



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 28 529 T2** 2005.04.14

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 889 905 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 28 529.4**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/AU97/00049**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 901 476.8**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 97/028190**

(86) PCT-Anmeldetag: **29.01.1997**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **07.08.1997**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **13.01.1999**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **07.04.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **14.04.2005**

(51) Int Cl.<sup>7</sup>: **C07K 14/715**

**C07K 16/28, C12N 15/12, G01N 33/566,  
A61K 39/395**

(30) Unionspriorität:

**PN780096 30.01.1996 AU**

(73) Patentinhaber:

**Medvet Science Pty. Ltd., Adelaide,  
Süd-Australien/South Australia, AU**

(74) Vertreter:

**Mitscherlich & Partner, Patent- und  
Rechtsanwälte, 80331 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,  
LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**LOPEZ, Angel, Adelaide, AU; BAGLEY,  
Christopher, Adelaide, AU; WOODCOCK, Joanna,  
Adelaide, AU**

(54) Bezeichnung: **CYTOKINANTAGONISTEN UND -AGONISTEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung****GEBIET DER ERFINDUNG**

**[0001]** Diese Erfindung betrifft Verfahren zur Isolation von Antagonisten und Agonisten von Cytokinen.

**HINTERGRUND DER ERFINDUNG**

**[0002]** Der humane Granulocyten-Makrophagen-Kolonie stimulierende Faktor (GM-CSF), die Interleukine IL-3 und IL-5 sind Cytokine, die beim hämopoietischen Zellüberleben, bei der Herstellung und Funktion (als Übersicht in Lopez et al., 1992) beteiligt sind. Wegen dieser Eigenschaften werden IL-3 und GM-CSF gegenwärtig klinisch für die Knochenmarkserneuerung nach einer Chemotherapie und Radiotherapie (Groopman et al., 1987) verwendet. Allerdings ist ebenfalls offensichtlich geworden, dass eine übermäßige oder gegen die Regeln verstoßende Produktion von GM-CSF, IL-3 und IL-5 zu Krankheitszuständen führen kann. Beispielsweise sind erhöhte Mengen an GM-CSF in den Lungen von allergischen Individuen (Kato et al., 1992) und in den Gelenken von Patienten mit rheumatoider Arthritis (Williamson et al., 1988) gefunden worden. Erhöhte mRNA für IL-3, GM-CSF und IL-5 sind in der Haut von allergischen Individuen (Kay et al., 1991) gefunden worden. GM-CSF kann die Proliferation von Leukämiezellen (Young et al., 1986) stimulieren, und es ist gezeigt worden, dass IL-3 durch Follikel-B-Zellen-Lymphomas in autokriner Weise produziert wird, was zu einer Proliferation dieser Zellen in einer IL-3-abhängigen Weise (Clayberger et al., 1991) führt.

**[0003]** Es ist aus diesen klinischen Situationen deutlich, dass die Antagonisierung von GM-CSF, IL-3 und IL-5 von therapeutischem Wert sein kann, in Abhängigkeit der in Frage stehenden Erkrankung, wobei die Antagonisierung eines dieser Cytokine ausreichend sein kann.

**[0004]** Eine Zahl von Vorschlägen für Antagonisten ist bereits gemacht worden, beispielsweise in der Spezifikation WO 89 10403, und in der Spezifikation WO 95 04075 sind Varianten von GPM-CSF als Antagonisten zur GM-CSF-Wirkung identifiziert, allerdings gibt es keinen Hinweis darauf, dass diese Antagonisten für mehr als nur die GM-CSF-Wirkung effektiv sind.

**[0005]** Allerdings kann in anderen Situationen der simultane Antagonismus von allen drei GM-CSF, IL-3 und IL-5 erwünscht oder tatsächlich notwendig sein. Beispielsweise können Eosinophile, die der Hauptzelltyp, der bei Allergien beteiligt ist, sein sollen, zahlenmäßig erhalten werden und durch entweder IL-3, GM-CSF oder IL-5 (Lopez et al., 1989) stimuliert werden. Der Antagonismus aller drei Cytokine kann daher notwendig sein, um die Wirkungen von Eosinophilen und Basophilen zu inhibieren. In ähnlicher Weise können Basophile, von denen man ebenfalls annimmt, dass sie eine Effektorrolle bei der Allergie spielen, durch entweder IL-3, GM-CSF oder IL-5 (Lopez et al., 1990) stimuliert werden. Der Antagonismus von GM-CSF, IL-3 und IL-3 kann durch die gleichzeitige Verabreichung spezifischer Antagonisten für jedes verschiedene Cytokin bewerkstelligt werden. Obwohl dieses machbar ist, hat dieser Lösungsansatz den Nachteil, dass man bis zu drei verschiedene Proteine verabreichen muss, was nicht nur unbequem ist, sondern allerdings auch das Risiko der Immogenizität und anderen Nebeneffekten erhöht.

**[0006]** Ein Krankheitszustand, der hier herausragt und der durch erhöhte Gehalte dieser drei Cytokine bekämpft werden kann, ist das Asthma. Die Rollen vom GM-CSF, IL-3 und IL-5 bei Asthma und Allergien sind bereits intensiv untersucht worden und werden weiterhin intensiv untersucht. Verschiedene Studien, durch in situ Hybridisierung, haben erhöhte Gehalte von IL-5-mRNA in mononuklearen Lungenzellen (Fukuda et al., 1994; Robinson et al., 1992; Marini et al., 1992; Hamid et al., 1991) und in Eosinophilen (Broide et al., 1992) bei astmatischen Patienten gezeigt. Die Immunchemie hat ebenfalls erhöhte Mengen an IL-5 Protein in diesen Geweben (Ackerman et al., 1994) gezeigt. Bei Allergen induzierten Hautreaktionen in der späten Phase bei atopischen Individuen, ist erhöhte mRNA für IL-5, IL-3 und GM-CSF verzeichnet worden (Kay et al., 1991).

**[0007]** Bronchoalveolare Spüllflüssigkeiten (BAL) von symptomatischen Asthmapatienten zeigten größere IL-5-Gehalte als Patienten mit symptomatischen Asthma (Sur et al., 1995). Wenn weiterhin symptomatische Asthmapatienten mit einem Antigen in einem Lungensegment angegriffen wurden, verzeichnete man signifikante Gehalte von IL-5 (980 pg/ml) im Vergleich mit einem fingiert angegriffenen Segment des gleichen Patienten (2,8 pg/ml) (Sur et al., 1995). In einer anderen Studie mit ähnlichem Muster erhöhten sich die IL-5-Gehalte von nicht nachweisbar bis 2.800 pg/ml bei sowohl allergischen als auch nicht allergischen Asthmatikern (Zangrilli et al., 1995). Ein kausaler Zusammenhang zwischen den IL-5-Mengen und Asthma leitet sich aus Studien her, wobei die Behandlung von mittelschwerkranken asthmatischen Patienten mit Corticosteroiden für zwei Wochen zu einer Reduktion der Anzahl der Zellen, die IL-5-mRNA (Bentley et al., 1996) exprimieren, führ-

te. Diese Reduktion korrelierte mit der klinischen Verbesserung und ebenfalls mit dem Verlust von CD3<sup>+</sup>-T-Zellen und aktivierten (EG2<sup>+</sup>)-Eosinophilen.

**[0008]** GM-CSF ist ebenfalls in den Lungen von Asthmatikern nachgewiesen worden. Tatsächlich schien in einer Studie von Sputum-Cytokinen GM-CSF einen dominanten Effekt auf das Überleben von Eosinophilen zu haben (Adachi et al., 1995).

**[0009]** IL-5 aktiviert ebenfalls Eosinophile, um das EG2-Epitop zu exprimieren. In einigen Studien waren erhöhte IL-5-Gehalte mit EG2<sup>+</sup>-Eosinophilen in der Lunge assoziiert (Fukuda et al., 1994; Bentley et al., 1996). Des Weiteren gibt es eine Evidenz der gewebespezifischen Aktivierung von Eosinophilen. In einem Experiment wurde die Aktivierung von Eosinophilen in der Lunge mit denjenigen im Blut des gleichen Patienten verglichen. Die Aktivierung wurde durch die Zelloberflächenexpression von CR-3, p150/95, CD67, CD63 und den Verlust von L-Selektin festgestellt. Bei Patienten, die mit dem endobronchialen Antigen angegriffen wurden, wurden sowohl periphere Eosinophile als auch Lungeneosinophile bei 24 h gesehen, jedoch haben nur die Lungeneosinophile erhöhte Werte von GM-CSF-mRNA, was eine lokale Aktivierung dieser Zellen nahe legt. Außerdem gab es eine Evidenz für die Aktivierung von Eosinophilen in der Lunge, allerdings nicht von denen aus Blut. Dieses Ergebnis stimmt mit einem spezifischen Effekt von IL-5 auf Lungen auf Eosinophile und ihre Beteiligung bei Asthma überein.

**[0010]** Tiermodelle legen ebenfalls eine Rolle für IL-5 bei Asthma nahe. Die am meisten signifikanten Daten gibt es mit einem Antikörper (TRFK-5), gegen IL-5 in Affenmodellen von Asthma (Mauser et al., 1995). Ascaris-empfindliche Cynomolgusaffen wurden mit aerosolisierten Ascaris suum Extrakten angegriffen. 0,3 mg/kg TRFK beseitigte die erhöhte Luftwegreaktivität und verminderte die Zahl der Eosinophile in den BAL-Flüssigkeiten. Interessanterweise hielt diese Inhibierung für 3 Monate an (Mauser et al., 1995). Studien mit dem Guinea-schwein haben diese Schlussfolgerung unterstützt (Mauser et al., 1993). Weiterhin hatten Mäuse, bei denen das IL-5-Gen genetisch entfernt war, nicht nur nicht nachweisbares IL-5 und eine signifikante Reduktion der Anzahl der Eosinophile, sondern sie entwickelten ebenfalls signifikant weniger schweres Asthma (wie durch Luftweghyperreaktivität und Lungenschädigung festgestellt wurde) als IL-5-Gen positive Artgenossen (Foster et al., 1996). Ein deutliches Beispiel für die Wiederherstellung von Luftwegereaktionen gegenüber Methacholin wurde verzeichnet, nachdem IL-5-defiziente Mäuse IL-5-exprimierenden, allerdings nicht kontrollierenden, Vaccinivirusinfektionen ausgesetzt wurden (Foster et al., 1996).

**[0011]** Eine mögliche Rolle für das GM-CSF beim Asthma ist ebenfalls durch die Überexpression von GM-CSF in der Rattenlunge, was zu Eosinophilie, Makrophagengranulomae und fibrotischer Reaktion führt, ein Dreierelement, das ebenfalls bei Asthma verzeichnet wird, nahegelegt worden (Xing et al., 1996).

**[0012]** Humanes Interleukin (IL)-3, Granulocyten-Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor (GM-CSF) und IL-5 üben ihren biologischen Effekt dadurch aus, dass sie an spezifische Oberflächenrezeptoren auf der Oberfläche von Zellen (Bagley et al., 1995; Elliott et al., 1989; Park et al., 1989; Lopez et al., 1991) binden. Die Rezeptoren sind Heterodimere, die eine  $\alpha$ -Kette, die für jeden Liganden spezifisch ist, und eine  $\beta_c$ -Kette ( $\beta_c$ ), die zwischen den drei Rezeptoren geteilt wird, umfasst (Lopez, et al., 1992; Kitamura et al., 1991). Während jeder Ligand an die jeweilige  $\alpha$ -Kette bindet, gibt es für  $\beta_c$  eine höhere Affinität, was eine Signalgebung ermöglicht (Miyajima et al., 1992 und US-Patent 5112961 von Hayashida et al.). Die Erfinder des US-Patents Nr. 5112961 legen nahe, dass der Rezeptor hoher Affinität ein wertvolles Werkzeug dafür ist, Kandidaten für GM-CSF-Agonisten und Antagonisten zu screenen.

**[0013]** Weil alle drei dieser Cytokine über eine gemeinsame Rezeptoruntereinheit ( $\beta_c$ ) agieren, was wir hierzu vor als Hypothese aufgestellt haben (Bagley et al., 1995 diese Referenz ist hiermit eingeschlossen), kann es möglich sein, die Wirkung von GM-CSF, IL-3 und IL-5 mit einer einzigen Verbindung zu inhibieren. Es gibt allerdings bisher noch kein Mittel, sich dem Problem des Findens eines Effektors anzunähern, der in koordinativer Weise auf alle drei Cytokine wirkt. Es ist beispielsweise nicht klar, welche Region der gemeinsamen Rezeptoruntereinheit ( $\beta_c$ ) durch diese Cytokine gebunden wird und ob die gleiche Region für alle drei Cytokine bindet oder ob drei verschiedene Regionen beteiligt sind.

**[0014]** Die Analyse von  $\beta_c$  hat gezeigt, dass sie vier extrazelluläre Domänen (Goodall et al., 1993) enthält, mit einer Domäne 1, die das meiste der N-terminalen Domäne darstellt und einer Domäne 4, die das meiste der membran-nahen Domäne repräsentiert. Jede Domäne besteht aus sieben  $\beta$ -Strängen, die zusammen durch ineinander verschlungenen Schleifen verknüpft sind. Die hier interessierende Schleife, die F'-G'-Schleife befindet sich in der Domäne 4 von  $\beta_c$ . Die hier interessierenden Reste werden vom N-Terminus am Primärtranslationsterminus mit dem Initiationsmethionin, das Met<sup>1</sup> ist, nummeriert.

**[0015]** Die molekulare Basis für die Affinitätsumwandlung von  $\beta_c$  an jeden Liganden ist noch nicht vollständig verstanden, weil der Liganden-Rezeptor-Komplex noch nicht kristallisiert worden ist. Allerdings ist es wahrscheinlich, durch Analogie zur Wechselwirkung des Wachstumshormons (GH) mit seinem homodimären Rezeptor (DeVos et al., 1992), dass es eine direkte Wechselwirkung zwischen dem Liganden und den Rezeptor- $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten gibt. In dem GH : GH-Rezeptorsystem sind die Kontaktpunkte zwischen GH und GHbp2 aus der Röntgenstrahlkristallographie des GH : GHbp1 und 2-Komplexes (DeVos et al., 1992) bestimmt worden. Durch Analogie mit diesem System haben wir (Woodcock et al., 1994) und andere (Lock et al., 1994) kürzlich gezeigt, dass die B'-C'-Schleife von  $\beta_c$  eine gewisse Rolle bei der hohen Affinitätsbindung von GM-CSF, IL-3 und IL-5 spielt. Insbesondere ist gezeigt worden, dass drei Reste, Tyr<sup>365</sup>, His<sup>367</sup> und Ile<sup>368</sup> wichtig für die GM-CSF- und IL-5-Hochaffinitätsbindung sind, wobei sie allerdings nur marginal an der IL-3-Hochaffinitätsbindung beteiligt sind (Woodcock et al., 1994). Diese Ergebnisse implizieren, dass ein gezieltes Zusammenspiel dieser drei Aminosäuren mit geeigneten Verbindungen die GM-CSF- und IL-5-vermittelte Aktivität, allerdings nicht die IL-3-vermittelte Aktivität, beeinflussen kann.

#### Zusammenfassung der Erfindung

**[0016]** Unter Verwendung molekularer Gestaltungstechniken haben wir kürzlich postuliert, dass die F'-G'-Schleife bei der Ligandenbindung (Bagley et al., 1995) beteiligt sein kann. Die Erfindung ist aus einer Untersuchung über diese vorausgesagte F'-G'-Schleife von  $\beta_c$  und aus der Feststellung, dass diese Schleife wesentlich für die Hochaffinitätsbindung und für die Signalgebung aller drei Cytokine GM-CSF, IL-3 und IL-5 ist, entstanden.

**[0017]** Ein weiterer Aspekt dieser Erfindung ist als Ergebnis der überraschenden Identifikation einer einzelnen Aminosäure in der Rezeptor- $\beta_c$ -Kette für GM-CSF, IL-3 und IL-5 entstanden, die notwendig für die Hochaffinitätsbindung aller dieser drei Liganden an ihre Oberflächenrezeptoren und für die Signalgebung und für die Tatsache, dass alle drei dieser Cytokine die F'-G'-Schleife für die Hochaffinitätsumwandlung benötigen, ist. Es wird angenommen, dass Verbindungen, die an Tyr<sup>421</sup> binden oder die Bindung des Liganden an Tyr<sup>421</sup> inhibieren, sich wie generische Antagonisten von IL-3, GM-CSF und IL-5 verhalten. Es wird angenommen, dass Verbindungen, die an F'-G'-Schleife binden, sterisch diese Bindung inhibieren.

**[0018]** Zusätzlich haben möglicherweise diese Feststellungen auch Einflüsse auf andere Mitglieder der Cytokinrezeptorsuperfamilie, einige davon teilen sich Untereinheiten in einer gegebenen Subfamilie (das heißt, sie binden einige Cytokine), und einige davon sind Liganden spezifisch und binden an nur ein Cytokin. Die Rezeptor- $\alpha$ -Ketten für GM-CSF, IL-3 und IL-5 und  $\beta_c$  gehören zu der sich schnell vergrößernden Cytokinrezeptorsuperfamilie. Innerhalb dieser Superfamilie haben sich mittlerweile verschiedene Subfamilien hervor getan, die sich durch das Teilen einer gemeinsamen Rezeptoruntereinheit durch multiple Liganden auszeichnen: gp130 wirkt als Affinitätsumwandler und Signalumwandler für IL-6 (Hibi et al., 1990; Taga et al., 1992), IL-11 (Hilton et al., 1994), Oncostatin M (Liu et al., 1992), ziliärer neutrophischer Faktor, Leukämieinhibierungsfaktor (LIF) (Ip et al., 1992) und Cardiotrophin-1 (Pennica et al., 1995); der LIF-Rezeptor (LIFR) bindet ebenfalls an den ziliären neutrophischen Faktor (Davis et al., 1993), Cardiotrophin-1 (Pennica et al., 1995) und Oncostatin M zusätzlich zu LIF (Gearing et al., 1994); IL-2R  $\beta$  unterstützt die Affinitätsumwandlung und die Signalgebung von IL-2 und IL-15 (Giri et al., 1994); die IL-2R  $\gamma$ -Kettenaffinität wandelt IL-2 (Takeshita et al., 1992), IL-4 (Russell et al., 1993), IL-7 (Noguchi et al., 1993), IL-9 (Kimura et al., 1995) und IL-15 (Giri et al., 1994) um; die Evidenz legt ebenfalls nahe, dass IL-4 und IL-13 eine Rezeptorkomponente teilen (Zurawski et al., 1993) und diese Untereinheit ist erst kürzlich kloniert worden (Hilton et al., 1996). Es ist nicht bekannt, welche Reste in gp130, LIFR und den IL-2R  $\beta$ - und  $\gamma$ -Ketten für die Ligandenbindung wichtig sind oder welche verschiedenen Liganden tatsächlich einmalige Sets von Bindungsdeterminanten auf diesen gemeinsamen Rezeptoruntereinheiten teilen oder besitzen. Da diese gemeinsamen Untereinheiten für die Übertragung von Signalen durch verschiedene Liganden wichtig sind, tritt die Möglichkeit zutage, dass ein Eingreifen in die Fähigkeit dieser gemeinsamen Untereinheiten, den Liganden zu binden oder Homodimere zu bilden, die Aktion von mehr als einem Liganden beeinträchtigen kann.

**[0019]** Ein Vergleich der vorhergesagten F'-G'-Schleife von  $\beta_c$  mit derjenigen von verschiedenen herkömmlichen Untereinheiten und Liganden spezifischen Rezeptoruntereinheiten haben die Gegenwart von Tyrosin und anderen ähnlichen hydrophoben Resten in diesem Bereich (Tabelle 3) gezeigt. Obwohl die genaue Länge dieser putativen Schleife zwischen 7 bis 14 Aminosäuren unter den verschiedenen Rezeptoren variiert, ist sie auf 2 streng konservierte Sequenzen eingegrenzt; der VRVR-Konsensus am N-Terminus und der WSXWS-Konsensus am C-Terminus. Es ist nahegelegt, dass, obwohl die Natur der Liganden-Rezeptor-Wechselwirkung spezifisch für das beteiligte System ist, die hydrophoben aromatischen Reste im Rezeptor starke Kandidaten für die Ligandenwechselwirkung darstellen. Daher können Mitglieder der Cytokinrezeptorfamilie ein strukturell

konserviertes Rezeptorgerüst verwenden, um eine Serie von Schleifen auszubilden, die durch vornehmlich hydrophobe Wechselwirkungen die Bindung der spezifischen Liganden unterstützen. Eine Unterstützung für diese Idee stammt ebenfalls aus der Mutationsanalyse von IL-6 R, die gezeigt hat, dass eine Mutante, bei der sowohl Glu<sup>297</sup> als auch Phe<sup>298</sup> in der F'-G'-Schleife substituiert waren, einen Verlust der IL-6-Bindung zeigte (Yawata et al., 1993).

**[0020]** Eine neuere Analyse der Reste, die bei der Bindung des Wachstumshormons in GHR beteiligt sind, hat gezeigt, dass der größte Beitrag zur Affinität von hydrophoben Wechselwirkungen kommt (Clackson and Wells, 1995). Die systematische Alaninsubstitution der 33-Reste in GHR, die bekannterweise einer Zersetzung bei der Wachstumshormonbindung nicht zugänglich sind, zeigte, dass die Substitution von nur 11 dieser Reste einen signifikanten Effekt auf die Affinität hatte, und davon waren sechs hydrophob. Des Weiteren sind diese hydrophoben Reste auf der Oberfläche von GHR in einer Region geclustert, die die Grenzfläche für die Wechselwirkung mit dem Wachstumshormon bildet. Außerdem trat bei GHR die größte Affinitätsreduktion bei der Substitution von zwei Tryptophanresten auf (Clackson and Wells, 1995; Bass et al., 1991), was impliziert, dass hydrophobe aromatische Reste sehr wichtig für die Ligandenwechselwirkung sind. Aufgrund unserer vorliegenden Studie und früheren Arbeiten (Woodstock et al., 1994) haben wir nun eine Gesamtheit von drei hydrophoben Resten in vorhergesagten Schleifen identifiziert, die eine Rolle bei der Ligandenwechselwirkung in  $\beta_c$  spielen, Tyr<sup>365</sup>, Ile<sup>368</sup> und Tyr<sup>421</sup>. Daher scheint es, dass die Bindung von  $\beta_c$  an GM-CSF, IL-3 und IL-5 ebenfalls vornehmlich durch die hydrophobe Wechselwirkung unterstützt wird.

**[0021]** Es ist interessant, diese Erkenntnisse im Hinblick auf  $\beta_c$  der GM-CSF-, IL-3- und IL-5-Rezeptoren mit der Kristallstruktur- und Mutationsanalyse von GH-GHR zu vergleichen. Im Gegensatz zu heterodimeren Natur der GM-CSF-, IL-3- und IL-5-Rezeptoren ist GHR ein Homodimer. Die beiden identischen Untereinheiten von GHR binden das Wachstumshormon nacheinander und auf nicht äquivalente Weise. In der Kristallstruktur werden die beiden Wachstumshormonbindungsproteine entsprechend als GHbpl und GHbpII identifiziert. Die Anfangswechselwirkung von GHbpl nutzt die Kontakte der Stellen I im Wachstumshormon und ist relativ stark mit einer Dissoziationskonstante von 600 pM (Cunningham et al., 1991). Die nachfolgende Wechselwirkung mit GHbpII über die Kontakte der Stelle II erniedrigt die Dissoziationskonstante auf 200 pM. Deswegen verleiht die Wechselwirkung von GHbpII mit dem Wachstumshormon, das an GHbpl gebunden ist, eine dreifache Erhöhung der Affinität auf dem Rezeptorkomplex. Demzufolge ist funktionell der humane  $\beta_c$  analog GHbpII, wobei nur nach der Anfangsassoziations des Liganden mit der Rezeptor- $\alpha$ -Kette gebunden wird und eine 1.000-fache Erhöhung der Affinität auf dem Rezeptorkomplex verliehen wird (wie es der Fall bei IL-3 ist). Die hier präsentierten Ergebnisse zeigen allerdings drei signifikante Unterschiede zur GH-GHR-Wechselwirkung. Als erstes ist die F'-G'-Schleife in GHbpl und nicht in GHbpII (analog zu  $\beta_c$ ) bei der Ligandenbindung beteiligt. Als zweites, obwohl die Reste in der F'-G'-Schleife von GHbpl effektiv bei der Bindung des Wachstumshormons, Lösungsmittel ausgeschlossen bei der Bindung des Wachstumshormons, sind, was einen engen Kontakt zwischen Ligand und Rezeptor indiziert, gibt es offenbar eine sehr geringe produktive Wechselwirkung zwischen den beiden Proteinen in dieser Region. Die Alaninüberprüfungsmutagenese über die Reste dieser Schleife in GHR hatte einen sehr geringen Effekt auf die Wachstumshormonbindungsaffinität in Relation zum Wildtyp-Rezeptor (Clackson and Wells, 1995; Bass et al., 1991). Daher trägt der Kontakt zwischen der F'-G'-Schleife von GHbpl und dem Wachstumshormon wenig zur Bindungsaffinität des Rezeptors bei. Dieses ist im Kontrast zu unseren Feststellungen hier, wo wir einen vollständigen Verlust der Affinitätsumwandlung für alle Liganden bei der Substitution von Tyr<sup>421</sup> beobachten, was eine sehr starke Wechselwirkung zwischen diesem Rest und Ligand im Wildtypmolekül indiziert.

**[0022]** Drittens und konsistent mit dem Mangel einer produktiven Wechselwirkung zwischen der F'-G'-Schleife von GHR und GH, gibt es keine hydrophoben Reste in dieser Schleife. Deswegen, obwohl GHR Kontaktstellen einer deutlich hydrophoben Natur benutzt, liegen diese irgendwo in diesem Rezeptor, was anzeigt, dass der Beitrag zur Affinität der verschiedenen Kontaktstellen unterschiedlich in  $\beta_c$  relativ zu GHR ist.

**[0023]** Der Erfindung liegt ein Verfahren zugrunde, bei dem ein therapeutisches Mittel isoliert wird, das an die F'-G'-Schleife von Domäne 4 der gemeinsamen  $\beta_c$ -Kette des Rezeptors für GM-CSF, IL-3 und IL-5 oder an eine analoge Schleife eines anderen Cytokinrezeptors binden kann, wobei dieses Verfahren die Stufen umfasst, bei denen Kandidatenmoleküle auf ihre Fähigkeit überprüft werden, an diese Schleife zu binden.

**[0024]** In einer Form dieses zweiten Aspekts der Erfindung umfasst die Stufe der Überprüfung von Kandidatenmolekülen auf ihre Fähigkeit an diese Schleife zu binden, die Überprüfung auf die Fähigkeit, an eine Sequenz zu binden, die aus der Gruppe gewählt ist, die SEQ ID Nr. 1, SEQ ID Nr. 2, SEQ ID Nr. 3, SEQ ID Nr. 4; SEQ ID Nr. 5, SEQ ID Nr. 6, SEQ ID Nr. 7, SEQ ID Nr. 8, SEQ ID Nr. 9, SEQ ID Nr. 10, SEQ ID Nr. 11 und SEQ ID Nr. 12 umfasst. Es sollte ebenfalls verstanden werden, dass als Alternative nur die zu überprüfende Schleife

aus solchen gewählt sein kann, die von einem gemeinsamen Signalübertragungsrezeptor stammt, oder als zweite Alternative von solchen Rezeptoren mit einem hydrophoben Aminosäurerest oder als dritte Alternative von einem solchen Rezeptor, die Signalübertragungsrezeptoren sind.

**[0025]** Alternativ könnte gesagt werden, dass die Erfindung in einem Verfahren zu sehen ist, bei dem ein therapeutisches Mittel isoliert wird, durch Überprüfen auf die Fähigkeit der Verbindungen, an das Tyr<sup>421</sup> der gemeinsamen  $\beta_c$  des Rezeptors für GM-CSF 6, IL-3 und IL-5, oder den entsprechenden aromatischen hydrophoben Rest von gp130 oder an einen analogen aromatischen hydrophoben Rest eines anderen gemeinsamen Signalübertragungsrezeptors oder an einen spezifischen Rezeptor, der auf andere Cytokine antwortet, zu binden.

**[0026]** Das Mittel kann ein Antikörper oder Fragment davon sein, und das Verfahren zur Isolierung dieses Antikörpers sollte so verstanden werden, dass weiterhin die Stufen der Impfung eines Tieres mit einem Peptidmolekül mit der F'-G'-Schleife, der Fusion der Antikörper produzierenden Zellen mit einer Myelomzelllinie und die Überprüfung auf eine Zelllinie, die einen Antikörper reaktiv mit dieser F'-G'-Schleife und das Ernten von Antikörpern aus der Zelllinie, das Austesten auf die Inhibierung der Hochaffinitätsbindung und das Testen auf die Inhibierung oder Anregung der Funktion umfasst. Das kann weiterhin die Herstellung kleiner Fragmente der Antikörper, die durch die Zelllinie, die an die Schleife binden kann, hergestellt werden, umfassen. Die Zelllinie kann in geeigneter Weise eine Mauszellenlinie sein, und das Verfahren kann weiterhin den weiteren Schritt der Humanisierung der Antikörperfragmente durch Ersatz der Maussequenzen mit humanen Sequenzen in den nicht bindenden Regionen umfassen.

**[0027]** Mittel, die durch das erfindungsgemäße Verfahren identifiziert werden können, könnten in einem Verfahren zur Behandlung eines Menschen oder eines Tiers einer Krankheit verwendet werden, wobei das Verfahren die Stufe der Verabreichung eines wie oben identifizierten therapeutischen Mittels in einem pharmazeutisch annehmbaren Träger und in einer therapeutisch effektiven Dosis umfassen.

**[0028]** Es könnte erwünscht sein, die Erkrankung mit einem oder mehreren der hier identifizierten oder definierten therapeutischen Mitteln in Kombination zu behandeln, und vielleicht in Kombination mit anderen therapeutischen Mitteln.

**[0029]** Die Behandlung könnte als Ziel die Prävention durch Reduktion des Risikos der Erkrankung abzielen, oder die Behandlung kann dafür verwendet werden, die Erkrankung zu lindern oder zu beseitigen. Die Verabreichung des therapeutischen Mittels kann jede pharmazeutisch annehmbare Form sein und in einem geeigneten Träger vorliegen.

**[0030]** Es wird angenommen, dass die Konstruktion der Verbindungen, die die F'-G'-Schleife von  $\beta_c$  binden, therapeutisch nützlich für Behandlungen von Krankheiten sind, wo IL-3, GM-CSF und IL-5 eine pathogene Rolle spielen, hauptsächlich die Allergie, Asthma, Leukämie, Lymphom und Entzündungen, einschließlich Arthritis.

**[0031]** Ähnlich wie bei anderen Cytokinrezeptoren wird angenommen, dass Antagonisten oder Agonisten therapeutisch nützlich sind. Somit auch für gemeinsame Signalübertragungsrezeptoren. Da gp130 funktionell analog zu  $\beta_c$  in dem GM-CSF/IL-3/IL-5-Rezeptorsystem in der Weise ist, dass es eine gemeinsame Bindungsuntereinheit und Signalüberträger für IL-6, Onkostatin M (OSM), ziliärer neurotrophischer Faktor (CNTF), Leukämieinhibitionsfaktor (LIF) und IL-11 ist, ist nahegelegt, dass die Einnahme/Blockierung dieses Tyrosins zu einem Antagonismus von IL-6, LIF, OSM, CNTF und IL-11 führt. Der Antagonismus dieses Rezeptorsystems ist bei Entzündungen, Leukämie und Lymphomen nützlich. Die Antagonisten von IL-2R $\beta/\gamma$  können als Immununterdrücker nützlich sein. Der Antagonismus von LIFR kann für die Verhinderung der Implantation von Embryos im Uterus nützlich sein. Der Antagonist von IL-4/IL-13 inhibiert die IgE-Produktion und kann bei der Behandlung von Asthma und Allergien nützlich sein.

**[0032]** Für spezifische Untereinheiten. Der Antagonist von IL-3 kann für die Behandlung von Allergien und Follikel-B-Zellen-Lymphome geeignet sein. Der Antagonist von IL-4 kann die IgE-Produktion inhibieren und für die Behandlung von Asthma und Allergien nützlich sein. Der Antagonist von IL-6R kann als entzündungshemmendes Mittel nützlich sein und kann dafür verwendet werden, das Myelomwachstum zu inhibieren. Antagonisten gegen IL-7 können als Immunsuppressoren nützlich sein. Antagonisten des Leptinrezeptors (OBR) können bei der Behandlung von Cachexie, Gewichtsverlust bei Erkrankungen, wie AIDS, Krebs und Parasitenkrankheiten, nützlich sein.

**[0033]** Der identifizierte Rest spielt deutlich eine vorherrschende Rolle bei der Wirkung des Systems und während einige Moleküle, die mit der F'-G'-Schleife von  $\beta_c$  oder mit entsprechenden Resten in anderen Rezeptoren, (solche wie in Tabelle 3 gezeigt) Wechselwirken, können erwartungsgemäß einen Antagonisteneffekt aufweisen können. Es ist allerdings auch möglich, dass sie einen Agonisteneffekt insbesondere bei Rezeptoren, die durch Homodimerisierung aktiviert werden können, aufweisen.

**[0034]** Als erstes die allgemeinen Signalübertragungsrezeptoren. Agonistenmittel, die an  $\beta_c$  binden, können dafür verwendet werden, um die Hämoopoiesis zu stimulieren und die Immunantwort gegenüber Mikroorganismen zu verstärken. Agonistenmittel, die an LIFR binden, können für die Unterdrückung der embryonalen Stammzellendifferenzierung nützlich sein. Agonisten, die an IL-2R $\beta$  binden, können bei der Immunstimulation eingesetzt werden. Agonistenmittel, die an IL-4R/IL-13 binden, können eine Antitumoraktivität aufweisen.

**[0035]** Nun zu den spezifischen Untereinheiten. Agonistenmittel, die IL-3 binden, können bei der in vivo und ex vivo Ausbreitung von frühen hämopoetischen Zellen verwendet werden. Agonistenmittel, die an IL-4 binden, können eine nützliche Antitumoraktivität aufweisen. Agonisten, die an IL-7R binden, können eine nützliche Antitumorimmunität aufweisen. Agonistenmittel, die IL-11 binden, können ein nützliches Mittel in der Krebstherapie darstellen. Agonistenmittel, die an EPOR binden, können dafür verwendet werden, Anämie und chronische Nierenleiden oder chronische Entzündungserkrankungen oder maligne Erkrankungen zu korrigieren. Agonistenmittel, die an TPOR binden, können für die Korrektur von Thrombocytopenie (kann mit chronischen Entzündungserkrankungen, malignen Erkrankungen, Chemo- und Radiotherapie assoziiert sein) nützlich sein.

**[0036]** Beispiele für geeignete Agonisten sind solche für Erythropoietin und Thrombopoietin, um die Zahl der Erythrocyten und Blättchen im Blut nach einem Blutzellenverlust, der Chemotherapie, Radiotherapie, Immunsuppression oder Knochenmarktransplantation zu erhöhen. Agonisten für OBR können dafür verwendet werden, einen Gewichtsverlust zu induzieren, und insbesondere und nicht-Insulin abhängigen Diabetes mellitus beiträgt. Die Moleküle, sei es Agonist oder Antagonist, können auf der Basis ihrer Fähigkeit, mit dem identifizierten Rest in Wechselwirkung zu treten, isoliert werden.

**[0037]** Als kurze Anmerkung, die folgenden Drei- und Einbuchstabenabkürzungen für Aminosäurereste werden in der Spezifikation, wie in Tabelle 1 definiert, verwendet.

**[0038]** Wenn der spezifische Aminosäurerest durch seine Position im Polypeptid eines Proteins angegeben wird, wird die Aminosäureabkürzung mit der Nr. des Restes, angegeben als Superscript (das heißt Xaa<sup>n</sup>) verwendet.

TABELLE 1

Aminosäure	Drei-Buchstaben- Abkürzung	Ein-Buchstaben- Abkürzung
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutamsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

## Kurze Beschreibung der Zeichnungen

**[0039] Fig. 1A** Ist eine schematische Darstellung der extrazellulären Domäne von menschlichem  $\beta_c$ , die zwei Cytokin-Rezeptor-Module (CRM1 & 2) (Goodall et al., 1993) und konservierte Merkmale der Cytokinrezeptor-superfamilie (Bazan 1990) zeigt.

**[0040] Fig. 1B** Stellt die Aminosäuresequenzen dar, die der putativen F'-G' Schleife in der Membran proximal zu CRM2 von  $\beta_c$  (Hayashida et al., 1990) entsprechen, ausgerichtet mit den F'-G' Schleifen des Wachstumshormonrezeptors (GHR) (Leung et al., 1987) und Prolactinrezeptors (PRLR) (Boutin et al., 1988). Konservierte Strukturmotive sind als Box dargestellt, und zuvor identifizierte Reste, die am Ligandenkontakt (GH) beteiligt sind (De Vos et al., 1992, und Somers et al., 1994) sind fettgedruckt gezeigt. Die mutanten Formen von  $\beta_c$ , die hergestellt wurden, um die Ligandenbindungs determinanten zu identifizieren, sind mit mutierten Resten fettgedruckt.

**[0041] Fig. 2** Zeigt graphische Darstellungen, die zeigen, dass die Alaninsubstitution der Reste 418–422 in  $\beta_c$  die Hochaffinität der GM-CSF und IL-3-Bindung abschaltet. Es wurde eine Scatchard-Transformation in Sättigungsbindungsexperimenten unter Verwendung von  $^{125}\text{J-GM-CSF}$  (linkes Diagramm) und  $^{125}\text{J-IL-3}$  (rechtes Diagramm) mit COS-Zellen durchgeführt, die sowohl GM-CSFR und IL-3R- $\alpha$ -Ketten zusammen mit dem Wildtyp (o) oder der Mutante  $^{418}\text{AAAAA}^{422}(\bullet)\beta_c$  exprimieren. Der radioiodinierte Ligandenkonzentrationsbereich für GM-CSF- und IL-3 betrug 10 pM–10 nM, und die nicht spezifische Bindung wurde in Gegenwart von 1  $\mu\text{M}$  nicht markiertem Liganden bestimmt. Die gestrichelte Linie zeigt die hohe und niedrige Affinitätsbindung der Komponenten unter Verwendung von Wildtyp  $\beta_c$ , und die durchgezogene Linie stellt die Linie der besten Übereinstimmung für die  $^{418}\text{AAAAA}^{422}$ -Mutante  $\beta_c$  dar, was unter Verwendung des Ligand-Programms bestimmt wurde. Ein repräsentatives Experiment ist gezeigt, und die  $K_d$ -Werte, die daraus resultieren und verschiedene andere Experimente sind in Tabelle gezeigt.

**[0042] Fig. 3** Zeigt den Effekt einer einzelnen Alaninsubstitution der Reste Arg<sup>418</sup>, Thr<sup>419</sup>, Gly<sup>420</sup>, Tyr<sup>421</sup> und Asp<sup>422</sup> von humanem  $\beta_c$  auf die Hochaffinitäts-GM-CSF- und IL-3-Bindung. Die Scatchard-Transformation der Sättigungsbindungsstudien mit  $^{125}\text{J-GM-CSF}$  (oberer Teil) und  $^{125}\text{J-IL-3}$  (unterer Teil) wurden wie in Fig. 2 beschrieben durchgeführt. Die gestrichelte Linie zeigt die Hoch- und Niedrig-Affinitätsbindungskomponenten unter Verwendung von Wildtyp  $\beta_c$  (o) und die nicht unterbrochene Linie zeigt die Linie der besten Übereinstimmung.

mung für jede Mutante  $\beta_c$  ( $\bullet$ ), was unter Verwendung des Ligand-Programms bestimmt wurde. Ein repräsentatives Experiment ist gezeigt, und die  $K_d$ -Werte aus diesen und ähnlichen Studien sind in Tabelle 2 gezeigt.

**[0043] Fig. 4** Zeigt den Effekt der Wiedereinführung von Tyr<sup>421</sup> in ein polyanalinsubstituiertes  $\beta_c$  (<sup>418</sup>AAAYA<sup>422</sup>) auf die Hochaffinitäts- GMB-CSF und IL-3-Bindung. Die Scatchard-Transformation von Sättigungsbindungsstudien mit <sup>125</sup>J-GM-CSF (linke Seite) und <sup>125</sup>I-IL-3 (rechte Seite) wurden wie in **Fig. 2** beschrieben durchgeführt. Die unterbrochene Linie zeigt die Hoch- und Niedrigaffinitätsbindungskomponenten unter Verwendung von Wildtyp  $\beta_c$  (o), und die durchgehende zeigt die Linie der besten Übereinstimmung für die <sup>418</sup>AAAYA<sup>422</sup>-Mutante  $\beta_c$  ( $\bullet$ ), was unter Verwendung des Ligand-Programms bestimmt wurde. Ein repräsentatives Experiment ist gezeigt, und die  $K_d$ -Werte aus diesen und ähnlichen Studien sind in Tabelle 2 gezeigt.

**[0044] Fig. 5A** Ist die Darstellung eines Autoradiogramms, das zeigt, dass STAT5-ähnliche (STAT5-L) Aktivität durch GM-CSF und IL-3 nur in Jurkat-Zellen, die geeignete  $\alpha$ -Ketten zusammen mit dem Wildtyp (Wt)  $\beta_c$  exprimieren, induziert wird. Nukleare Extrakte wurden aus transfizierten Jurkat-Zellen, die für eine Stunde mit oder ohne 300 nM Cytokin stimuliert waren, und über einen elektrophoretischen Mobilitätsverschiebungssassay unter Verwendung einer STAT-5 spezifischen Sonde analysiert.

**[0045] Fig. 5B** Ist eine Darstellung eines Autoradiogramms ähnlich zu dem von **Fig. 5A**, das zeigt, dass das DNA-Bindungsprotein, das durch Cytokin in Rezeptor transfizierten Jurkat-Zellen induziert wird, sich wie STAT5 verhält. Ein nuklearer Extrakt, der aus GM-CSF-stimulierten transfizierten Jurkat-Zellen hergestellt war, wurde einem elektrophoretischen Mobilitätsverschiebungssassay in Gegenwart eines 50-fachen molaren Überschusses von konkurrierenden nicht radioaktiven Oligonucleotiden unterworfen. Die Oligonucleotide für die Kompetition waren: das  $\beta$ -Caseinpromotorelement ( $\beta$ -cas), eine Mutante für das  $\beta$ -Caseinpromotorelement (mut  $\beta$ -cas), eine AP-1-Konsensusbindungsstelle (AP-1) und das Haemopoietinrezeptorantwortelement (HRE).

**[0046] Fig. 6A** Ist eine graphische Darstellung, dass Y421A  $\beta_c$  STAT5-L mit reduzierter Potenz als Reaktion auf die GM-CSF-Stimulierung aktiviert. Eine Dosis/Antwort-Studie der cytokininduzierten STAT5-L-Aktivität wurde mit Jurkat-Zellen durchgeführt, die mit  $\alpha$ -Ketten und entweder Wild-Ty-  $\beta_c$  (o) oder Y421A ( $\bullet$ ) transfiziert waren. Die STAT5-L-Aktivität wurde durch einen elektrophoretischen Mobilitätsverschiebungssassay unter Verwendung einer STAT5-spezifischen Sonde bestimmt und anschließend durch Phosphorimager-Analyse quantifiziert. Die Ergebnisse sind als Prozentzahl der maximalen Aktivität ausgedrückt, die nach der Korrektur für den Hintergrund und die Proteinkonzentration erhalten wurde.

**[0047] Fig. 6B** Ist eine graphische Darstellung, dass Y421A  $\beta_c$  STAT5-L mit reduzierter Potenz als Antwort zur IL-3-Stimulation aktiviert. Die Experimente und die Prozeduren sind wie in **Fig. 6A**.

**[0048] Fig. 7** Ein Model der räumlichen Anordnung zwischen den putativen B'-C' und F'-G'-Schleifen von  $\beta_c$  und der ersten  $\alpha$ -Helix von GM-CSF, IL-3 oder IL-5 auf der Basis der GH-GHR-Kristallstruktur. Nur die membranannalen Domänen von  $\beta_c$  (CRM2) und die erste  $\alpha$ -Helix (Helix A) von GM-CSF, IL-3 oder IL-5 sind gezeigt, mit Tyr<sup>365</sup> und Tyr<sup>421</sup> von  $\beta_c$  und dem konservierten Glu von GM-CSF, IL-3 oder IL-5, die in der raumausfüllenden Darstellung gezeigt sind.

## DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER BEISPIELE

### BEISPIEL 1

#### Darstellung der Wirkung von Tyr<sup>421</sup> bei der $\beta_c$ -Untereinheitbindung

#### Grundprinzip für die Mutagenese von putativen Schleifen in der humanen $\beta$ -Kette

**[0049]** Die Region von  $\beta_c$ , die wir für die Mutagenese gewählt haben, wird durch Regionen flankiert, die eine Konservierung durch die Cytokin-Rezeptorsuperfamilie zeigt: der zuvor beschriebene VRXR-Konsensus (Patthy 1990), worin X am meisten vorkommend einen aliphatischen Rest darstellt und das WSXWS-Motiv (Cosman et al., 1990; Bazan 1990) (**Fig. 1**). Das WSXWS-Motiv ist bereits seit langem als charakteristisches Merkmal dieser Rezeptorfamilie erkannt, und verschiedene Studien sind auf das Verständnis seiner Rolle in der Rezeptorfunktion gerichtet worden (Miyazaki et al., 1991; Yoshimura et al., 1992; Quelle et al., 1992; Rozakis-Adcock and Kelly 1992; Baumgartner et al., 1994). Die GH-GHR-Kristallstruktur (De Vos et al., 1992) und seit kurzem die Kristallstruktur von GH, gebunden an den Prolactinrezeptor (Somers et al., 1994) geben uns etwas Einsicht in die Struktur der VRXR-WSXWS-Region in Cytokinrezeptoren im Allgemeinen. Die beiden be-

treffenden  $\beta$ -Stränge stehen miteinander in Wechselwirkung und bilden einen Stapel von aromatischen Seitenketten, die durch hydrophobe Bereiche der basischen Seitenketten unterbrochen werden, und in der Konsequenz bilden die Aminosäuren, die diese beiden Motive trennen, eine Schleife. Die Reste in dieser Schleife sind für ein Lösungsmittel in dem Liganden gebundenen Komplex in beiden gelösten Rezeptoren nicht zugänglich (De Vos et al., 1992; Somers et al., 1994). Wir haben daher unser Augenmerk hier auf den analogen F'-G'-Schleifenbereich in der Membran proximal zum Cytokinrezeptormodul (CRM) von  $\beta_c$  gerichtet, um seine Rolle bei der GM-CSF-, IL-3- und IL-5-Bindung zu bestimmen.

Identifikation einer Region, die bei der GM-CSF-, IL-3- und IL-5-Hochaffinitätsbindung beteiligt ist

**[0050]** Zur Untersuchung der möglichen Beteiligung der putativen F'-G'-Schleife von  $\beta_c$  bei der Hochaffinitäts-rezeptorkomplexbildung, wurde die Region durch Substitution von Alaninen über die Reste 418–422 (**Fig. 1**) unterbrochen. Die Fähigkeit dieser n-Alanin substituierten Mutante  $\beta_c$  (<sup>418</sup>AAAAA<sup>422</sup>), die Hochaffinitätsligandenbindung zu unterstützen, wurde durch Co-Expression dieser mit sowohl GM-CSFR- und IL-3R-  $\alpha$ -Ketten an COS-Zellen studiert, wobei Radioliganden-Sättigungsbindungsstudien durchgeführt wurden. COS-Zellen wurden routinemäßig mit  $\alpha$ -Ketten-cDNAs zusammen mit mutanter  $\beta_c$ -cDNA elektroporatisiert, so dass die gleiche Transfekte auf die GM-CSF- und IL-3-Bindung analysiert werden konnte. In Abwesenheit von transfiziertem  $\beta_c$ , haben GM-CSFR und die IL-3R-  $\alpha$ -Kette transfizierten COS-Zellen GM-CSF und IL-3 mit nur geringer Aktivität gebunden (Tabelle 2). Die Co-Expression von Wildtyp  $\beta_c$  verlieh GM-CSF eine hohe Affinitätsbindung, und IL-3 wie die  $\alpha$ -Ketten wurden im Überschuss von  $\beta_c$  exprimiert, die geringe Affinitätsbindung war immer noch evident, wie durch die Krummlinigkeit der Scatchard-Plots (**Fig. 2**, Tabelle 2) dargestellt ist. Die COS-Zellen, die mit dem mutanten Penta-Alanin  $\beta_c$  (<sup>418</sup>AAAAA<sup>422</sup>), GM-CSFR und IL-3R-  $\alpha$ -Kette transfiziert waren, zeigten eine Zelloberflächenexpression aller Rezeptorketten im Vergleich zu dem Wildtyp Transfektanten (Tabelle 2), sie zeigten allerdings keine hohe Affinitätsbindung von GM-CSF oder IL-3 (**Fig. 2**, Tabelle 2). Dieses zeigt, dass die Substitution der Region 418–422 in  $\beta_c$  die Fähigkeit von  $\beta_c$  beeinträchtigt, eine Hochaffinitäts-GM-CSF- und IL-3-Bindung zu unterstützen und legt nahe, dass die Reste in dieser Region bei der Ligandenwechselwirkung beteiligt sind.

Tyr<sup>421</sup> ist notwendig und ausreichend für die GM-CSF-, IL-3- und IL-5-Hochaffinitätsbindung

**[0051]** Zur Untersuchung des jeweiligen Beitrags der Reste 418–422 von  $\beta_c$  auf die Hochaffinitäts- GM-CSF-, IL-3- und IL-5-Bindung, wurde jeder Rest in dieser Region separat mit Alanin substituiert (**Fig. 1**). Wie oben wurde die Fähigkeit der einzelnen Mutante, eine Hochaffinitätsligandenbindung zu vermitteln, bestimmt, indem Radioligandensättigungsbindungsstudien bei COS-Zellen, die die Mutante  $\beta_c$  zusammen mit GM-CSFR und IL-3R  $\alpha$ -Ketten exprimieren, durchgeführt wurden. Die Ergebnisse zeigten, dass alle Alaninsubstitutionsmutanten ähnlich wie der Wildtyp  $\beta_c$  auf der Zelloberfläche exprimiert wurden (Tabelle 2), und die Alaninsubstitution der Reste Thr<sup>419</sup>, Glu<sup>420</sup> und Asn<sup>422</sup> hatte keinen Einfluss auf die Hochaffinitätsligandenbindung (**Fig. 3**, Tabelle 2). Die Alaninsubstitution von Arg<sup>418</sup> reduzierte die GM-CSF- und IL-3-Hochaffinitätsbindung um das 2–3-fache, was ein relativ kleiner Effekt ist (Tabelle 2). Interessanterweise erzeugte allerdings die Alaninsubstitution von Tyr<sup>421</sup> eine  $\beta_c$ -Mutante, die nicht in der Lage war, die Hochaffinitätsbindung von jeweils GM-CSF oder IL-3 zu unterstützen (**Fig. 2**, Tabelle 2). Der Effekt dieser Mutation auf die Hochaffinitäts-IL-5-Bindung wurde ebenfalls bestimmt, indem COS-Zellen mit der Mutante Y421A  $\beta_c$  zusammen mit der IL-5R- $\alpha$ -Kette transfiziert wurde. Die mit radioaktiv iodiertem IL-5 erhaltenen Sättigungsbindungsdaten zeigten eine einzige Klasse eines Rezeptors bei der Scatchard-Analyse. Obwohl  $\beta_c$  einen geringen Effekt auf die Affinitätsumwandlung der IL-5-Bindungsstelle relativ zu IL-3 und GM-CSF hat, zeigten Studien mit der Mutante Y421A  $\beta_c$  einen Verlust der Affinitätsgröße mit dem Verlust der Hochaffinitäts-IL-5-Bindung (Tabelle 2). Dieses zeigt, dass Tyr<sup>421</sup> eine ähnliche Rolle bei der Unterstützung der Hochaffinitätsbindung von GM-CSF, IL-3 und IL-5 aufweist.

**[0052]** Die Identifikation eines einzigen Restes in einer vorbestimmten Schleife der Membran proximal zu CRM von  $\beta_c$ , die für die Hochaffinitäts- GM-CSF-, IL-3- und IL-5-Bindung kritisch ist, hat die Möglichkeit eröffnet, dass dieser Rest allein im Zusammenhang einer Schleife ausreichend sein könnte, um die Hochaffinitätsbindung zu unterstützen. Um diese Feststellung zu testen, haben wir einen Tyrosinrest wieder in eine polyalansubstituierte  $\beta_c$ -Mutante (<sup>418</sup>AAAYA<sup>422</sup>) (**Fig. 1**) eingeführt. Überraschenderweise war diese Mutante in der Lage, die Hochaffinitäts-GM-CSF- und IL-3-Bindung (**Fig. 4**) zu unterstützen, obgleich mit einer dreifach reduzierten Affinität relativ zu Wildtyp GM-CSF- und IL-3-Hochaffinitätsbindung (Tabelle 2). Diese Mutante stellte ebenfalls die Hochaffinitätsbindung an IL-5 wieder her (Tabelle 2). Diese Feststellungen zeigen, dass die Reste neben Tyr<sup>421</sup>, keine direkte Rolle bei der Ligandenwechselwirkung spielen, und sie implizieren Tyr<sup>421</sup> als Schlüsselfeststellung bei der GM-CSF-, IL-3- und IL-5-Hochaffinitätsbindung.

Die Substitution von Tyr<sup>421</sup> unterbricht die funktionelle Rezeptoraktivierung

**[0053]** Zur Bestimmung der funktionellen Signifikanz der Substitution von Tyr<sup>421</sup> von  $\beta_c$  durch Alanin, haben wir die Induktion der Signalübertragung und die Transkriptionsaktivatoren (STAT) gemessen. Die produktive Wechselwirkung von GM-CSF, IL-3 und IL-5 mit ihren Hochaffinitätsrezeptoren führt zu einer von  $\beta_c$  vermittelten Signalübertragung (Kitamura et al., 1991b; Kitamura et al., 1992; Takaki et al., 1993). Es ist nun gut dokumentiert, dass die Signalgebung durch  $\beta_c$  die JAK2-Protein-Tyrosinkinase (Silvennoinen et al., 1993; Quelle et al., 1994) aktiviert, und anschließend der Transkriptionsfaktor STAT5 schnell phosphoryliert wird, was diesen in die Lage versetzt, an seine DNA-Bindungsstelle im Kern zu binden (Mui et al., 1995; Azam et al., 1995; Gouilleux et al., 1995; Pallard et al., 1995). Die STAT5-Aktivierung stellt daher eine relativ sofortige Antwort auf die  $\beta_c$  vermittelte Rezeptorsignalgebung dar. STAT5 ist in vielen hämopoietischen Zelllinien, einschließlich Zellen von myeloider und lymphoider Abstammungen beschrieben worden (Mui et al., 1995; Azam et al., 1995; Gouilleux et al., 1995; Pallard et al., 1995). In vorläufigen Experimenten haben wir Jurkat-T-Zellen, die mit GM-CSFR-, IL-3R- oder IL-5R-Rezeptor- $\alpha$ -Ketten zusammen mit Wildtyp  $\beta_c$  transfiziert sind, untersucht. Ein Cytokin induzierbares nukleares DNA-Bindungsprotein wurde nachgewiesen, das eine Oligonucleotidsonde, die die STAT5-Bindungskonsensussequenz (TTC-N<sub>3</sub>-GAA) enthält, in einem elektrophoretischen Mobilitätsverschiebungssassay verzögerte.

**[0054]** Dieses DNA-Bindungsprotein war nach der Cytokinbehandlung in den Zellen, die mit der  $\alpha$ -Kette und  $\beta_c$  transfiziert waren, induzierbar, allerdings nicht in Abwesenheit von  $\beta_c$ , was anzeigt, dass  $\beta_c$  diesen liganden-induzierten Prozess vermittelt (**Fig. 5A**). Die nicht markierte Sonde wie auch das verwandte Hämopoietinrezeptorantwortelement (HRRE) (Morella et al., 1995) konkurrierten um die Bindung an die radioaktiv markierte  $\beta$ -Casein-Promotorsonde, wobei beide die STAT5-Bindungskonsensussequenz enthalten. Allerdings konkurrierten eine  $\beta$ -Casein-Promotermutanten-sonde, die Mutationen im STAT5-Bindungskonsensus und eine kanonische Sonde der AP-1-Stelle enthielt, nicht um die Bindung (**Fig. 5B**). Aus diesem Grund bezeichnen wir dieses Protein als STAT5-ähnlich (STAT5-L), weil, obwohl sie sich in ähnlicher Weise wie es STAT5 verhält, seine wahre Identität noch nicht bestimmt worden ist.

**[0055]** Die Fähigkeit von mutanten Rezeptoren, das STAT5-L-Protein zu aktivieren, wurde bestimmt, indem Jurkat-Zellen mit der Mutante  $\beta_c$ - und die GM-CSFR- oder IL-3R- $\alpha$ -Kette cDNAs cotransfiziert wurden. Die Zelloberflächenexpression von Rezeptoruntereinheiten wurde durch Fliesscytometrie unter Verwendung von ketenspezifischen Antikörpern bestätigt, und es ist festgestellt worden, dass die Expression von Mutanten- und Wildtyp  $\beta_c$  vergleichbar war (Daten nicht gezeigt). Die Transfektanten wurden mit entweder GM-CSF oder IL-3 über einen Konzentrationsbereich stimuliert, und es wurden nukleare Extrakte hergestellt. Die Induktion des STAT5-L-Proteins wurde mit einem elektrophoretischen Mobilitätsverschiebungssassay (EMSA) unter Verwendung der kanonischen STAT5-DNA-Bindungsstelle vom  $\beta$ -Caseinpromotor als Sonde bestimmt.

**[0056]** STAT5-L wurde in Reaktion auf entweder GM-CSF oder IL-3 in dosisabhängiger Weise in Gegenwart der geeigneten  $\alpha$ -Kette und des Wildtyp  $\beta_c$  aktiviert (**Fig. 6A & B**). Die Alaninsubstitution von Tyr<sup>421</sup> produzierte ein  $\beta_c$ , das die STAT5-L-Aktivierung als Reaktion auf GM-CSF mit einer etwa 100–1000-fachen Reduktion der Potenz unterstützte (**Fig. 6A**). Diese Reduktion der GM-CSF-Antwort mit dieser Mutanten- $\beta_c$  zeigt, dass Tyr<sup>421</sup> eine Rolle bei der GM-CSF induzierten Rezeptoraktivierung aufweist. Signifikanterweise hatte Y421A  $\beta_c$  einen größeren Effekt auf die IL-3-induzierte STAT5-L-Aktivierung, die nur geringe Gehalte von nachweisbarem STAT5-L (**Fig. 6B**) produzierte, und selbst bei 3  $\mu$ M IL-3 wurde eine halbe maximale Aktivierung nicht erreicht. Dieses liegt nahe, dass der Tyrosinwert ebenfalls für die Wechselwirkung von IL-3 mit  $\beta_c$  kritisch ist.

## BEISPIEL 2

## Herstellung von Antikörperantagonisten

**[0057]** Monoklonale Antikörper können hergestellt werden, indem mit  $\beta_c$  oder mit einem Fragment von  $\beta_c$ , das die F'-G'-Schleife enthält, oder mit einem Peptid, das die F'-G'-Sequenz enthält, immunisiert wird. Nach Spezifitätskontrollen, die die spezifische Bindung an die F'-G'-Schleife zeigen, können die Antikörper für die Blockierung der GM-CSF-, IL-3- und IL-5-Hochaffinitätsbindung und für die Blockierung der GM-CSF-, IL-3- und IL-5-Funktionsstimulation gewählt werden. Wenn einmal ein geeigneter monoklonaler Antikörper identifiziert worden ist, der die GM-CSF-, IL-3- und IL-5-Hochaffinitätsbindung und -funktion blockiert, können kleinere Fragmente hergestellt werden, z. B. F(ab)<sub>2</sub>, Fab und schließlich Fv. Unter Anwendung von Techniken der Molekularbiologie kann eine einzelne Kette des Fv-Fragments konstruiert werden (Hv-Lv). Das wäre ein Inhibitionspeptid.

## BEISPIEL 3

## Herstellung von Peptidantagonisten

**[0058]** Kurze Peptide mit ähnlichen Sequenzen zur F'-G'-Schleife können synthetisiert werden, die die Cytokinwechselwirkung mit der F'-G'-Schleife von  $\beta_c$  blockieren. Das Umgekehrte ist ebenfalls möglich: kurze Peptide mit ähnlichen Sequenzen zur Helix A von GM-CSF/IL-3/IL-5 (dieses ist die Region in den Cytokinen, die mit der F'-G'-Schleife wechselwirken soll) können ebenfalls die Cytokinwechselwirkung blockieren.

## BEISPIEL 4

## Herstellung von Oligonucleotidantagonisten

**[0059]** Ein großer Pool von wahllos synthetisierten Oligonucleotiden kann durch ein F'-G'-Peptid, das auf einer festen Matrix (Bock et al., 1992, – diese Referenz ist hiermit eingeschlossen) immobilisiert ist, gegeben werden. Nach dem Waschen verbleiben die starkbindenden Oligonucleotide, die dann bei verschiedenen Bedingungen (Salz, pH, etc.) eluiert werden können. Die Sequenz kann dann durch PCR bestimmt werden und auf ihre Inhibition der  $\beta_c$  vermittelten Funktion auf einem realen Zellsystem getestet werden.

## BEISPIEL 5

Ausrichtung von Aminosäuren der F'-G'-Schleife von  $\beta_c$  und gp130

**[0060]** Die Ausrichtung von  $\beta_c$  und gp130 ist publiziert worden. Gp130 und  $\beta_c$  enthalten Domänen, die mit der Fibronectindomäne vom Typ III, die ein charakteristisches Merkmal der meisten Cytokinenrezeptoren ist, verwandt sind. Gp130 hat 6 dieser Domänen,  $\beta_c$  hat 4 dieser Domänen.

**[0061]** Jede Domäne enthält eine eigene F-G-Schleife, somit hat gp130 6 und  $\beta_c$  hat 4. Nur eine dieser F-G-Schleifen ist die wichtige, soweit die vorliegende Erfindung betroffen ist. Die wichtige Domäne ist durch die Gegenwart von i) einem konservierten Muster von Cys-Resten, ii) verschiedenen Trp-Resten, iii) einem YXXRV/IR Motiv und iv) einem WSXWS Motiv (wo X eine Aminosäure ist) charakterisiert. Es ist postuliert, dass Tyr<sup>421</sup> innerhalb der F-G-Schleife der vierten Domänschleife in  $\beta_c$  (F'-G') liegt. Es ist postuliert, dass das äquivalente funktionell wichtige Tyr in gp130 innerhalb der F-G-Schleife der zweiten Domäne liegt.

Tabelle 2

Affinitätskonstanten und statistische Analyse der Bindung von GM-CSF, IL-3 und IL-5 an COS-Zellen, die mit geeigneten  $\alpha$ -Ketten und Wildtyp- oder Mutanten  $\beta_c$  transfiziert sind

LIGANDEN									
COS-Zellen, die exprimieren: nur die $\alpha$ -Ketten <sup>a</sup>				GM-CSF			IL-3		
				$K_d = 2-12$ nMol			$K_d = 20 - 100$ nMol		
Nr. der Exp.	% FACS + ve-Zellen	Nr. der nach- gewiesenen Stellen		$K_d$ -Stelle 1 (pM $\pm$ SE)	$K_d$ -Stelle 2 (nM $\pm$ SE)	Nr. der nach- gewiesenen Stellen		$K_d$ -Stelle 1 (pM $\pm$ SE)	Nr. der Exp. Stelle 1 (pM $\pm$ SE)
+ Wildtyp $\beta_c$	10	22,8 <sup>b</sup>		95 $\pm$ 17 <sup>d</sup>	5,7 $\pm$ 1,7	2P<0,001 <sup>c</sup>	2P<0,001	141 $\pm$ 32 <sup>e</sup>	1
+ <sup>415</sup> AAAAA <sup>422</sup>	4	34,2		- <sup>g</sup>	2,9 $\pm$ 0,2	1	1	-	ND <sup>h</sup>
+R418A	2	47,4		223 $\pm$ 74	7,0 $\pm$ 0,6	2P<0,001	2P<0,001	511 $\pm$ 156	ND
+T419A	2	39,1		105 $\pm$ 13	13,5 $\pm$ 8,0	2P<0,001	2P<0,001	151 $\pm$ 55	ND
+G420A	2	39,8		142 $\pm$ 34	35,2 $\pm$ 9,8	2P<0,001	2 P 0,001	196 $\pm$ 70	ND
+Y421A	6	34,2		-	2,7 $\pm$ 0,3	1	1	-	2
+N422A	2	29,0		61 $\pm$ 64	7,8 $\pm$ 1,0	2P<0,001	2P<0,001	80 $\pm$ 53	ND
+ <sup>415</sup> AAAAA <sup>422</sup>	3	34,5		295 $\pm$ 99	10,4 $\pm$ 1,3	2P<0,001	2P<0,001	113 $\pm$ 38	2
									710 $\pm$ 132

<sup>a</sup> beobachteter Bereich von Affinitäten für die Ligandenbindung nur an die Rezeptor- $\alpha$ -Kette.

<sup>b</sup> Transfizierte COS-Zellen, die positiv (+ve) für die  $\beta_c$ -Expression sind, gemessen mit einem Fluoreszenz-aktivierten Zellsortiergerät (FACS) unter Verwendung eines Cocktails aus neun anti- $\beta_c$ -monoklonalen Antikörpern.

<sup>c</sup> Konfidenzgehalte, ausgedrückt als P-Werte für eine Übereinstimmung einer Stelle gegenüber einer Übereinstimmung von zwei Stellen. Wo kein Konfidenzgehalt angegeben ist, konnten zwei Stellen nicht übereinstimmend angeordnet werden.

<sup>d</sup> Bindungsdaten aus separaten Experimenten (Exp.) mit GM-CSF wurden coanalysiert, und die Affinitätskonstanten sind als  $\pm$  als Standardirrtum (SE) gezeigt (Munson und Rodbard, 1980).

<sup>e</sup> Analyse von Daten wurde wie oben durchgeführt mit der Ausnahme, dass, unter Annahme einer extrem niedrigen Affinität der IL-3-Bindung an die IL-3-R- $\alpha$ -Kette, ein konstanter Wert von 50 nMol verwendet wurde, um eine Schätzung der Hochaffinitätsstellen ( $K_d$  Stelle 1) zu ermöglichen.

<sup>f</sup> Analyse von Daten wurde wie oben durchgeführt. Eine einzige Rezeptorklasse wurde mit IL-5 nachgewiesen.

<sup>g</sup> Es wurden keine Hochaffinitätsbindungsstellen nachgewiesen.

<sup>h</sup> ND: nicht durchgeführt.

Tabelle 3 Ausrichtung der putativen F'-G'-Schleifen von Mitgliedern der Cytokinrezeptorsuperfamilie

CONSENSUS-V R X R

W S X W S

## Gemeinsame Rezeptoruntereinheiten

hβc	V R V R	TSRTGY <u>NGI</u> (SEQ ID No. 1)	W S E W S
hLIFR	F R I R	CSTET <u>FWK</u> (SEQ ID No. 2)	W S K W S
gp130 (CRM1)	F R I R	CMKEDGKGY (SEQ ID No. 3)	W S P W S
hIL-2Rβ	V R V K	PLQGE <u>FTT</u> (SEQ ID No. 4)	W S P W S
hIL-4R/hIL-13R	V R V R V	KTNKLC <u>FDDNKL</u> (SEQ ID No. 5)	W S D W S
hIL-2Rγ	V R S R	ENPLCGSAQH (SEQ ID No. 12)	W S E W S

## Liganden-spezifische Rezeptoruntereinheiten

hIL-3Rα	V Q I R	ERVY <u>EE</u> (SEQ ID No. 6)	W S A W S
GM-CSFRα	V K I R	AADVRI <u>LN</u> (SEQ ID No. 7)	W S E W S
hIL-5Rα	V Q V R	AAVSSMCREAGL (SEQ ID No. 8)	W S E W S

## Liganden-spezifische Signalrezeptoren

hEPOR	V R A R	MAEPSE <u>GGE</u> (SEQ ID No. 9)	W S A W S
hTPOR (CRM2)	L R A R	LNGPT <u>YQGP</u> (SEQ ID No. 10)	W S S W S
hOBR	V Q V R	CKRLDGL <u>GY</u> (SEQ ID No. 11)	W S N W S

**[0062]** Die aromatischen hydrophoben Reste sind unterstrichen.

Ackerman et al., (1994) Chest, 105; 687

Adachi et al., (1995) Am J Respir Crit Care Med., 151, 618

Akir et al (1993) Adv Immunol 54, 1-78.

Azam, M. et al. (1995) EMBO J., 14, 1402-1411.

Bagley, C. J., et al. (1995) J. Leuk. Biol., 57, 739-746.

Barry, S. C., et al (1994) J. Biol. Chem., 269, 8488-8492.

Bass, S. H. et al (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 4498-4502.

Baumgartner, J. W. et al (1994) J. Biol. Chem., 269, 29094-29101.

Bazan, J. F. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 6934-6938.

Bentley et al., (1996) Am J Respir Crit Care Med 153, 551

Bock et al., (1992) Nature 355, 564-566

Boutin, J. M., et al (1988) Cell, 53, 69-77.

Broide et al (1992) J Clin Invest, 90, 1414

Clackson, T and Wells, J. A. (1995) Science, 267, 383-386.

Clayberger et al (1991), J Exp Med 175, 371

Contreras, M. A. et al (1983) Methods Enzymol., 92, 277-292.

Cosman, D. et al (1990) Trends Biochem. Sci., 17, 265-270.

Cunningham, B. C. et al (1991) Science, 254, 821-825.

Davis, S. et al (1993) Science, 260, 1805-1810.

De Vos, A. et al (1992) Science, 255, 306-312.

- Elliott MJ, et al (1989) *Blood* 74, 2349–2359.
- Foster et al (1996) *J Exp Med* 183, 195
- Fukuda et al., (1994) *J Allergy Clin Immunol.* 94, 584
- Gearing, D. P. et al (1991) *EMBO J.*, 10, 2839–2848.
- Gearing, D. P. et al (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 1119–1123.
- Giri, J. G. et al (1994) *EMBO J.*, 13, 2822–2830.
- Goodall, G. J. et al (1993) *Growth Factors*, 8, 87–97.
- Goodwin, R. G. et al (1990) *Cell*, 60, 941–951.
- Gouilleux, F., et al (1995) *EMBO J.*, 14, 2005–2013.
- Groopman JE, et al (1987) *New Engl J Med*, 317, 593–598.
- Hamid et al., (1991) *J Clin Invest*, 87, 1541
- Hatakeyama, M. et al (1989) *Science*, 244, 551–556.
- Hayashida, K. et al (1990) *Proc. Natl. Acad. USA*, 87, 9655–9659.
- Hercus, T. R. et al (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 5838–5842.
- Hibi, M. et al (1990) *Cell*, 63, 1149–1157.
- Hilton, D. J. et al (1994) *EMBO J.*, 13, 4765–4775.
- Hilton, D. J. et al (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 497–501.
- Idzerda, R. L. et al (1990) *J. Exp. Med.*, 171, 861–873.
- Ip, N. Y. et al (1992) *Cell*, 69, 1121–1132.
- Kato M, et al (1992) *Lymphokine Cytokine Res* 11, 287–292.
- Kay AB et al (1991) *J Exp Med* 173, 775–778.
- Kimura, Y. et al (1995) *Int. Immunol*, 7, 115–120.
- Kitamura, T. et al (1991a) *Cell*, 66, 1165–1174.
- Kitamura, T. et al. (1991b) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 5082–5086.
- Kitamura, T. and Miyajima, A. (1992) *Blood*, 80, 84–90.
- Leung, D. W. et al (1987) *Nature*, 330, 537–543.
- Liu, J. et al (1992) *J Biol. Chem.*, 267, 16763–16766.
- Lock, P. et al (1994) *Proc. Natl. Acan. Sci. USA*, 91, 252–256.
- Lopez AF et al (1989). *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 7022–7026.
- Lopez et al (1990) *J Cell Physiol*, 145, 69–77
- Lopez AF et al (1991) *J Biol Chem* 266, 24741–24747.
- Lopez AF et al (1992) *Immunol Today* 13, 495–500.
- Lopez, A. F. et al *EMBO J.*, 11, 909–916.
- Marini et al., (1992), *Chest* 102, 661
- Mauser et al., (1993) *Am Rev Respir Dis*, 148, 1623
- Mauser et al (1995) *Am J Respir Crit Care Med* 152, 467
- Miyajima, Mol Cell Biol. (1992) *Trends Biochem Sci* 17, 38–382
- Miyazaki, M. et al (1991) *EMBO J.*, 10, 3191–3197.
- Morella, K. K. et al (1995) *J. Biol. Chem.*, 270, 8298–8310.
- Mui, A. L.–F. et al (1995) *EMBO J.*, 14, 1166–1175.
- Munson, P. J. and Rodbard. D. (1980) *Anal. Biochem.*, 107, 220–239.
- Nakamura. Y. et al. (1992) *Science*, 257, 1138–1141.
- Noguchi, M. et al (1993) *Science*, 262, 1877–1880.
- Pallard, C. et al (1995) *J. Biol. Chem.*, 270, 15942–15945.
- Park LS, et al (1989) *Blood*, 74, 56–65.
- Patthy, L. (1990) *Cell*, 61, 13–14.
- Pennica, D. et al (1995) *J. Biol. Chem.*, 270, 10915–10922.
- Quelle, D. E. et al (1992) *Mol. Cell. Biol.*, 12, 4553–4561.
- Quelle, F. W. et al (1994) *Mol. Cell Biol.*, 14, 4335–4341.
- Robinson et al., (1992) *N Engl J Med* 326, 298
- Rozakis-Adcock, M. and Kelly, P. A. (1992) *J. Biol. Chem.*, 267, 7428–7433.
- Russell, S. M. et al (1993) *Science*, 262, 1880–1883.
- Shanafelt, A. B. and Kastelein, R. A. (1992) *J. Biol. Chem.*, 267, 25466–25472.
- Silvennoinen, O. et al (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 8429–8433.
- Somers, W. et al (1994) *Nature*, 372, 478–481.
- Sur et al., (1995) *J Allergy Clin Immunol*, 96, 661
- Sur et al., (1996) *J Allergy Clin Immunol*, 97, 1272
- Taga, T. et al (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 10998–11001.
- Takaki, S. et al (1993) *J. Exp. Med.*, 177, 1523–1529.
- Takeshita, T. et al (1992) *Science*, 257, 379–382.

- Tartaglia et al., (1995) Cell 83, 1263–1271  
Tavernier, J. et al (1991) Cell, 66, 1175–1184.  
Vigon, I. et al (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 5640–5644.  
Williamson DJ et al (1988) Clin Exp Immunol 72, 67–73.  
Woodcock, J. M. et al (1994) EMBO J., 13, 5176–5185.  
Xing et al., (1996) J Clin Invest 97, 1102–1110  
Yamasaki, K. et al (1988) Science, 241, 825–828.  
Yawata, H. et al (1993) EMBO J., 12, 1705–1712. Yoshimura, A. et al (1992) J. Biol. Chem., 267, 11619–11625.  
Young DC, Griffin JD. (1986) Blood 68, 1178–1181.  
Zangrilli et al., (1995) Am. J Respir Crit Care Med 151, 1346  
Zurawski, S. M. et al (1993) EMBO J, 12, 2663–2670.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) Allgemeine Information

(iii) Zahl der Sequenzen

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR. 1

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) Länge: 9 Aminosäurereste

(B) Typ: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) Molkeültyp: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:1;

Thr	Ser	Arg	Thr	Gly	Tyr	Asn	Gly	Ile
1				5				

(3) INFORMATION FÜR SEQ ID NR. 2

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(C) Länge: 8 Aminosäurereste

(D) Typ: Aminosäure

(E) TOPOLOGIE: linear

(ii) Molekültyp: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:2;

Cys	Ser	Thr	Glu	Thr	Phe	Trp	Lys
1				5			

(4) INFORMATION FÜR SEQ ID NR. 3

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) Länge: 9 Aminosäurereste

(B) Typ: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) Molekültyp: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:3;

Cys	Met	Lys	Glu	Asp	Gly	Lys	Gly	Tyr
1				5				

(5) INFORMATION FÜR SEQ ID NR. 4

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) Länge: 8 Aminosäurereste

(B) Typ: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) Molekültyp: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:4;

Pro	Leu	Gln	Gly	Glu	Phe	Thr	Thr
1				5			

(6) INFORMATION FÜR SEQ ID NR. 5

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) Länge: 13 Aminosäurereste

(B) Typ: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) Molekültyp: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:5;

Val	Lys	Thr	Asn	Lys	Leu	Cys	Phe	Asp	Asp	Asn	Lys	Leu
1				5					10			

(7) INFORMATION FÜR SEQ ID NR. 6

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) Länge: 6 Aminosäurereste

(B) Typ: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) Molekültyp: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:6;

Glu	Arg	Val	Tyr	Glu	Phe
1				5	

(8) INFORMATION FÜR SEQ ID NR. 7

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) Länge: 8 Aminosäurereste

(B) Typ: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) Molekültyp: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:7;

Ala	Ala	Asp	Val	Arg	ILe	Leu	Asn
1				5			

(9) INFORMATION FÜR SEQ ID NR. 8

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) Länge: 12 Aminosäurereste

(B) Typ: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) Molekültyp: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:8;

Ala	Ala	Val	Ser	Ser	Met	Cys	Arg	Glu	Ala	Gly	Leu
1				5					10		

(10) INFORMATION FÜR SEQ ID NR. 9

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) Länge: 9 Aminosäurereste

(B) Typ: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) Molekültyp: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:9;

Met	Ala	Glu	Pro	Ser	Phe	Gly	Gly	Phe
1				5				

(11) INFORMATION FÜR SEQ ID NR. 10

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) Länge: Aminosäurereste

(B) Typ: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) Molekültyp: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:10;

Leu	Asn	Gly	Pro	Thr	Tyr	Gln	Gly	Pro
1				5				

(12) INFORMATION FÜR SEQ ID NR. 11

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) Länge: 9 Aminosäurereste

(B) Typ: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) Molekültyp: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:11;

Cys	Lys	Arg	Leu	Asp	Gly	Leu	Gly	Tyr
1				5				

(13) INFORMATION FÜR SEQ ID NR. 12

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) Länge: 10 Aminosäurereste

(B) Typ: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) Molekültyp: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:12;

Phe	Asn	Pro	Leu	Cys	Gly	Ser	Ala	Gln	His
1				5					10

### Patentansprüche

1. Verfahren zur Isolierung eines Mittels, das an die F'-G'-Schleife der Domäne 4 der allgemeinen  $\beta_c$ -Kette des Rezeptors für GM-CSF, IL-3 und IL-5 oder an eine analoge Schleife eines anderen Cytokin-Rezeptors binden kann, wobei die F'-G'-Schleife durch SEQ ID Nr. 1 definiert ist und die analoge Schleife derart definiert ist, dass sie sich zwischen den flankierenden Konsensussequenzen V/F/L-R/K/Q-X-R/K/Q und WSXWS befindet, diese allerdings nicht einschließt, die Bindung des Mittels an die F'-G'-Schleife oder eine analoge Schleife einen Antagonisten- oder Agonisteneffekt auf die hohe Affinitätsbindung eines jeweiligen Cytokins aufweist, wobei dieses Verfahren die Schritte aufweist, bei denen die Kandidatenmoleküle auf ihre Fähigkeit geprüft werden, an die Schleife selektiv zu binden, wobei bei dem Überprüfungsschritt die Kandidatenmittel mit der F'-G'-Schleife oder der analogen Schleife in Kontakt gebracht werden und diejenigen Kandidaten, die an die Schleife binden, isoliert werden.

2. Verfahren zur Isolierung eines therapeutischen Mittels nach Anspruch 1, worin die Stufe der Überprüfung der Kandidatenmoleküle auf ihre Fähigkeit, an diese Schleife zu binden, die Überprüfung auf die Fähigkeit, an eine Sequenz zu binden, die aus der Gruppe gewählt ist, die SEQ ID NR. 1, SEQ ID NR. 2, SEQ ID NR. 3, SEQ ID NR. 4, SEQ ID NR. 5, SEQ ID NR. 6, SEQ ID NR. 7, SEQ ID NR. 8, SEQ ID NR. 9, SEQ ID NR. 10, SEQ ID NR. 11 und SEQ ID NR. 12 umfasst, umfasst.

3. Verfahren zur Isolierung eines therapeutischen Mittels nach Anspruch 1, worin die Stufe der Überprüfung der Kandidatenmoleküle auf ihre Fähigkeit, an diese Schleife zu binden, die Überprüfung auf die Fähigkeit, an eine Sequenz zu binden, die aus der Gruppe gewählt ist, die SEQ ID NR. 1, SEQ ID NR. 2, SEQ ID NR. 3, SEQ ID NR. 4, SEQ ID NR. 5 und SEQ ID NR. 12 umfasst, umfasst.

4. Verfahren zur Isolierung eines therapeutischen Mittels nach Anspruch 1, wobei die Stufe der Überprüfung der Kandidatenmoleküle auf ihre Fähigkeit, an diese Schleife zu binden, die Überprüfung auf die Fähigkeit, an eine Sequenz zu binden, die aus der Gruppe gewählt ist, die aus SEQ ID NR. 6, SEQ ID NR. 7 und SEQ ID NR. 8 umfasst, umfasst.

5. Verfahren zur Isolierung eines therapeutischen Mittels nach Anspruch 1, worin die Stufe der Überprüfung der Kandidatenmoleküle auf ihre Fähigkeit, an diese Schleife zu binden, die Überprüfung auf die Fähigkeit, an eine Sequenz zu binden, die aus der Gruppe gewählt ist, die SEQ ID NR. 9, SEQ ID NR. 10 und SEQ ID NR. 11 umfasst, umfasst.

6. Verfahren zur Isolierung eines therapeutischen Mittels nach Anspruch 1, worin die Stufe der Überprüfung der Kandidatenmoleküle auf ihre Fähigkeit, an diese Schleife zu binden, die Überprüfung auf die Fähigkeit, an eine Sequenz SEQ ID NR. 1 zu binden, umfasst, umfasst.

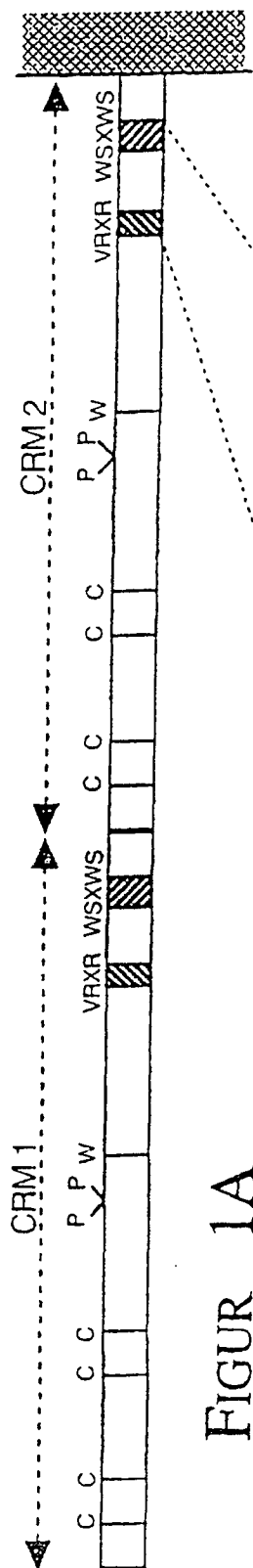
7. Verfahren zur Isolierung eines therapeutischen Mittels nach Anspruch 1, worin das Mittel ein Antikörper oder ein Fragment davon ist, wobei das Verfahren weiterhin die Stufe aufweist, ein Tier mit einem Peptidmolekül mit der F'-G'-Schleife zu impfen, die Antikörper produzierenden Zellen mit einer Myelomzelllinie zu fusionieren und auf eine Zelllinie, die einen Antikörper, der mit dieser F'-G'-Schleife, aber nicht mit dem WSXWS-Motiv reaktiv ist, produziert, zu überprüfen und die Antikörper aus dieser Zelllinie zu ernten, um auf die Inhibierung der hohen Affinitätsbindung zu testen und auf die Inhibierung oder Anregung der Funktion zu testen.

8. Verfahren zur Isolierung eines therapeutischen Mittels nach Anspruch 7, wobei das Verfahren weiterhin die Herstellung kleiner Antikörperfragmente, die durch die Zelllinie, die an die Schleife binden kann, produziert werden, einschließt.

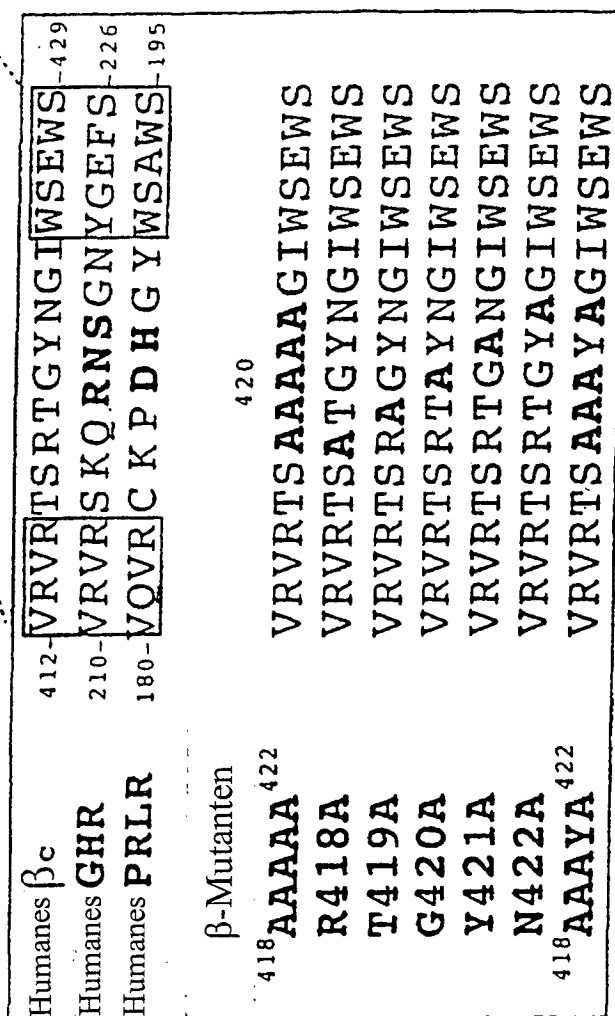
9. Verfahren zur Isolierung eines therapeutischen Mittels nach Anspruch 7, worin die Zelllinie eine

Maus-Zelllinie ist und das Verfahren weiterhin den Schritt umfasst, bei dem die Antikörperfragmente durch Ersetzen der Maussequenzen durch humane Sequenzen in den nicht bindenden Bereichen humanisiert werden.

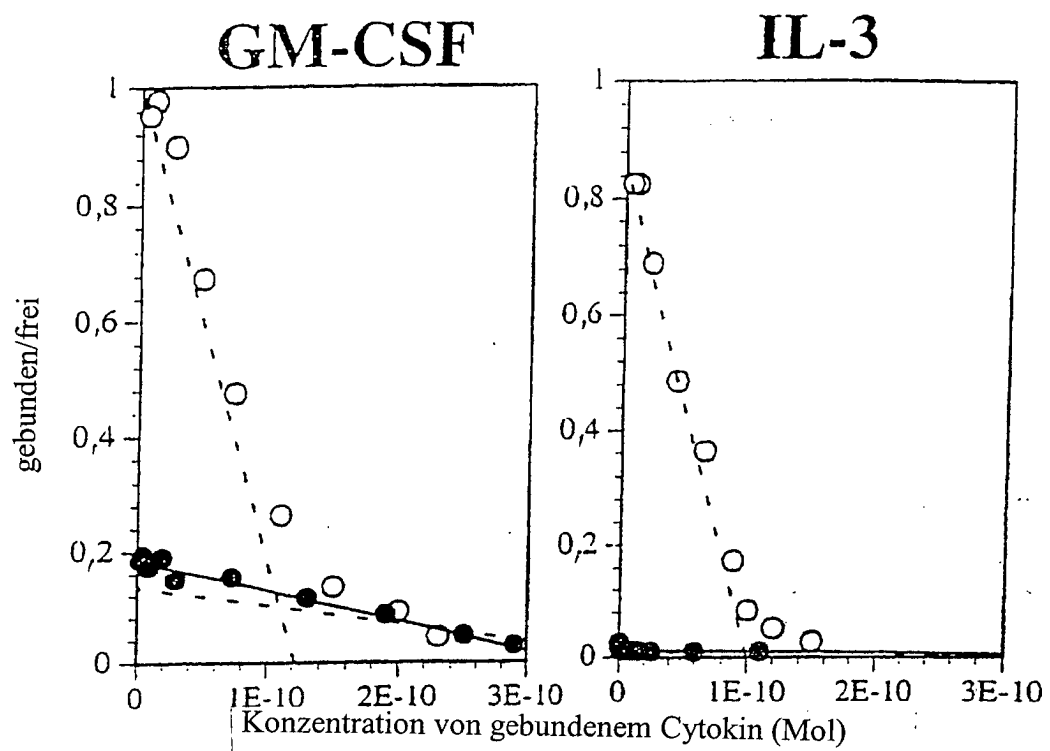
Es folgen 7 Blatt Zeichnungen



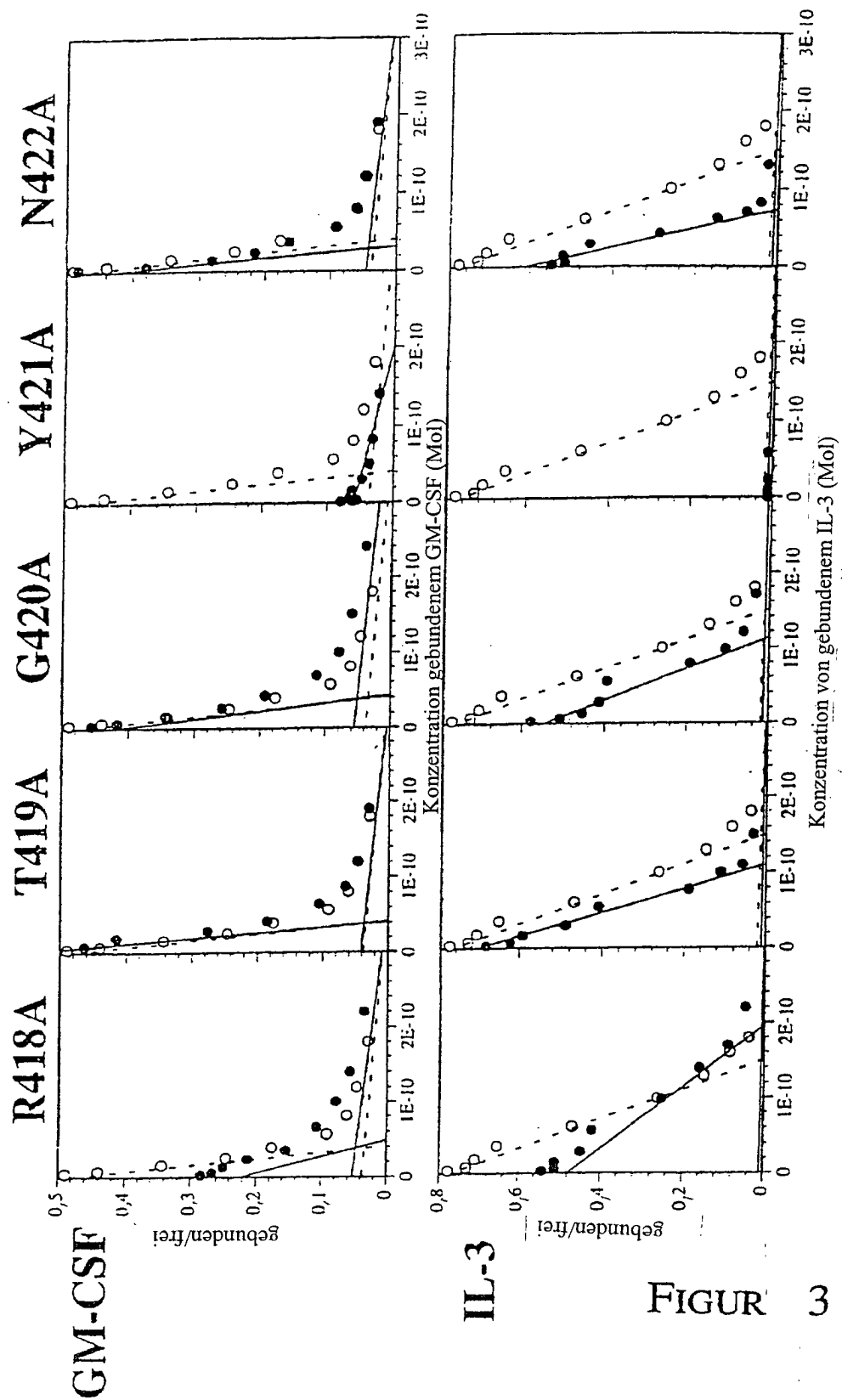
FIGUR 1A



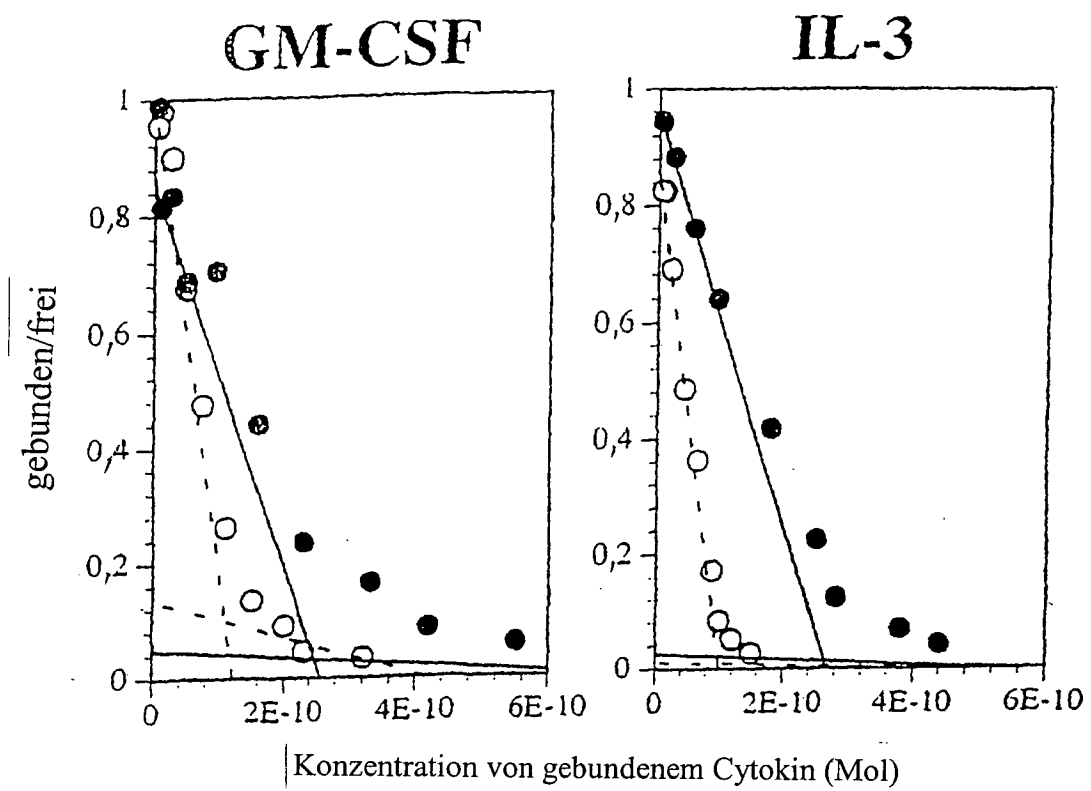
FIGUR 1B



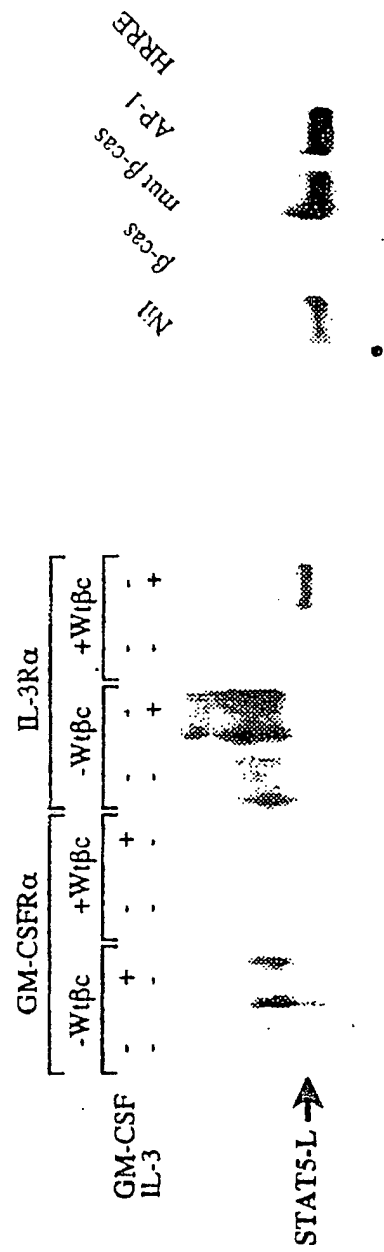
FIGUR 2



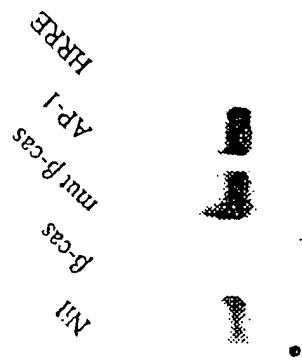
FIGUR 3



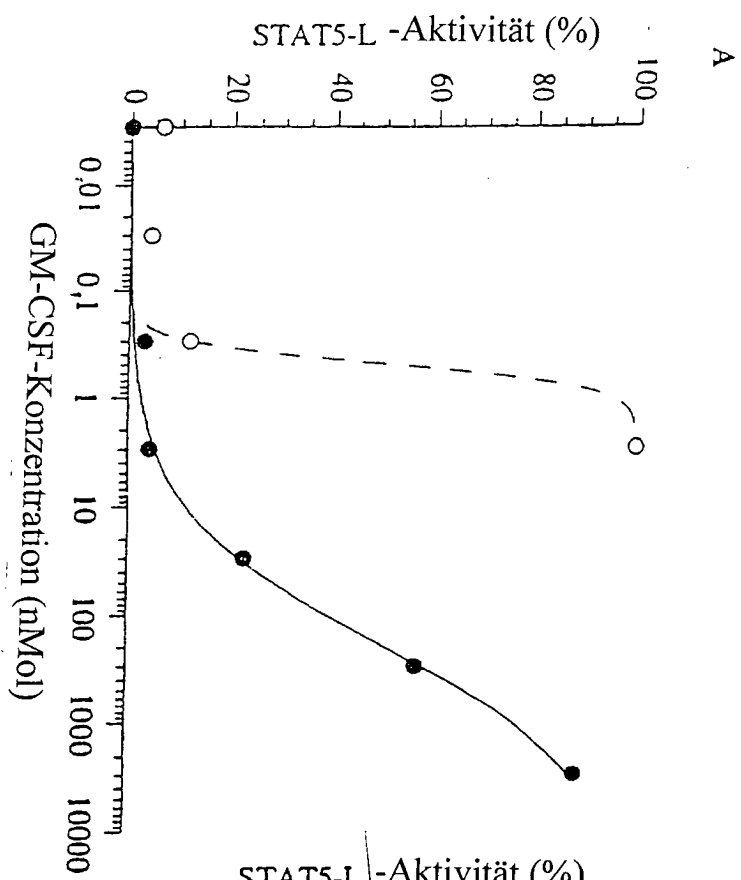
FIGUR 4



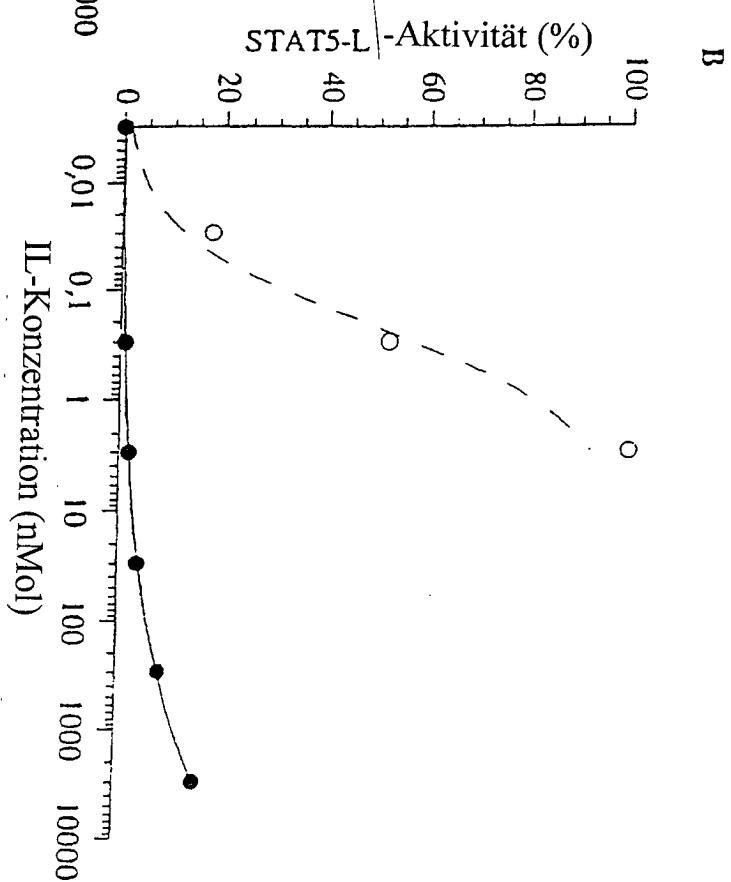
FIGUR 5A



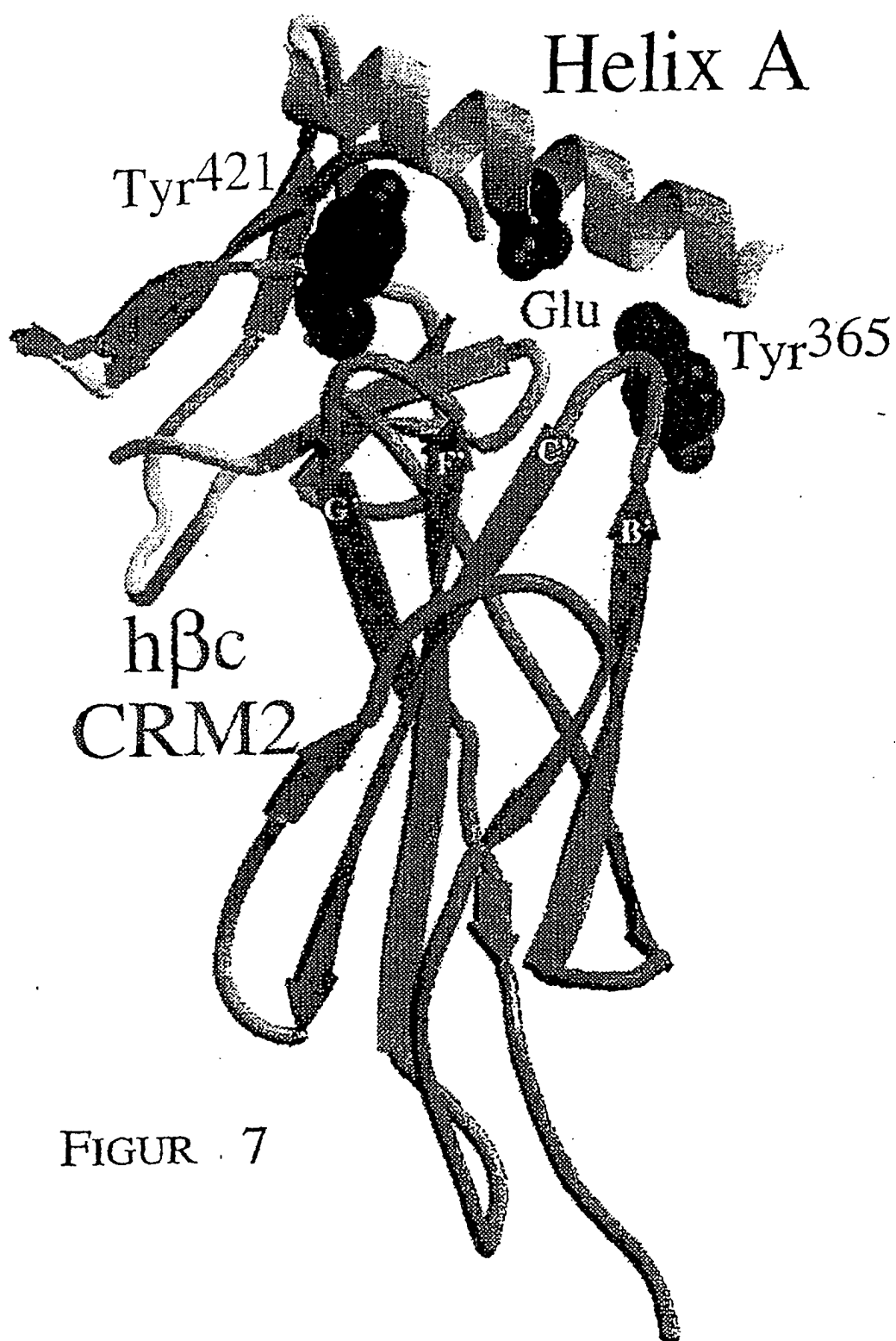
FIGUR 5B



FIGUR 6A



FIGUR 6B



FIGUR . 7