



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 699 22 269 T2** 2005.12.01

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 229 047 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 22 269.9**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **02 007 831.7**

(96) Europäischer Anmeldetag: **22.09.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **07.08.2002**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **24.11.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **01.12.2005**

(51) Int Cl.⁷: **C12N 15/62**

C07K 14/715, C12N 15/12

(30) Unionspriorität:

101858 P	25.09.1998	US
313942	19.05.1999	US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(73) Patentinhaber:

Regeneron Pharmaceuticals, Inc., Tarrytown, N.Y., US

(72) Erfinder:

Yancopoulos, George D., Yorktown Heights, New York 10598, US; Stahl, Neil, Carmel, New York, US

(74) Vertreter:

Rechts- und Patentanwälte Lorenz Seidler Gossel, 80538 München

(54) Bezeichnung: **IL-1 Rezeptor Fusionsproteine verwendet als Antagoniste und Verfahren zu deren Verwendung und Herstellung**

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**FACHGEBIET DER ERFINDUNG**

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft IL-1-Rezeptor-Fusionsproteine, die als Antagonisten von IL-1 Verwendung finden.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] In WO93/19777 werden Fusionsproteine bereitgestellt, die ein Tumornekrosefaktor-Rezeptor-(TNF-R)-Polypeptid und zumindest ein weiteres Polypeptid umfassen, ausgewählt aus einem Interleukin-1 (IL-1R) und einem zweiten TNF-R-Polypeptid. In WO98/08969 wird ein lösliches Interleukin-1-Rezeptor-Hilfsmolekül-(IL-1R AcM)-Protein bereitgestellt, welches ein Mitglied der Ig-Superfamilie ist, zusammen mit isolierten Nukleinsäure-Molekülen, die für humanes IL-1R AcM codieren, als auch Vektoren, Wirtszellen und rekombinante Methoden zur Erzeugung des Proteins. In WO97/31010 wird ein Rezeptorprotein bereitgestellt, bezeichnet als 2F1, dessen Aminosäuresequenz besagtermaßen anzeigt, dass es ein Mitglied der IL-1-Rezeptorfamilie ist. In EP-A-0 460 846 werden Typ-II-Interleukin-1-Rezeptorproteine, DNAs und Expressionsvektoren bereitgestellt, die für Typ I-IL-R codieren, und Verfahren zur Erzeugung von Typ II-IL-1R als Produkte einer rekombinanten Zellkultur.

[0003] Außerdem wird in WO95/11303 ein Cytokin-antagonistisches Protein bereitgestellt, das zum Binden eines Cytokins zum Erhalt eines nicht-funktionellen Komplexes fähig ist, umfassend die lösliche Spezifitätsbestimmende α -Komponente des Cytokin-Rezeptors, und eine extrazelluläre Domäne einer β -Komponente des Cytokin-Rezeptors.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0004] Die Erfindung stellt ein isoliertes Nukleinsäure-Molekül bereit, das für ein Fusionspolypeptid codiert, welches Fusionspolypeptid die folgenden Fusionspolypeptid-Komponenten umfasst:

- (a) einen Interleukin-1-(IL-1)-bindenden Abschnitt der extrazellulären Domäne der Spezifitätsbestimmenden Komponente eines IL-1-Rezeptors;
- (b) einen IL-1-bindenden Abschnitt einer extrazellulären Domäne der Signalübertragenden Komponente des IL-1-Rezeptors; und
- (c) eine multimerisierende Komponente;

welche multimerisierende Komponente (c) mit einer multimerisierenden Komponente (c), die in einem anderen der Fusionspolypeptide enthalten ist, zur Bildung eines Multimers der Fusionspolypeptide multimerisiert; welches Multimer an IL-1 bindet und es einschließt und sich somit als ein Antagonist von IL-1 verhält.

KURZBESCHREIBUNG DER FIGUREN

[0005] [Fig. 1](#): Angeordnete Bindung von Rezeptorkomponenten in einem Modell eines generischen Cytokin-Rezeptors. Das Modell zeigt, dass die Cytokine bis zu drei Rezeptor-Bindungsstellen enthalten und mit ihren Rezeptor-Komponenten wechselwirken, indem zunächst die optionale α -Komponente gebunden wird, gefolgt von der Bindung an $\beta 1$, und dann an $\beta 2$. Die β -Komponenten für viele Cytokin-Rezeptoren wechselwirken durch Membran-proximale Regionen (schraffierte Boxen) mit der Jak/Tyk-Familie der Tyrosinkinasen von zytoplasmatischem Protein. Die Signaltransduktion wird lediglich auf die Dimerisation der β -Komponenten hin initiiert, wie durch die Tyrosinphosphorylierungen (P) der β -Komponenten und der Jak/Tyk-Kinasen schematisch dargestellt.

[0006] [Fig. 2A–Fig. 2E](#): Nukleotidsequenz-Codierung und abgeleitete Aminosäuresequenz des Fusionspolypeptids, bezeichnet als 569, welches zum Binden des Cytokin IL-1 zur Bildung eines nicht-funktionellen Komplexes fähig ist.

[0007] [Fig. 3](#): Zeigt, dass die 1SC569-Trap (beschrieben in [Fig. 2A–Fig. 2E](#)) zum Antagonisieren der Wirkungen von IL-1 und Blockieren der IL-6-Produktion von MRC5-Zellen auf die Behandlung mit IL-1 hin fähig ist.

[0008] [Fig. 4](#): Humane IL-1-Trap blockiert die in vivo-Wirkungen von exogen verabreichtem huIL-1. BALB/c-Mäuse erhielten eine subkutane Injektion von huIL-1 (0,3 $\mu\text{g/kg}$) zum Zeitpunkt 0. Vierundzwanzig

Stunden vor der hIL-1-Injektion wurden die Tiere entweder mit Vehikel oder einem 150-fachen molaren Überschuss an hIL-1-Trap vorbehandelt. Zwei Stunden vor der Opferung (26 Stunden) wurden die Mäuse nochmals mit einer zweiten Injektion von hIL-1 (0,3 µg/kg, s.c.) provoziert. Die Blutproben wurden zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen und die Seren auf die IL-1-Mengen untersucht (ausgedrückt als Mittelwert \pm SEM; n = 5 pro Gruppe).

AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0009] Ein isoliertes Nukleinsäure-Molekül, das für ein Fusionspolypeptid codiert, welches Fusionspolypeptid die folgenden Fusionspolypeptid-Komponenten umfasst:

- (a) einen Interleukin-1-(IL-1)-bindenden Abschnitt der extrazellulären Domäne der Spezifitäts-bestimmenden Komponente eines IL-1-Rezeptors;
- (b) einen IL-1-bindenden Abschnitt einer extrazellulären Domäne der Signalübertragenden Komponente des IL-1-Rezeptors; und
- (c) eine multimerisierende Komponente;

welche multimerisierende Komponente (c) mit einer multimerisierenden Komponente (c), die in einem anderen der Fusionspolypeptide enthalten ist, zur Bildung eines Multimers der Fusionspolypeptide multimerisiert; welches Multimer an IL-1 bindet und es einschließt und sich somit als ein Antagonist von IL-1 verhält.

[0010] Mit "IL-1-bindendem Abschnitt" ist der minimale Abschnitt der extrazellulären Domäne gemeint, der zum Binden von IL-1 erforderlich ist. Unter den Fachleuten des Gebiets ist allgemein anerkannt, dass eine definierende Charakteristik eines Cytokin-Rezeptors das Vorhandensein der beiden Fibronectin-artigen Domänen, die kanonische Cysteine enthalten, und der WSXWS-Box ist (Bazan, J.F., 1990, PNAS 87: 6934–6938). Die Sequenzen, die für die extrazellulären Domänen der bindenden Komponente des IL-1-Rezeptors und der Signalübertragenden Komponente des IL-1-Rezeptors codieren, können ebenfalls zur Schaffung des Fusionspolypeptids der Erfindung verwendet werden. In ähnlicher Weise können längere Sequenzen, die für größere Abschnitte der Komponenten des IL-1-Rezeptors codieren, verwendet werden. Allerdings wird überlegt, dass kleinere Fragmente als die extrazelluläre Domäne dahingehend wirken, IL-1 zu binden, weshalb die Erfindung Fusionspolypeptide betrifft, die den minimalen Abschnitt der extrazellulären Domäne umfassen, der zum Binden von IL-1 als dem IL-1-bindenden Abschnitt erforderlich ist.

[0011] Die Erfindung umfasst eine "Spezifitäts-bestimmende Komponente" eines IL-1-Rezeptors und eine "Signal-transduzierende Komponente" des IL-1-Rezeptors. Unabhängig von der verwendeten Nomenklatur zur Bezeichnung einer bestimmten Komponente oder Untereinheit eines IL-1-Rezeptors erkennt ein Fachmann des Gebiets, welche Komponente oder Untereinheit eines Rezeptors zur Bestimmung des zellulären Ziels des Cytokins verantwortlich ist, und weiß daher, welche Komponente die "Spezifitäts-bestimmende Komponente" darstellt.

[0012] In ähnlicher Weise weiß ein Fachmann des Gebiets, unabhängig von der verwendeten Nomenklatur, welche Komponente oder Untereinheit eines Rezeptors die "Signalübertragende Komponente" darstellt. Wie hierin verwendet, stellt die "Signalübertragende Komponente" eine Komponente des nativen Rezeptors dar, die nicht die Spezifitäts-bestimmende Komponente ist und die an das Cytokin in Abwesenheit der Spezifitäts-bestimmenden Komponente nicht bindet oder nur schwach bindet. Im nativen Rezeptor kann die "Signalübertragende Komponente" an der Signalgebung teilnehmen.

[0013] Beispiele der Rezeptorkomponenten, die zur Herstellung der Cytokin-Antagonisten gemäß der Erfindung verwendet werden können, sind in Tabelle 1 angegeben.

TABELLE 1

<u>Cytokine</u>	<u>Spezifitäts-bestimmende Komponente</u>	<u>Signalübertragende Komponente</u>
Interleukin-1 (IL-1)	Typ I IL-1R (Ref. 1) Typ II IL-1R (Ref. 1) IL-1RI (Ref. 2) IL-1RII (Ref. 2)	IL-1R AcP (Refs. 1,2)

IN TABELLE 1 ANGEGEBENE LITERATURREFERENZEN

1. Greenfeder, et al., Journal of Biological Chemistry 270: 13757–13765 (1995) – Siehe Seite 13757, Spalte 1, Zeile 6, bis Spalte 2, Zeile 3 und Spalte 2, Zeilen 10–12; Seite 13764, Spalte 2, letzte 3 Zeilen, und Seite 13765, Spalte 1, Zeilen 1–7;
2. Wesche et al., Journal of Biological Chemistry 272: 7727–7731 (1977) Siehe Seite 7731, Zeilen 20–26.

[0014] In der Herstellung der Nukleinsäuresequenz, die für das Fusionspolypeptid der Erfindung codiert, werden die ersten, zweiten und dritten Komponenten des Fusionspolypeptids in einem Einzelstrang der Nukleotide codiert, welcher bei Expression durch ein Wirts-Vektorsystem eine monomere Spezies des Fusionspolypeptids erzeugt. Die derart exprimierten Monomere werden dann durch die Wechselwirkungen zwischen den multimerisierenden Komponenten (den dritten Fusionspolypeptid-Komponenten) multimerisiert. Durch eine derartige Erzeugung der Fusionspolypeptide wird das Erfordernis einer Reinigung der heterodimeren Gemische umgangen, die entstehen würden, wenn die ersten und zweiten Komponenten als separate Moleküle erzeugt und dann multimerisiert werden würden. In US-Patent Nr. 5 470 952, ausgegeben am 28. November 1995, ist beispielsweise die Produktion heterodimerer Proteine beschrieben, die als CNTF oder IL-6-Antagonisten wirken. Die Heterodimeren werden aus Zelllinien ausgereinigt, die mit den entsprechenden Alpha-(α)- und Beta-(β)-Komponenten contransfiziert wurden. Die Heterodimeren werden dann von Homodimeren unter Anwendung von Methoden wie der passiven Elution aus präparativen, nicht-denaturierenden Polyacrylamidgelen oder unter Anwendung der Hochdruck-Kationenaustauschchromatographie abgetrennt. Das Erfordernis dieses Reinigungsschritts wird durch die Methoden der vorliegenden Erfindung umgangen.

[0015] Außerdem gibt PCT Internationale Anmeldung WO 96/11213, veröffentlicht am 18. April 1996, mit dem Titel "Dimere IL-3-Inhibitoren" an, dass der Anmelder Homodimere hergestellt hat, in denen zwei IL-4-Rezeptoren durch einen polymeren Spacer gebunden werden, und Heterodimere hergestellt hat, in denen ein IL-4-Rezeptor durch einen polymeren Spacer an eine Gamma-Kette des IL-2-Rezeptors geknüpft ist. Der beschriebene polymere Spacer ist Polyethylenglykol (PEG). Die beiden Rezeptorkomponenten, IL-4R und IL-2R-Gamma, werden separat exprimiert und gereinigt. Pegylierte Homodimere und Heterodimere werden dann durch miteinander Verbinden der Komponenten unter Verwendung bifunktionaler PEG-Reagenzien erzeugt. Ein Vorteil der vorliegenden Erfindung ist der, dass das Erfordernis solch zeitaufwändiger und kostspieliger Reinigungs- und Pegylierungsschritte umgangen wird.

[0016] Bei einer Ausführungsform der Erfindung befindet sich die Nukleotidsequenz, die für die erste Komponente codiert, stromaufwärts der Nukleotidsequenz, die für die zweite Komponente codiert. Bei einer anderen Ausführungsform der Erfindung befindet sich die Nukleotidsequenz, die für die erste Komponente codiert, stromabwärts der Nukleotidsequenz, die für die zweite Komponente codiert. Weitere Ausführungsformen der Erfindung können hergestellt werden, bei denen die Reihenfolge der ersten, zweiten und dritten Fusionspolypeptid-Komponenten umgestellt ist. Wird zum Beispiel die Nukleotidsequenz, die für die erste Komponente codiert, mit 1 bezeichnet, die Nukleotidsequenz, die für die zweite Komponente codiert, mit 2 bezeichnet, und die Nukleotidsequenz der dritten Komponente mit 3 bezeichnet, so kann die Reihenfolge der Komponenten in der isolierten Nukleinsäure der Erfindung, wie gelesen von 5' nach 3', eine beliebige der folgenden sechs Kombinationen sein; 1, 2, 3; 1, 3, 2; 2, 1, 3; 2, 3, 1; 3, 1, 2 oder 3, 2, 1.

[0017] Das an das Fusionspolypeptid gebundene Cytokin ist Interleukin-1.

[0018] In bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung umfasst die multimerisierende Komponente eine von Immunglobulin abgeleitete Domäne. Spezifischer gesagt kann die von Immunglobulin abgeleitete Domäne ausgewählt werden aus der Gruppe, bestehend aus der Fc-Domäne von IgG, der Schwarkette von IgG und der Leichtkette von IgG. Bei einer anderen Ausführungsform kann die multimerisierende Komponente eine Fc-Domäne sein, von der die ersten fünf Aminosäuren (einschließlich eines Cysteins) entfernt wurden, um eine als Fc(Δ C1) bezeichnete multimerisierende Komponente zu erzeugen. Alternativ kann die multimerisierende Komponente eine Fc-Domäne sein, in der ein Cystein innerhalb der ersten fünf Aminosäuren durch eine andere Aminosäure substituiert wurde, wie zum Beispiel Serin oder Alanin.

[0019] Die vorliegende Erfindung stellt auch Fusionspolypeptide bereit, die durch die isolierten Nukleinsäure-Moleküle der Erfindung codiert sind. Vorzugsweise liegen die Fusionspolypeptide aufgrund der Funktion der dritten multimerisierenden Komponente in multimerer Form vor. In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Multimer ein Dimer. Geeignete multimerisierende Komponenten sind Sequenzen, die eine Hinge-Region einer Immunglobulin-Schwarkette codieren (Takahashi et al., 1982, Cell 29: 671–679); Immunglobulin-Gensequenzen und Teile davon. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden Immunglobulin-Gensequenzen

zen, insbesondere solche, die die Fc-Domäne codieren, zum Codieren der dritten multimerisierenden Komponente verwendet.

[0020] Die vorliegende Erfindung betrifft auch einen Vektor, welcher das Nukleinsäure-Molekül der Erfindung, wie hierin beschrieben, umfasst.

[0021] Ebenfalls bereitgestellt wird ein Expressionsvektor, der ein Nukleinsäure-Molekül der Erfindung, wie hierin beschrieben, umfasst, wobei das Nukleinsäure-Molekül funktionsfähig mit einer Expressions-Kontrollsequenz verknüpft ist. Ebenfalls bereitgestellt wird ein Wirts-Vektorsystem für die Herstellung eines Fusionspolypeptids, welches den Expressionsvektor der Erfindung umfasst, der in eine Wirtszelle eingeführt wurde, die zur Expression des Fusionspolypeptids geeignet ist. Die geeignete Wirtszelle kann eine Bakterienzelle wie *E. coli*, eine Hefezelle wie *Pichia pastoris*, eine Insektenzelle wie *Spodoptera frugiperda*, oder eine Säugerzelle, wie z.B. COS-, CHO-, 293-, BHK- oder NSO-Zellen sein.

[0022] Die vorliegende Erfindung stellt außerdem Verfahren zur Herstellung der Fusionspolypeptide der Erfindung bereit, indem Zellen der hierin beschriebenen Wirts-Vektorsysteme unter Bedingungen gezüchtet werden, die die Produktion des Fusionspolypeptids und die Rückgewinnung des derart erzeugten Fusionspolypeptids erlauben.

[0023] Die hierin beschriebene Technologie kann auf die Entwicklung einer Cytokin-Trap für jegliches Cytokin angewendet werden, das eine α -Komponente, die Spezifität verleiht, als auch eine β -Komponente ausnützt, die in Bindung an die α -Spezifitätskomponente eine höhere Affinität für das Cytokin aufweist als irgendeine Komponente alleine. Demgemäß sind Antagonisten gemäß der Erfindung Antagonisten von Interleukin-1 [Greenfeder et al., J. Biol. Chem. 270: 13757–13765 (1995); Guo et al., J. Biol. Chem. 270: 27562–27568 (1995)].

[0024] Pharmazeutische Zusammensetzungen zur Verwendung gemäß der Erfindung beinhalten die oben beschriebenen Antagonisten in einem pharmakologisch geeigneten flüssigen, festen oder halbfesten Träger, geknüpft an einen Träger oder ein Zielmolekül (z.B. Antikörper, Hormon, Wachstumsfaktor, etc.) und/oder aufgenommen in Liposome, Mikrokapseln und ein kontrolliert freisetzendes Präparat (einschließlich Antagonist-exprimierender Zellen) vor der in vivo-Verabreichung. Zum Beispiel kann die pharmazeutische Zusammensetzung einen oder mehrere der Antagonisten in einer wässrigen Lösung umfassen, wie etwa steriles Wasser, Salzlösung, Phosphatpuffer oder Dextroselösung. Alternativ können die Wirksubstanzen in einer festen (z.B. Wachs) oder halbfesten (z.B. gelatineartigen) Formulierung enthalten sein, die einem Patienten implantiert werden kann, der einer solchen Behandlung bedarf. Der Verabreichungsweg kann jegliche im Fachgebiet bekannte Verabreichungsform sein, einschließlich, doch nicht beschränkt auf intravenös, intrathekal, subkutan, durch Injektion in beteiligtes Gewebe, intraarteriell, intranasal, oral oder über ein implantiertes Element.

[0025] Die Verabreichung kann zur Verteilung der Wirksubstanz der Erfindung im ganzen Körper oder in einem lokalisierten Bereich führen. Zum Beispiel kann unter bestimmten Bedingungen, die entfernte Regionen des Nervensystems einbeziehen, eine intravenöse oder intrathekale Verabreichung des Agens erwünscht sein. In einigen Situationen kann ein die Wirksubstanz enthaltendes Implantat in oder nahe dem verletzten Bereich platziert werden. Zu geeigneten Implantaten zählen, ohne darauf beschränkt zu sein, Gelschaum, Wachs oder Implantate auf Mikropartikel-Basis.

BEISPIELE

KLONIEREN DER FUSIONSPOLYPEPTID-KOMPONENTEN

[0026] Die extrazellulären Domänen von humanen Cytokin-Rezeptoren wurden mittels standardmäßiger PCR-Techniken unter Verwendung von Gewebe-cDNAs (CLONTECH), kloniert in den Expressionsvektor pMT21 (Genetics Institute, Inc.), erhalten, und die Sequenzen wurden mittels standardmäßiger Techniken unter Verwendung eines ABI 373A DANN-Sequenzierers und des Taq Dideoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) sequenziert. Für das IL-1RAcP wurden Nukleotide 1 bis 1074 (entsprechend den Aminosäuren 1-358) von der Genbank-Sequenz AB006357 kloniert. Für das IL-1RI wurden Nukleotide 55 bis 999 (entsprechend den Aminosäuren 19-333) aus der Genbank-Sequenz X16896 kloniert.

PRODUKTION DER FUSIONSPOLYPEPTIDE (CYTOKIN-TRAP)

[0027] Die Cytokin-Traps codierenden Nukleotidsequenzen wurden aus den einzelnen klonierten DNAs (be-

schrieben supra) mittels standardmäßiger Klonier- und PCR-Techniken konstruiert. Die Sequenzen wurden in-frame konstruiert, so dass die Sequenz, die für die erste Fusionspolypeptid-Komponente codierte, an die Sequenz fusioniert wurde, die für die zweite Fusionspolypeptid-Komponente codierte, gefolgt von einer Fc-Domäne (Hinge, CH2- und CH3-Region des humanen IgG1) als der multimerisierenden Komponente. Extra-Nukleotide wurden in-frame zwischen die Sequenzen inseriert, die für die ersten und zweiten Fusionspolypeptid-Komponenten codierten, um eine Linkerregion zwischen die beiden Komponenten einzufügen (siehe [Fig. 2A–Fig. 2E](#) – Trap 569).

[0028] Für die IL-1-Trap 569 ([Fig. 2A–Fig. 2E](#)) folgt der IL-1RAcP-Komponente 5' die IL-1RI-Komponente und dann die Fc-Domäne. Die endgültigen Konstrukte wurden in den Säuger-Expressionsvektor pCDNA3.1 (STRATAGENE) kloniert.

[0029] In der 569-Sequenz ([Fig. 2A–Fig. 2E](#)) codieren die Nukleotide 1-1074 für die IL-1RAcP-Komponente, codieren Nukleotide 1075-1098 für die Linkerregion, codieren Nukleotide 1099-2043 für die IL-1RI-Komponente und codieren Nukleotide 2044-2730 für die Fc-Domäne.

[0030] Die DNA-Konstrukte wurden entweder transient in COS-Zellen oder stabil in CHO-Zellen unter Anwendung von einem Fachmann des Gebiets bekannten standardmäßigen Techniken transfiziert. Die Überstände wurden abgesammelt und mittels Protein A-Affinitätschromatographie und Größenausschlusschromatographie anhand der standardmäßigen Techniken gereinigt. (Siehe zum Beispiel Harlow und Lane, Antibodies – A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988).

MRC5-BIOASSAY FÜR IL1-TRAPS

[0031] Humane MRC5-Lungenfibroblastenzellen reagieren auf IL-1 durch Absondern von IL-6 und wurden daher zur Untersuchung der Fähigkeit von IL-1-Traps verwendet, die IL-1-abhängige Produktion von IL-6 zu blockieren. IL-1-Trap ISC569 ([Fig. 2A–Fig. 2E](#)) wurde gegen IL-1-RI.Fc getestet, welches die extrazelluläre Domäne des IL-1-Typ I-Rezeptors in Fusion an eine Fc-Domäne ist.

[0032] MRC5-Zellen wurden bei 1×10^5 Zellen pro ml in Medium suspendiert, und 0,1 ml der Zellen wurden in die Vertiefungen einer 96-Well-Gewebekulturplatte ausplattiert (10.000 pro Vertiefung). Die Platten wurden für 24 Stunden bei 37°C in einem befeuchteten 5 % CO₂-Inkubator inkubiert.

[0033] Die IL-1-Trap und das rekombinante humane IL-1 wurden bei variierenden Dosen in einer 96-Well-Gewebekulturschale präinkubiert und für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. 0,1 ml dieses Gemischs wurden dann der 96-Well-Platte, enthaltend die MRC5-Zellen, hinzugegeben, so dass die Endkonzentration der IL-1-Trap 10 nM betrug und die Endkonzentrationen des IL-1 im Bereich von 2,4 pM bis 5 nM lagen. Die Kontrollvertiefungen enthielten entweder lediglich Trap oder gar nichts.

[0034] Die Platten wurden dann bei 37°C für 24 Stunden in einem befeuchteten 5 % CO₂-Inkubator inkubiert. Der Überstand wurde abgesammelt und auf die Mengen an IL-6 unter Verwendung eines R&D Systems Quantikine Immunoassay Kit gemäß den Anleitungen des Herstellers untersucht.

ERGEBNISSE

[0035] **Fig. 30** zeigt, dass Trap 569 ([Fig. 2A–Fig. 2E](#)) zum Antagonisieren der Wirkungen von IL-1 und Blockieren der IL-6-Produktion von MRC5-Zellen auf die Behandlung mit IL-1 hin in der Lage ist. Bei einer Konzentration von 10 nM ist Trap 569 zum Blockieren der Produktion von IL-6 bis zu einer IL-1-Konzentration von 3 nM fähig. Im Gegensatz dazu ist IL-1RI.Fc ein viel schlechterer Antagonist von IL-1. Es ist lediglich zum Blockieren der Wirkungen von IL-1 bei bis zu etwa 10–20 pM in der Lage. Daher blockiert Trap 569 das IL-1 etwa 100-mal besser als IL-1RI.Fc.

BLOCKIEREN VON INJIZIERTEM IL-1 DURCH IL-1-TRAP IN VIVO

[0036] IL-1 ist ein entzündungsförderndes Cytokin. Von der systemischen Verabreichung von IL-1 wurde gezeigt, dass sie akute Reaktionen in Tieren auslöst, einschließlich vorübergehender Hyperglykämie, Hyposinsulinämie, Fieber, Anorexie und erhöhten Serumspiegeln an Interleukin-6 (IL-6) (Reimers, 1998). Da Mäuse sowohl auf murines als auch humanes IL-1 reagieren, kann humanes IL-1 verwendet werden und können die in vivo-Bindungswirkungen von humanspezifischen IL-1-Antagonisten ausgewertet werden. Dieses akute Mausmodell wurde zur Bestimmung der Fähigkeit einer humanen IL-1-Trap verwendet, die in vivo-Wirkungen

von exogen verabreichtem humanem IL-1 zu antagonisieren. Dies liefert eine schnelle Angabe der in vivo-Wirksamkeit der humanen IL-1-Trap und kann als ein Assay zur Unterstützung der Molekülauswahl verwendet werden.

Experimentelles Design:

[0037] Mäuse erhielten subkutane Injektionen von humanem IL-1 (0,3 µg/kg). Vierundzwanzig Stunden vor der Injektion mit humanem IL-1 wurden die Tiere entweder mit Vehikel oder einem 150-fachen molaren Überschuss an humaner IL-1-Trap (0,54 mg/kg) vorbehandelt. Zwei Stunden vor der Opferung (26 Stunden) erhielten die Mäuse eine zweite Injektion von humanem IL-1 (0,3 µg/kg). Blutproben wurden zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen und die Seren auf die IL-6-Spiegel untersucht.

ERGEBNISSE

[0038] Die exogene Verabreichung von humanem IL-1 führte zu einer enormen Induktion der Serum-IL-6-Spiegel. Bei einem 150-fachen molaren Überschuss blockierte die humane IL-1-Trap den IL-6-Anstieg ([Fig. 4](#)). Außerdem hielten die Wirkungen der humanen IL-1-Trap mindestens etwa weitere 24 Stunden lang an, was einen IL-6-Anstieg selbst dann verhinderte, wenn IL-1 nochmals verabreicht wurde ([Fig. 4](#)). Eine derart langanhaltende Wirksamkeit legt nahe, dass eine tägliche Injektion einer IL-1-Trap für chronische Anwendungen nicht erforderlich sein muss.

[0039] Die vorliegende Erfindung ist durch die hierin beschriebenen spezifischen Ausführungsformen in ihrem Umfang nicht als beschränkt zu verstehen. Tatsächlich werden verschiedene Modifikationen der Erfindung über die hierin beschriebenen hinaus für Fachleute des Gebiets aus der vorangegangenen Beschreibung und den begleitenden Figuren erkennbar werden. Solche Modifikationen sind als im Rahmen der anhängenden Ansprüche befindlich zu betrachten.

Patentansprüche

1. Isoliertes Nukleinsäure-Molekül, das für ein Fusionspolypeptid codiert, welches Fusionspolypeptid die folgenden Fusionspolypeptid-Komponenten umfasst:

- (a) einen Interleukin-1-(IL-1)-bindenden Abschnitt der extrazellulären Domäne der Spezifitäts-bestimmenden Komponente eines IL-1-Rezeptors;
- (b) einen IL-1-bindenden Abschnitt einer extrazellulären Domäne der Signalübertragenden Komponente des IL-1-Rezeptors; und
- (c) eine multimerisierende Komponente;

welche multimerisierende Komponente (c) mit einer multimerisierenden Komponente (c), die in einem anderen der Fusionspolypeptide enthalten ist, zur Bildung eines Multimers der Fusionspolypeptide multimerisiert; welches Multimer an IL-1 bindet und es einschließt und sich somit als ein Antagonist von IL-1 verhält.

2. Isoliertes Nukleinsäure-Molekül nach Anspruch 1, worin die Komponente (a) des Fusionspolypeptids einen IL-1-bindenden Abschnitt der extrazellulären Domäne des IL-1R vom Typ I umfasst und die Komponente (b) einen IL-1-bindenden Abschnitt einer extrazellulären Domäne von IL-1R-AcP umfasst.

3. Isoliertes Nukleinsäure-Molekül nach Anspruch 1, worin die Komponente (a) des Fusionspolypeptids einen IL-1-bindenden Abschnitt der extrazellulären Domäne des IL-1R vom Typ II umfasst und die Komponente (b) einen IL-1-bindenden Abschnitt einer extrazellulären Domäne von IL-1R-AcP umfasst.

4. Isoliertes Nukleinsäure-Molekül nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin das Multimer ein Dimer ist.

5. Isoliertes Nukleinsäure-Molekül nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin die multimerisierende Komponente eine von Immunglobulin abgeleitete Domäne umfasst.

6. Isoliertes Nukleinsäure-Molekül nach Anspruch 5, worin die von Immunglobulin abgeleitete Domäne ausgewählt ist aus der Fc-Domäne von IgG, der Schwereketten von IgG und der Leichtketten von IgG.

7. Isoliertes Nukleinsäure-Molekül nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin sich die Nukleotidsequenz-codierende Komponente (a) stromaufwärts der Nukleotidsequenz-codierenden Komponente (b) befindet.

8. Nukleinsäure-Molekül nach einem der Ansprüche 1 bis 6, worin sich die Nukleotidsequenz-codierende Komponente (a) stromabwärts der Nukleotidsequenz-codierenden Komponente (b) befindet.
9. Multimer, welches zwei oder mehr Fusionspolypeptide, codiert durch die Nukleinsäure-Moleküle nach einem der vorangehenden Ansprüche, umfasst, welches Multimer an IL-1 bindet und es einschließt und sich als ein Antagonist von IL-1 verhält.
10. Multimer nach Anspruch 9, welches ein Dimer ist, umfassend zwei der Fusionspolypeptide.
11. Vektor, welcher das Nukleinsäure-Molekül nach einem der Ansprüche 1 bis 8 umfasst.
12. Expressionsvektor, welcher ein Nukleinsäure-Molekül nach einem der Ansprüche 1 bis 8 umfasst, worin das Nukleinsäure-Molekül funktionsfähig mit einer Expressions-Kontrollsequenz verknüpft ist.
13. Wirts-Vektorsystem für die Erzeugung eines Fusionspolypeptids, welches den Expressionsvektor nach Anspruch 12 in einer Wirtszelle umfasst.
14. Wirts-Vektorsystem nach Anspruch 13, wobei die Wirtszelle eine bakterielle Zelle, Hefezelle, Insektenzelle oder Säugetierzelle ist.
15. Wirts-Vektorsystem nach Anspruch 13, wobei die Wirtszelle E. coli, eine COS-Zelle, eine CHO-Zelle, eine 293-Zelle, eine BHK-Zelle oder eine NSO-Zelle ist.
16. Methode zur Erzeugung von Fusionspolypeptiden, welche das Züchten von Zellen des Wirts-Vektorsystems nach Anspruch 13, 14 oder 15 unter Bedingungen, die das Erzeugen von Fusionspolypeptiden zulassen, und das Gewinnen der derart erzeugten Fusionspolypeptide umfasst.
17. Methode nach Anspruch 16, welche außerdem das Möglichmachen umfasst, dass die Fusionspolypeptide Multimere der Fusionspolypeptide nach Anspruch 9 bilden.
18. Methode nach Anspruch 17, wobei die Multimere Dimere nach Anspruch 10 sind.
19. Pharmazeutische Zusammensetzung, welche ein Multimer nach Anspruch 9 oder ein Dimer nach Anspruch 10 in einem pharmakologisch geeigneten flüssigen, festen oder halbfesten Träger, geknüpft an einen Träger oder ein Zielmolekül und/oder aufgenommen in Liposome, Mikrokapseln oder ein kontrolliert freisetzendes Präparat, umfasst.

Es folgen 8 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Fig. 1.

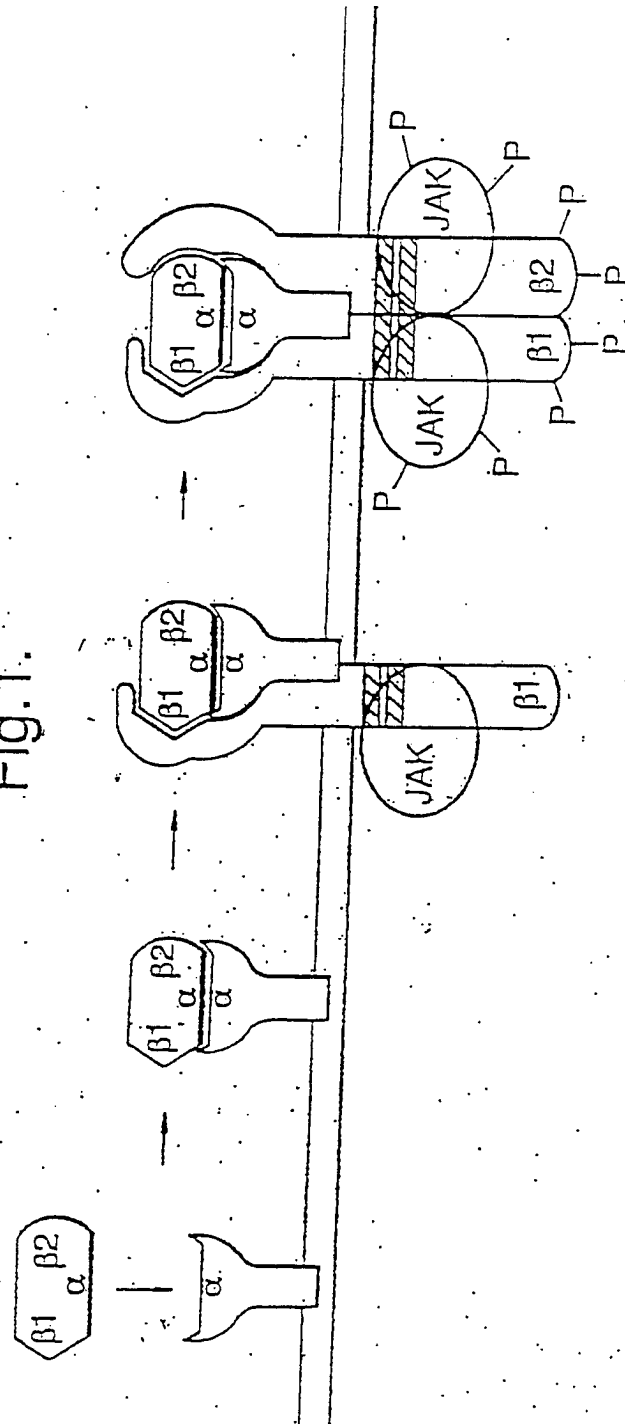


Fig. 2A.

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

Fig. 2B.

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1160      1170      1180      1190      1200
*      *      *      *      *

```

Fig. 2C.

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

Fig. 2D.

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2360      2370      2380      2390      2400

```

Fig. 2E.

```

* * * * *
AAG GTC TCC AAC AAA GCC CTC CCA GCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser>
2410      2420      2430      2440
* * * * *
AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAA CCA CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro>
2450      2460      2470      2480      2490
* * * * *
TCC CGG GAG GAG ATG ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC
Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val>
2500      2510      2520      2530      2540
* * * * *
AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly>
2550      2560      2570      2580      2590
* * * * *
CAG CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC AGG CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp>
2600      2610      2620      2630      2640
* * * * *
GGC TCC TTC TTC CTC TAT AGC AAG CTC ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp>
2650      2660      2670      2680
* * * * *
CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His>
2690      2700      2710      2720      2730
* * * * *
AAC CAC TAC ACG CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CCG GGT AAA TGA
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys ***>

```

Fig. 3.

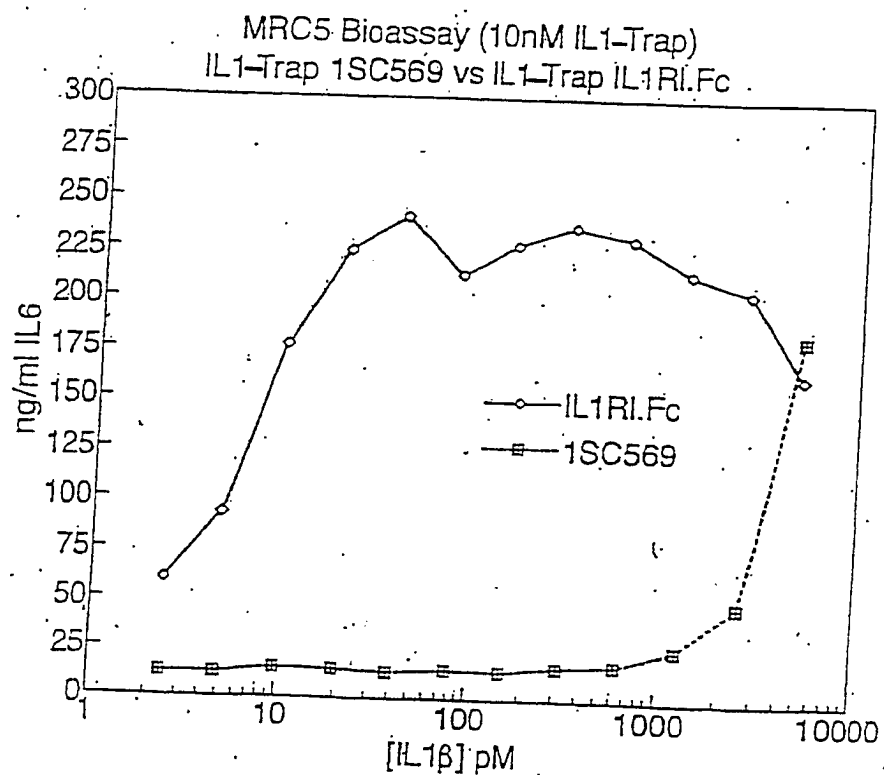


Fig. 4.

