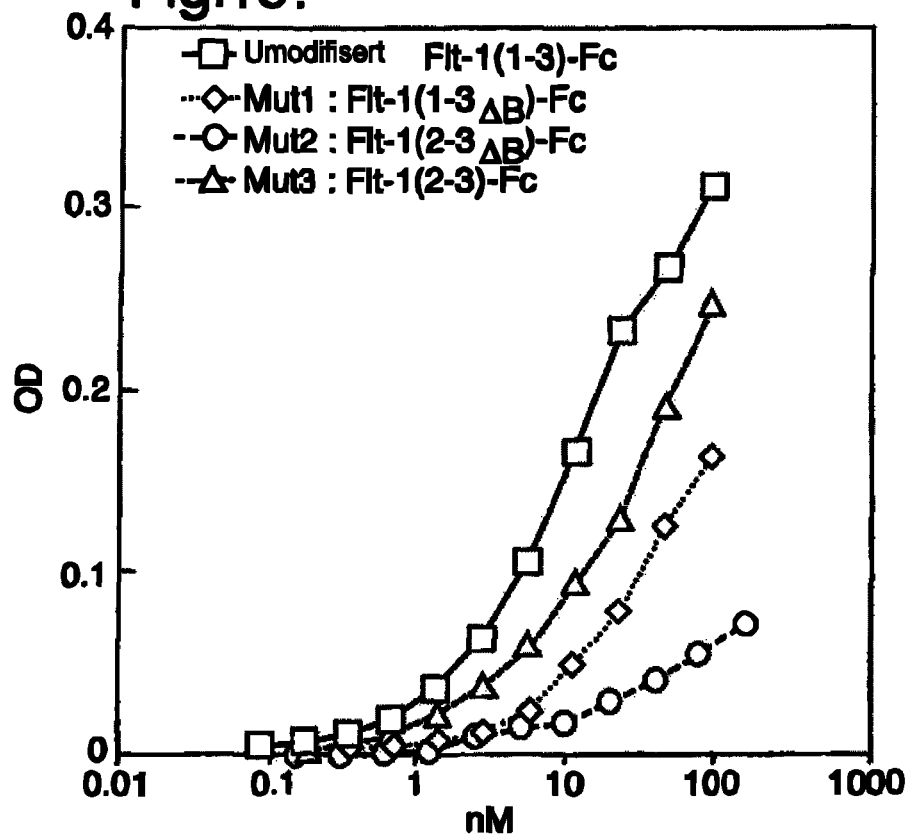


Fig.14.

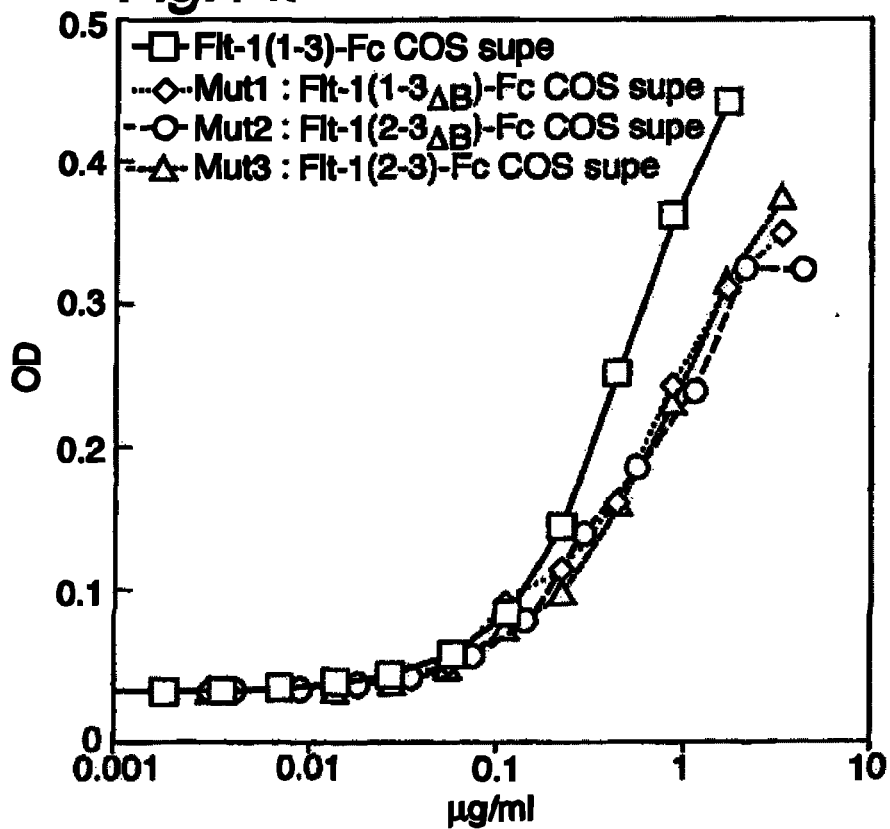


Fig. 15

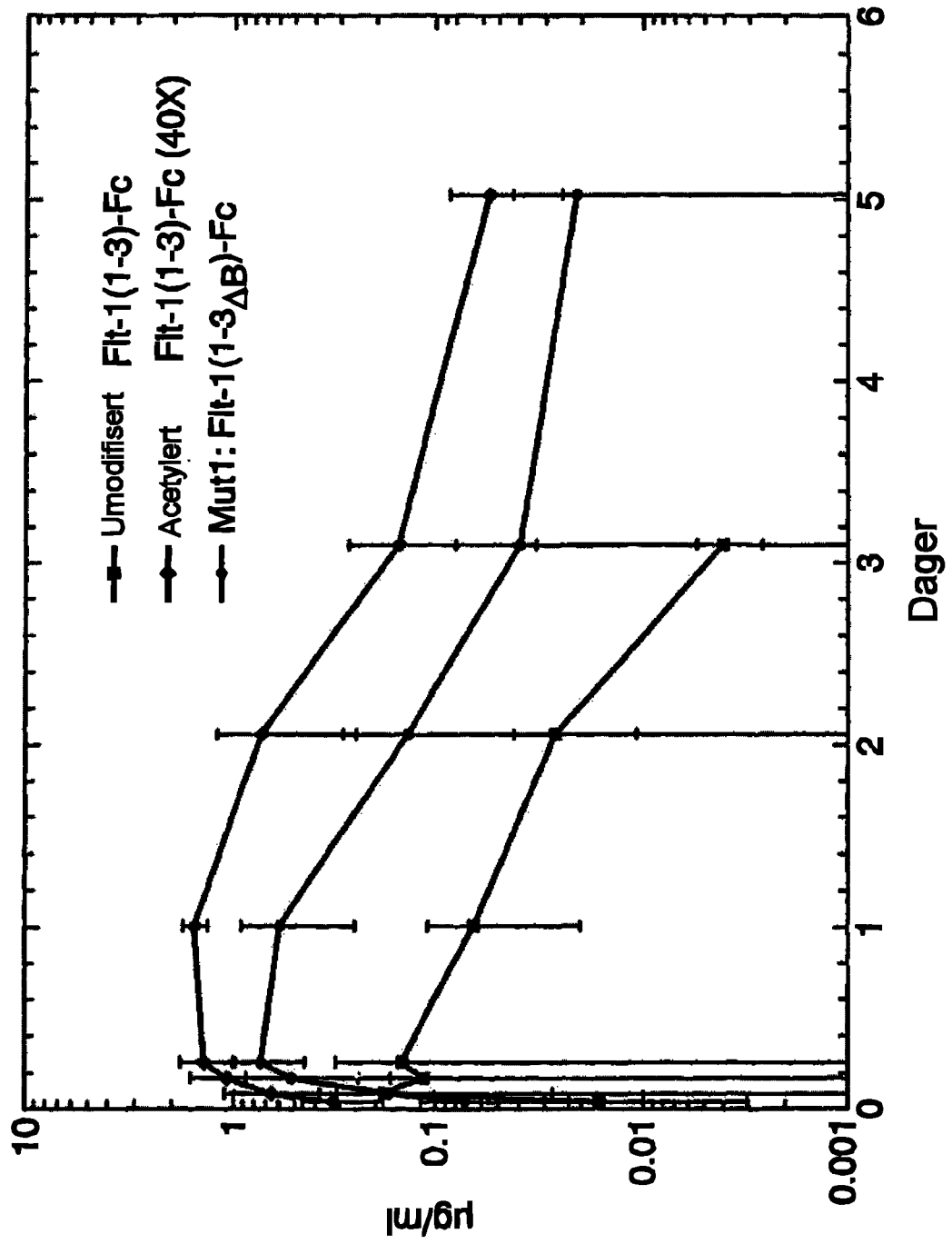
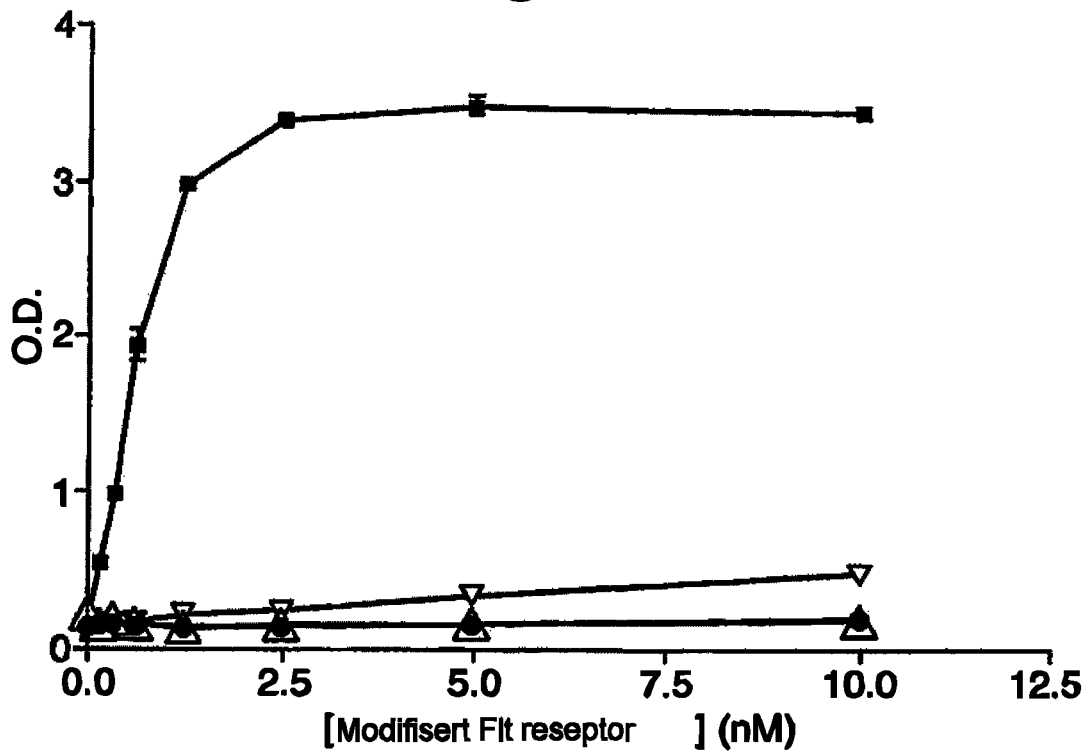


Fig. 16



- Flt1D2Flk1D3.FcdeltaC1(a)
- △ Flt1D2VEGFR3D3.FcdeltaC1(a)
- ▽ TIE2-Fc
- Flt1(1-3)-Fc

Fig. 17A.

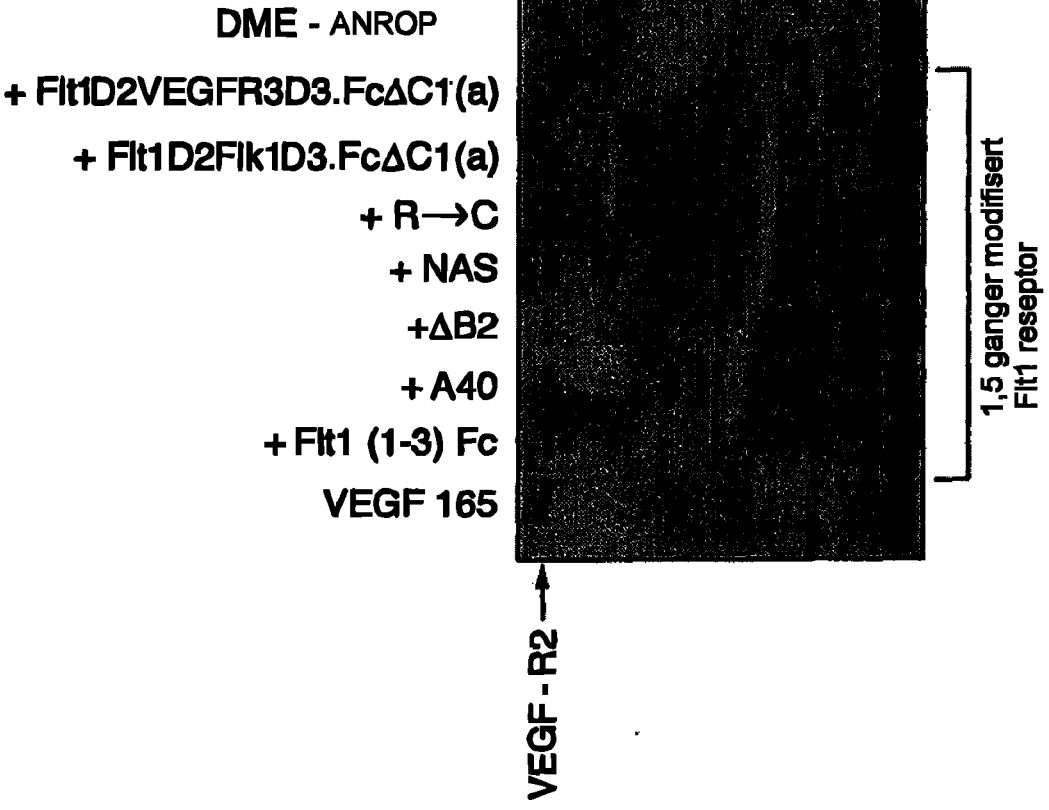


Fig. 17B.

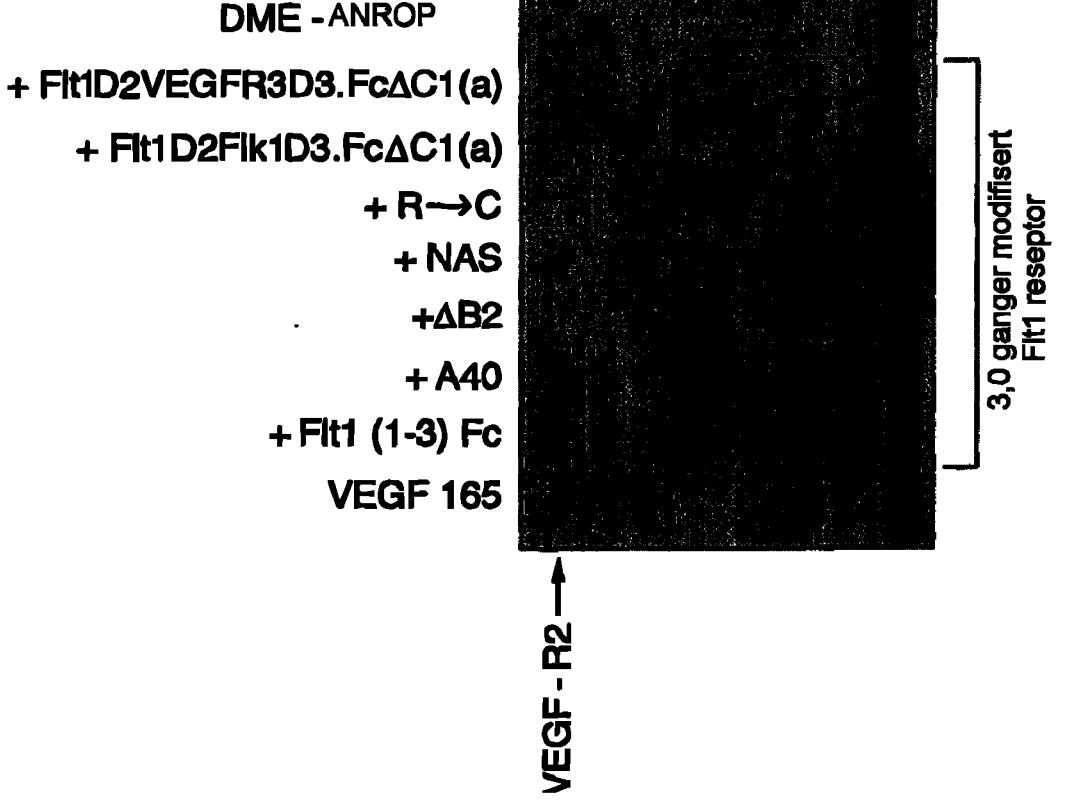


Fig. 17C.

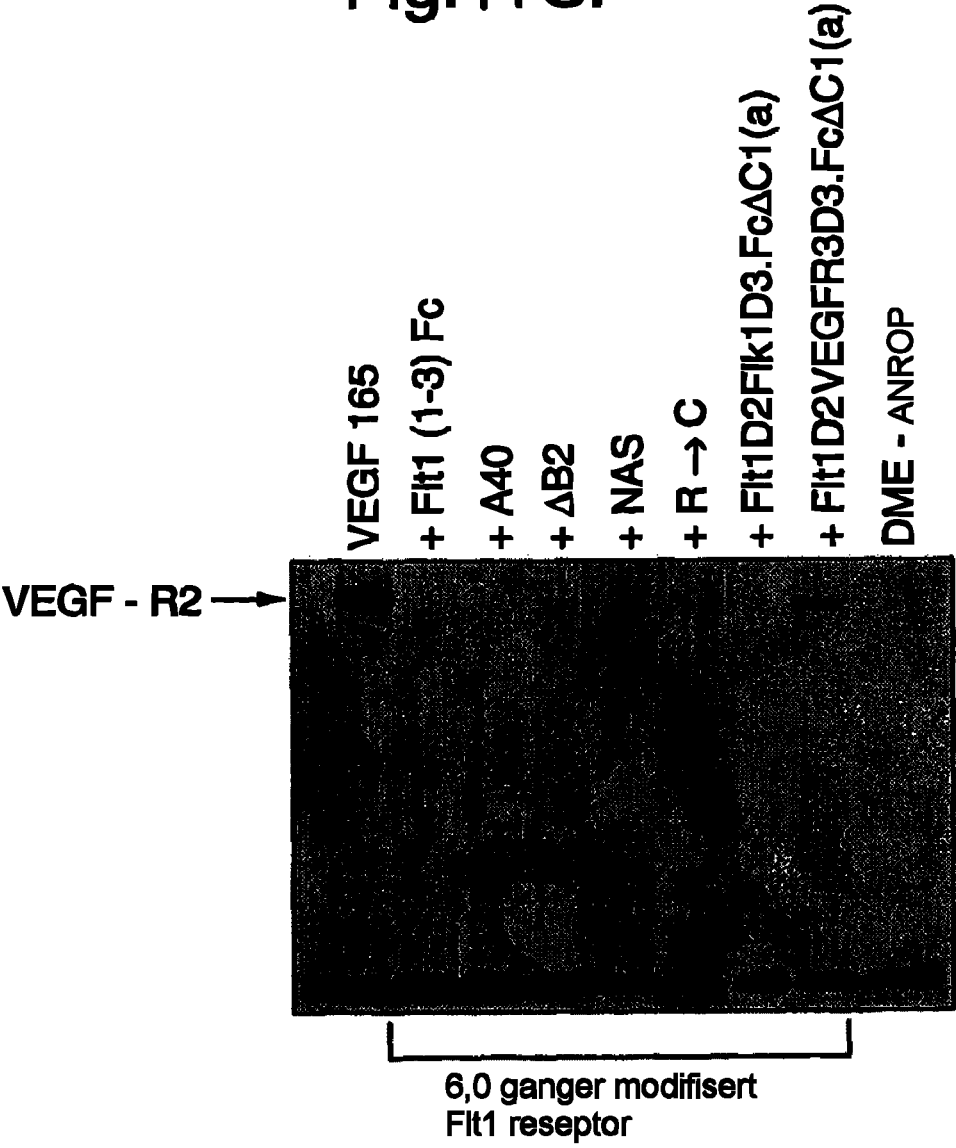


Fig.18A.

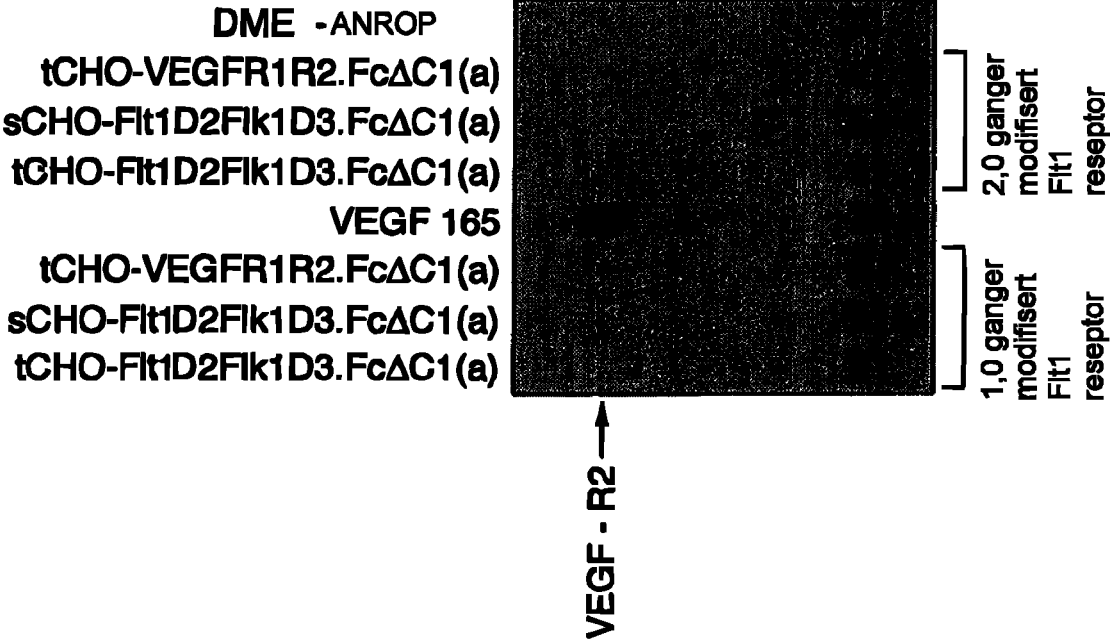


Fig.18 B.

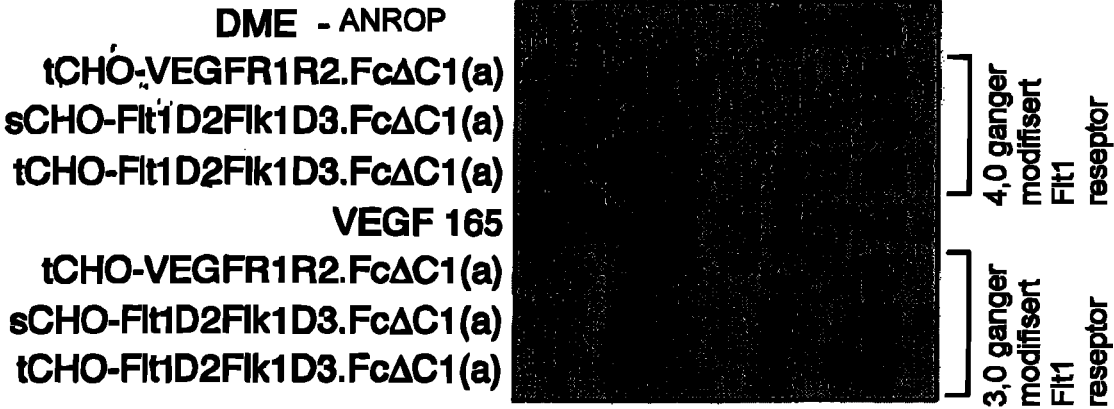


Fig. 19.

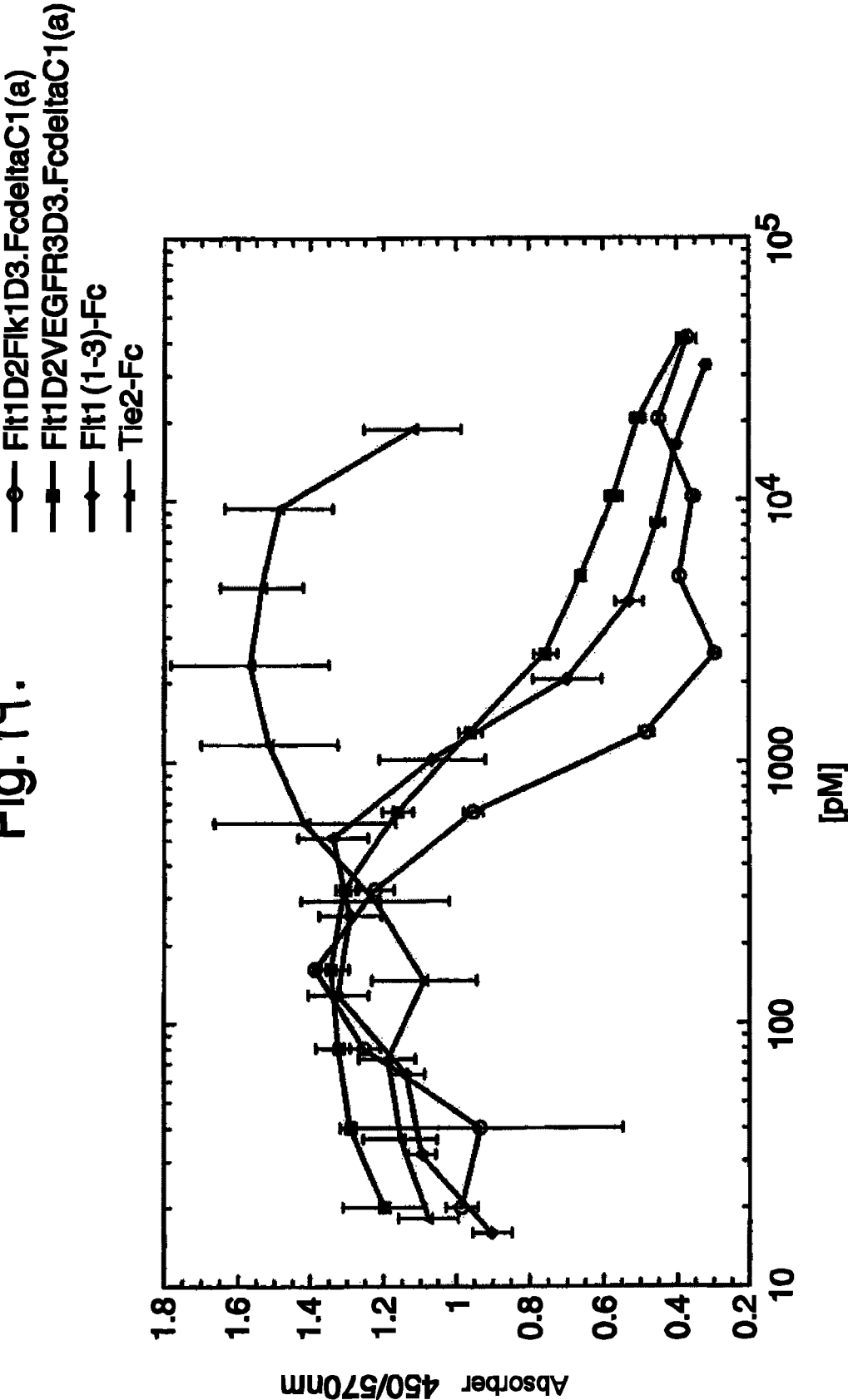


Fig.20.

Bindingsstøkiometri av hVEGF165 til Flt1 D2Flk1D3.FcΔC1(a) & VEGFR1R2-FcΔC1(a)		
hVEGF165 (nM)	VEGF/Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a)	VEGF/VEGFR1R2-FcΔC1(a)
1	0.93	0.98
10	0.97	0.94
50	1	0.99
Gjennomsnitt ± StDev	0.96 ± 0.03	0.97 ± 0.02

Fig.21

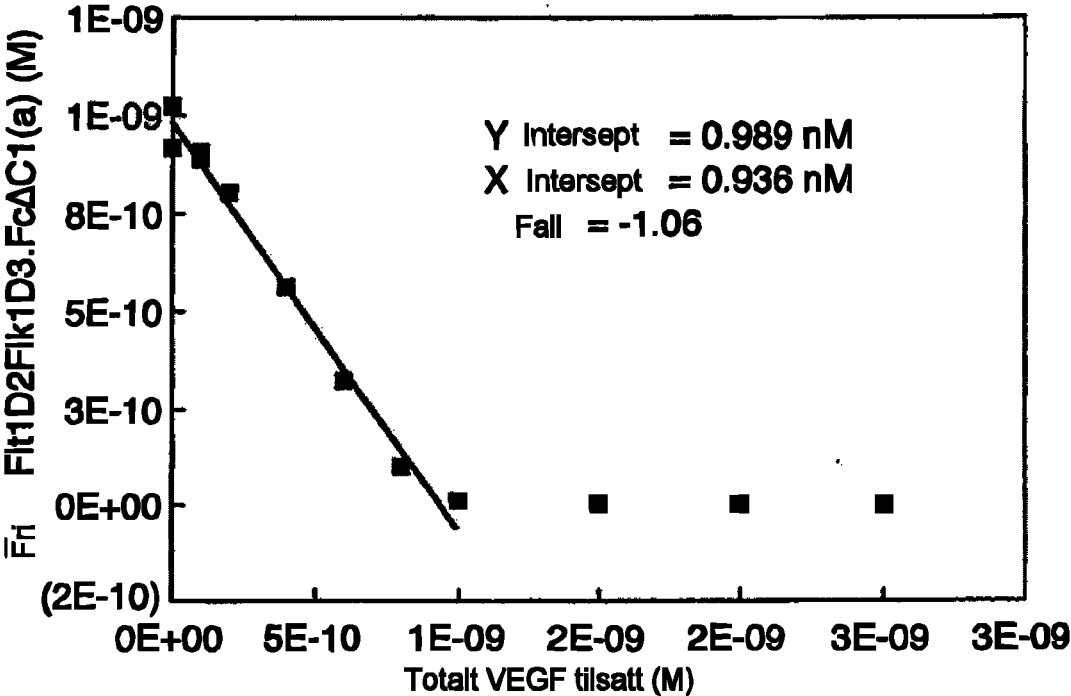


Fig.22.

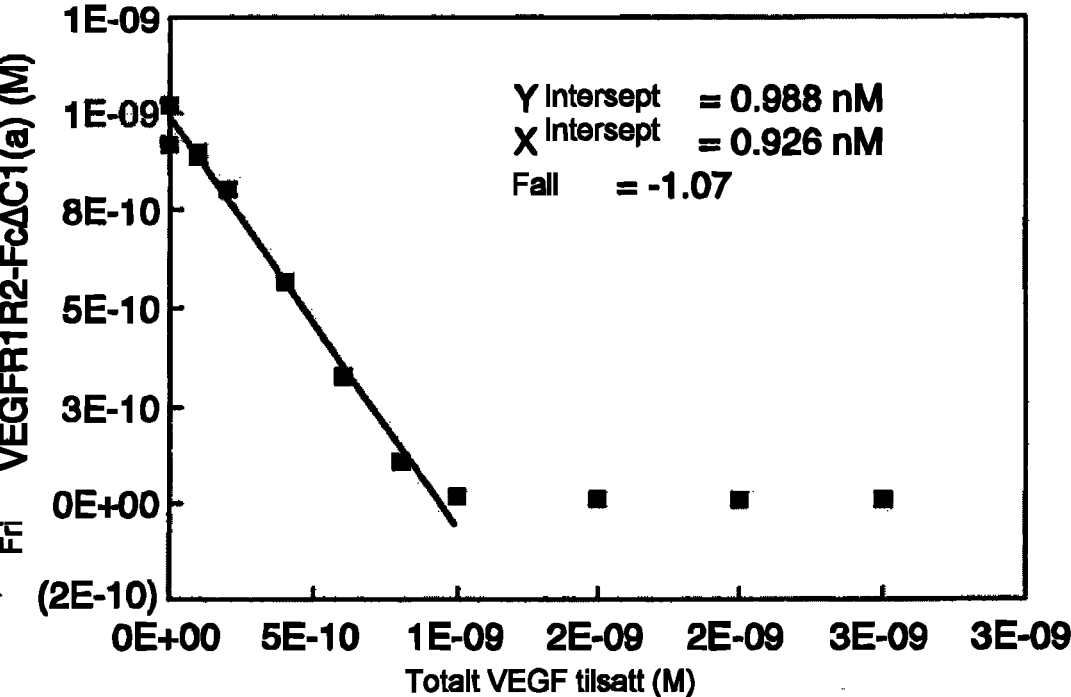


Fig.23.

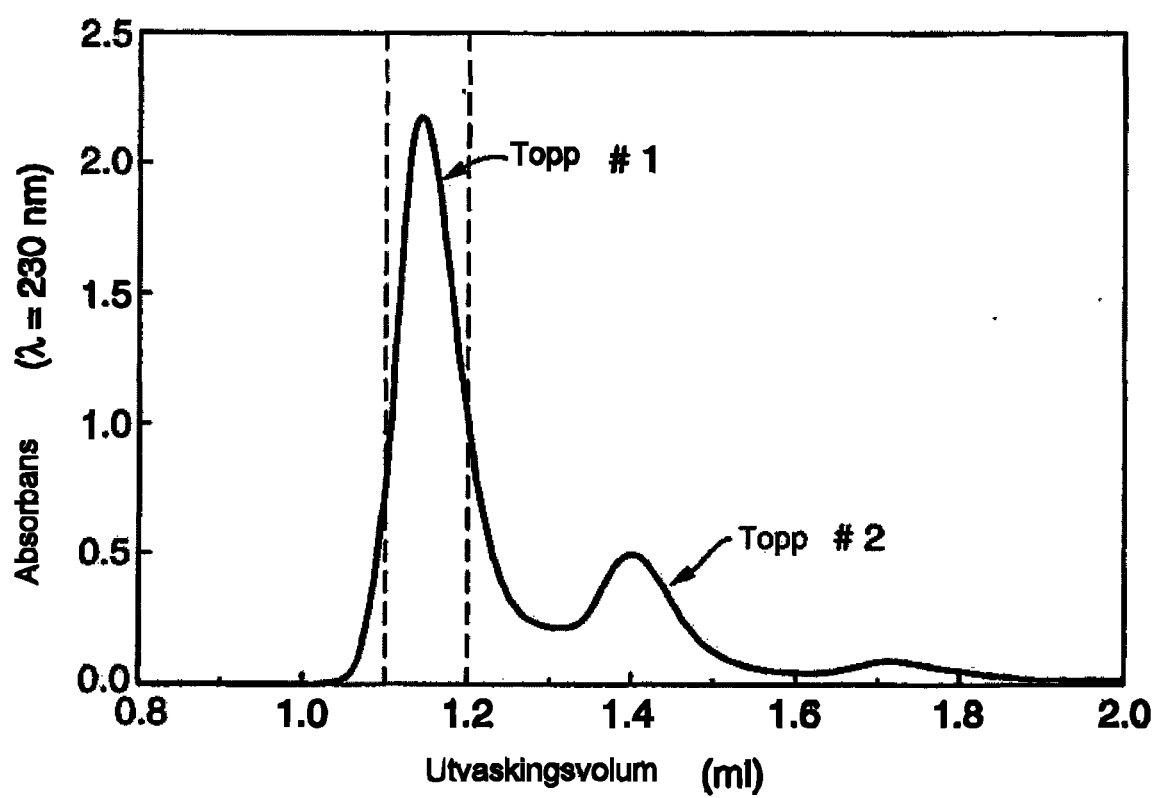


Fig.24.

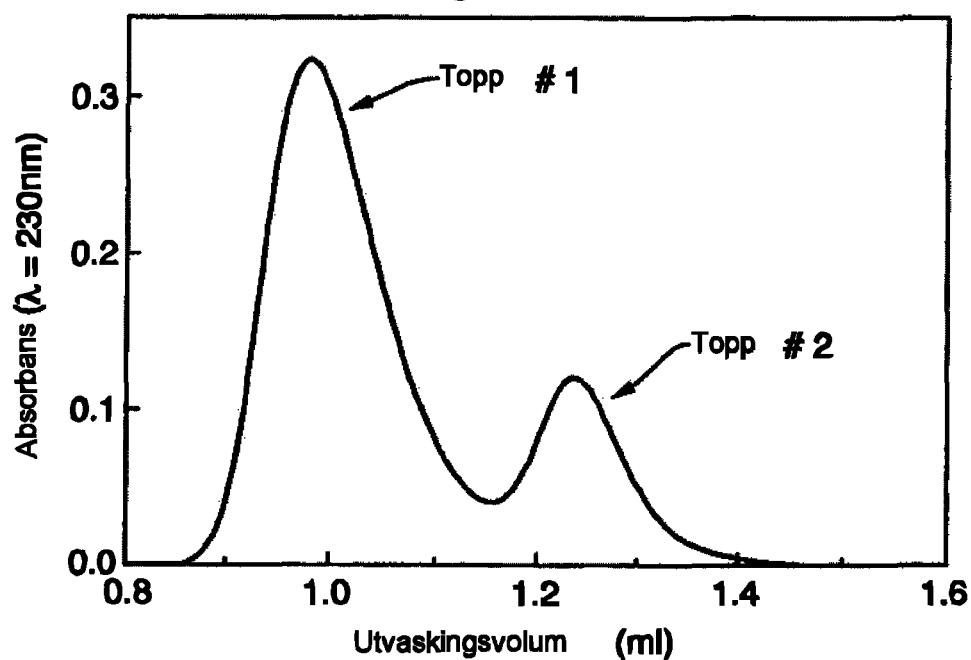


Fig.25.

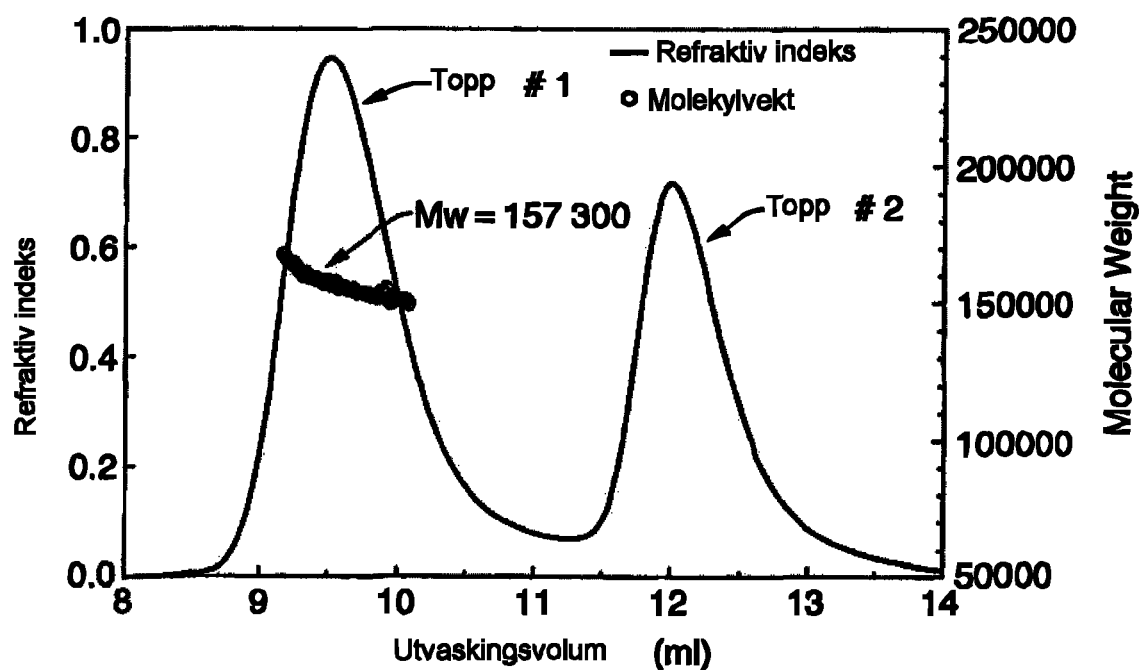


Fig.26.

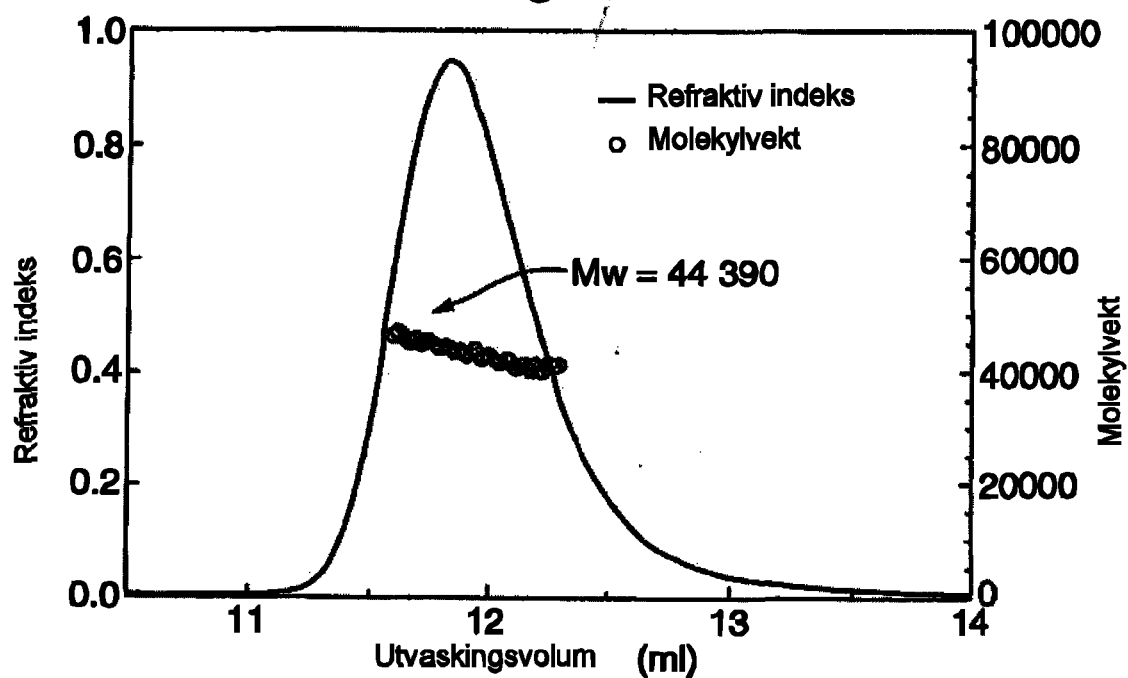


Fig.27.

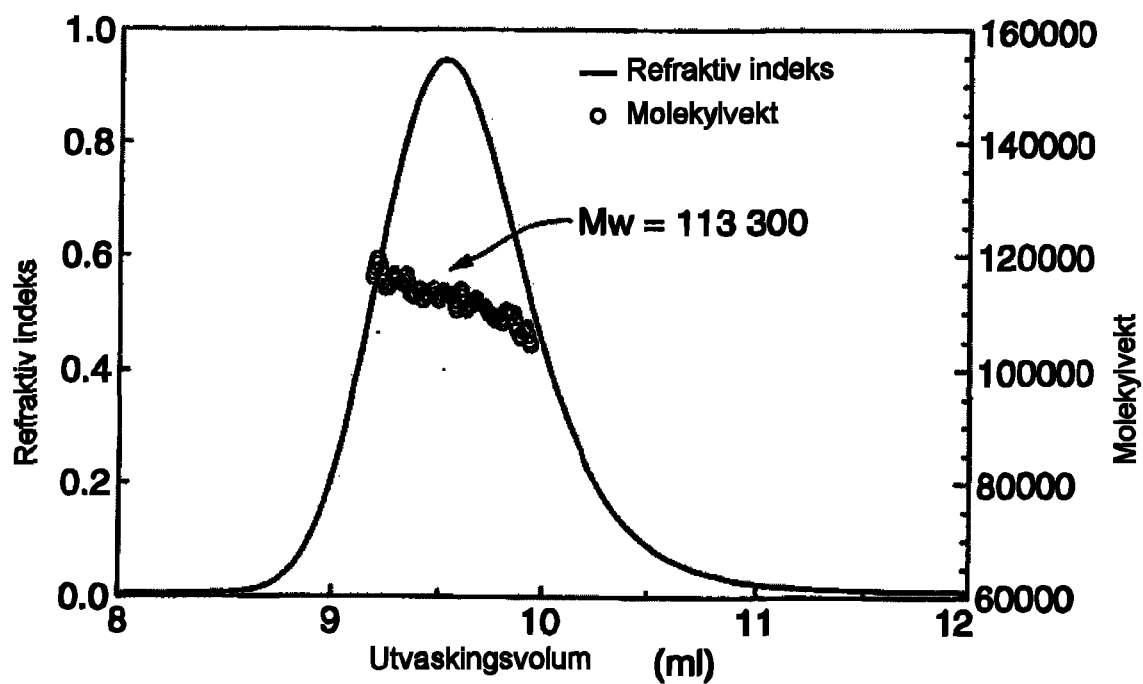


Fig.28.

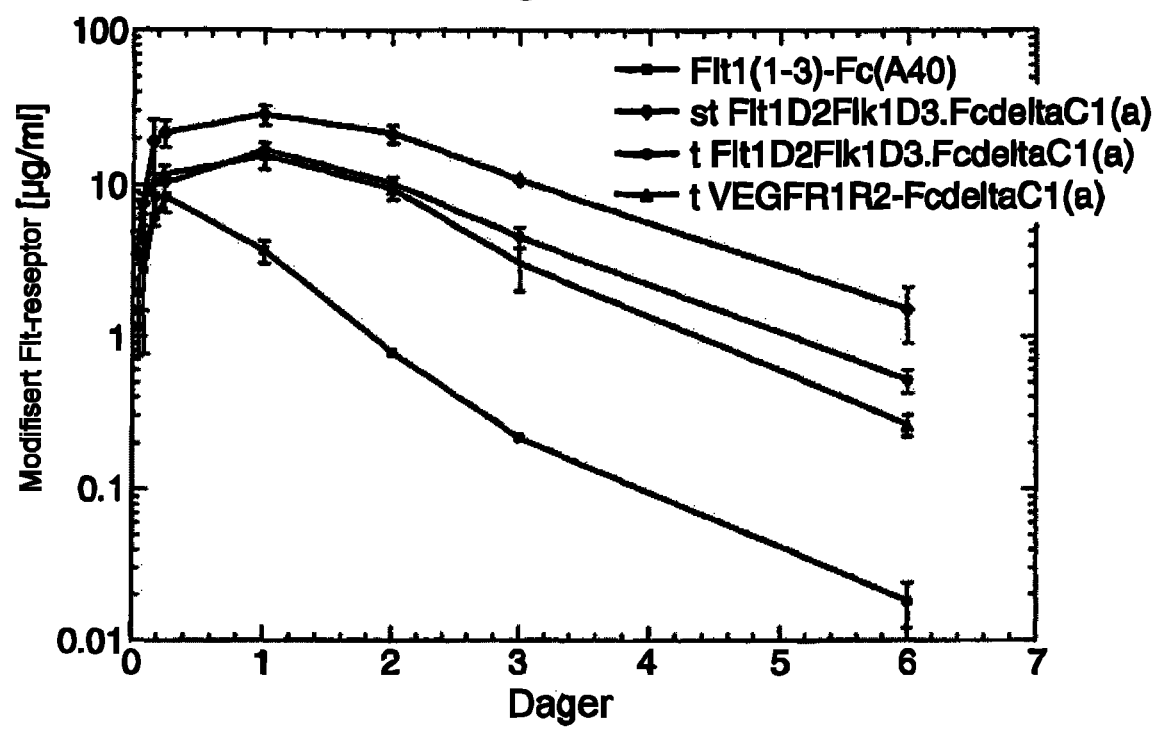
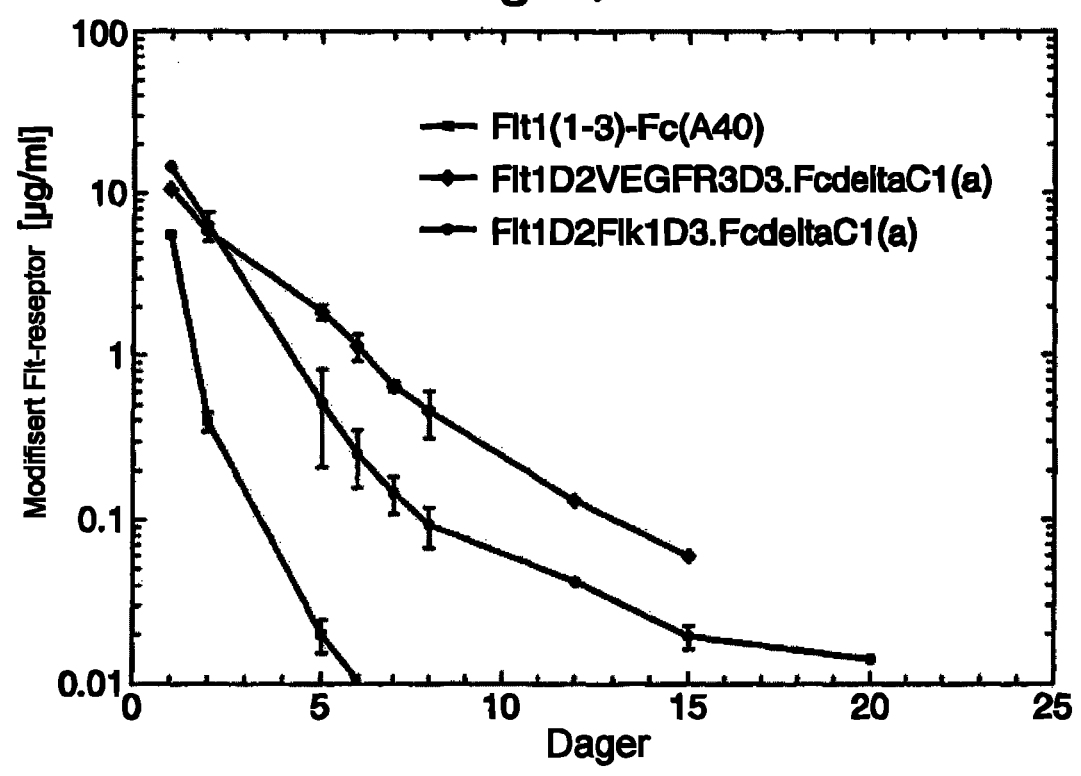


Fig.29.



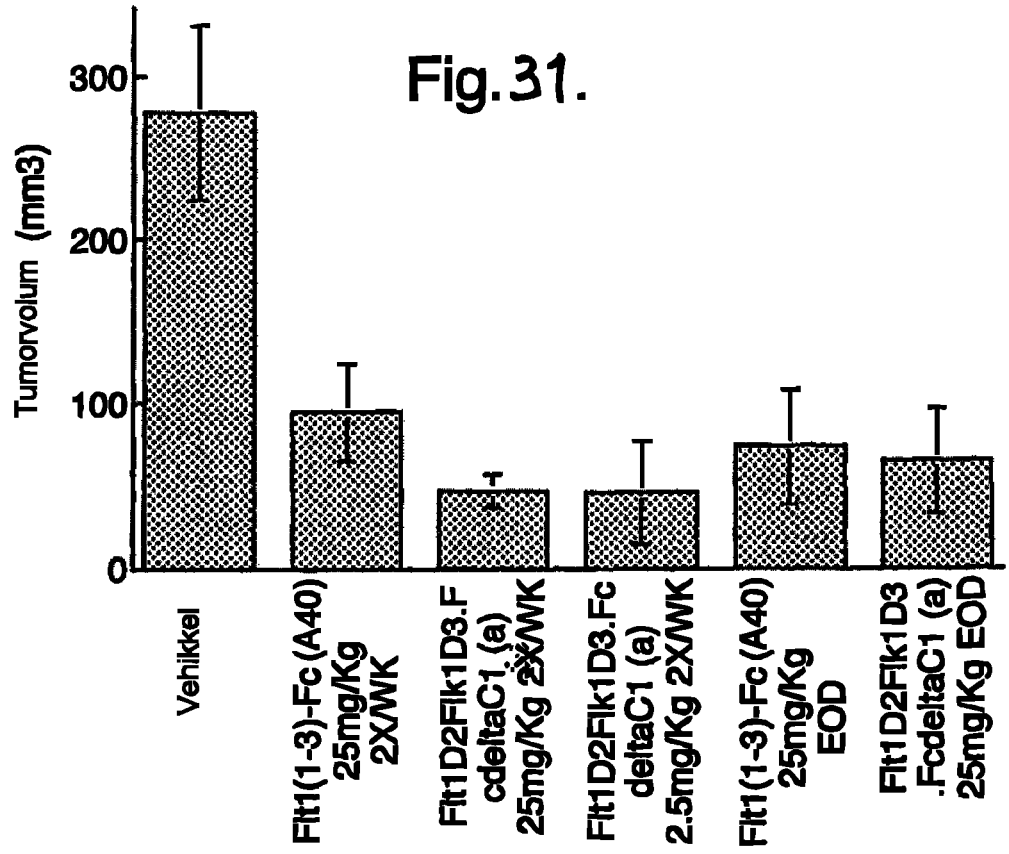
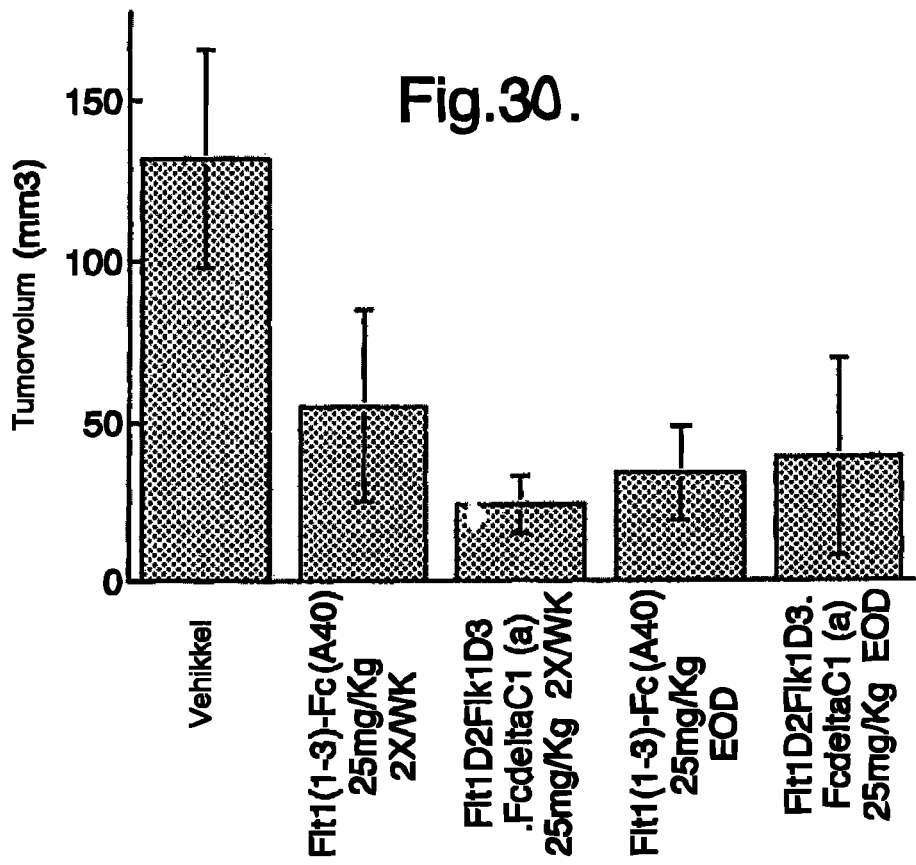


Fig.32.

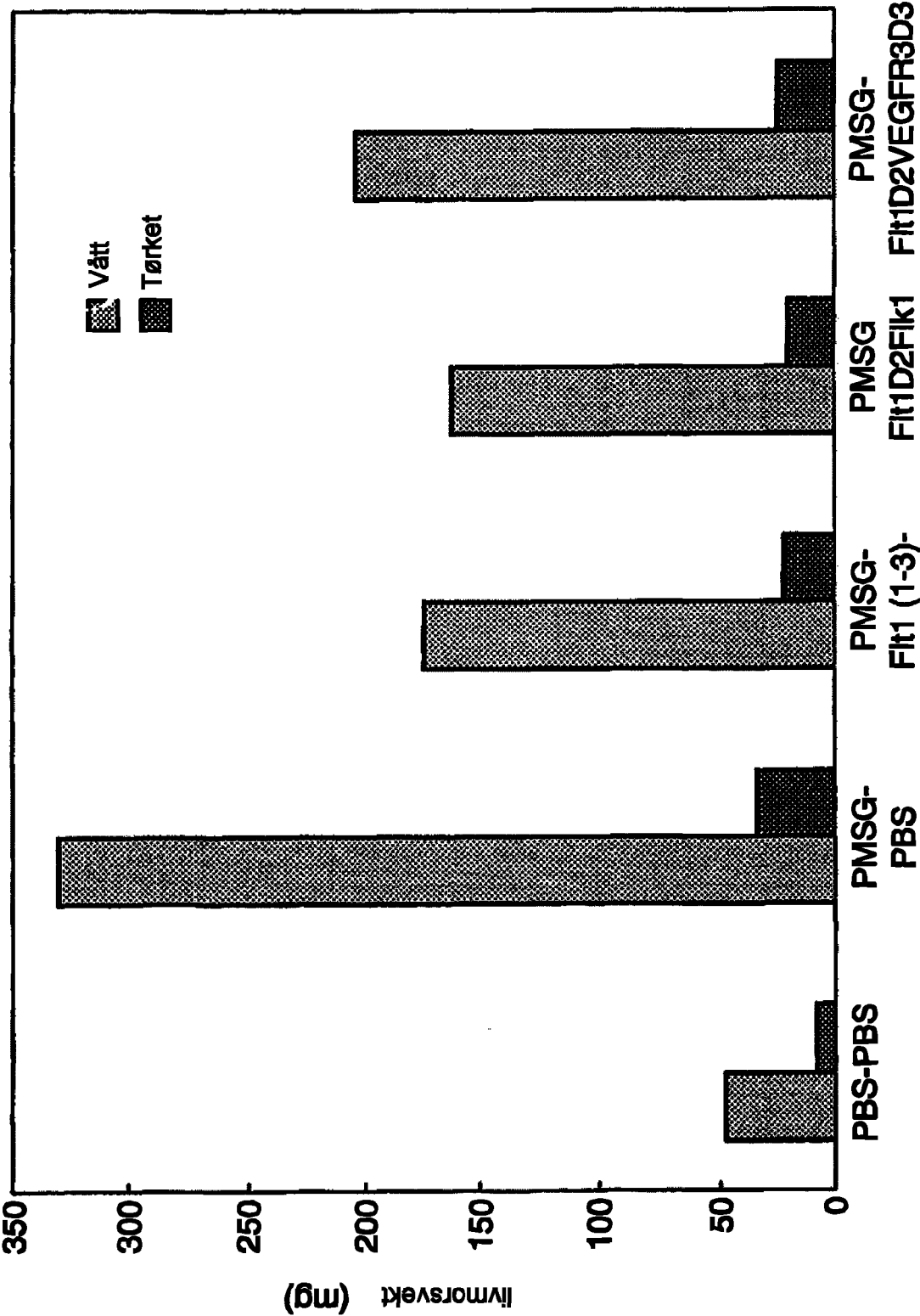


Fig. 33A.

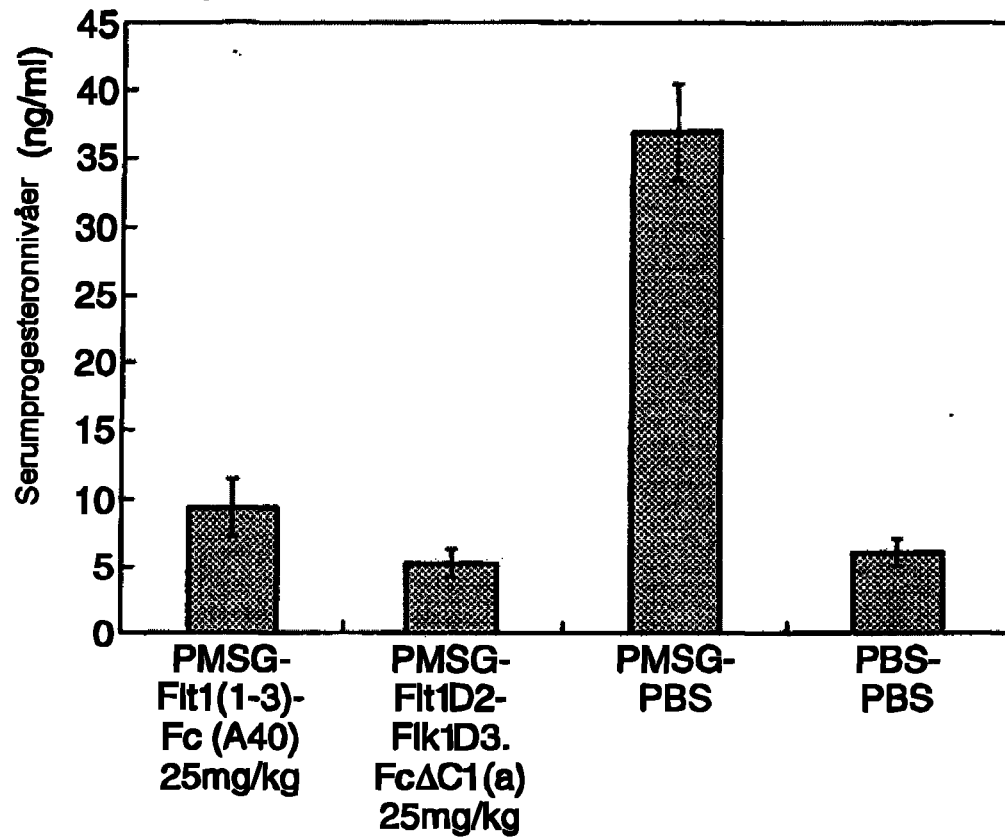


Fig. 33B.

