



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 699 32 832 T2 2007.02.08

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 115 876 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 699 32 832.2

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US99/22045

(96) Europäisches Aktenzeichen: 99 952 942.3

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 2000/018932

(86) PCT-Anmeldetag: 22.09.1999

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 06.04.2000

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 18.07.2001

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 16.08.2006

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 08.02.2007

(51) Int Cl.⁸: C12N 15/62 (2006.01)

C07K 14/715 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

(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:

STAHL, Neil, Carmel, NY 10512, US;
YANCOPOULOS, D., George, Yorktown Heights,
NY 10598, US

(74) Vertreter:

Rechts- und Patentanwälte Lorenz Seidler Gossel,
80538 München

(54) Bezeichnung: ANTAGONISTEN AUF REZEPTORGRUNDLAGE UND VERFAHREN ZU DEREN HERSTELLUNG
UND VERWENDUNG

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 eingelebt, 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

[0001] Diese Anmeldung beansprucht die Priorität der U.S.-Anmeldung Nr. 09/313 942, eingereicht am 19. Mai 1999, welche die Priorität der vorläufigen U.S.-Anmeldung Nr. 60/101 858, welche am 25. September 1998 eingereicht worden war, beansprucht. Überall in dieser Anmeldung wird auf verschiedene Veröffentlichungen Bezug genommen.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Obgleich sie aufgrund varierender biologischer Aktivitäten entdeckt wurden, bilden Ciliärer Neurotropher Faktor (CNTF), Leukämie-Inhibitorischer Faktor (LIF), Oncostatin M (OSM) und Interleukin-6 (IL-6) eine definierte Familie von Cytokinen (hierin bezeichnet als die "CNTF-Familie" von Cytokinen). Diese Cytokine werden zusammen gruppiert wegen ihrer entfernten Strukturähnlichkeiten [Bazan, J. Neuron 7: 197–208 (1991); Rose und Bruce, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 8641–8645 (1991)] und, vielleicht bedeutsamer, weil sie " β "-Signaltransduktions-Rezeptorkomponenten gemeinsam haben [Baumann et al., J. Biol. Chem. 265: 19853–19862 (1993); Davis et al., Science 260: 1805–1808 (1993); Gearing et al., Science 255: 1434–1437 (1992); Ip et al., Cell 69: 1121–1132 (1992); Stahl et al., J. Biol. Chem. 268: 7628–7631 (1993); Stahl und Yancopoulos, Cell 74: 587–590 (1993)]. Eine Rezeptoraktivierung durch diese Familie von Cytokinen resultiert aus entweder Homo- oder Hetero-Dimerisierung dieser β -Komponenten [Davis et al., Science 260: 1805–1808 (1993), Murakami et al., Science 260: 1808–1810 (1993); Stahl und Yancopoulos, Cell 74: 587–590 (1993)]. Die IL-6-Rezeptor-Aktivierung erfordert eine Homodimerisierung von gp130 [Murakami et al., Science 260: 1808–1810 (1993), Hibi et al., Cell 63: 1149–1157 (1990)], ein Protein, das anfänglich als der IL-6-Signaltransducer identifiziert wurde [Hibi et al., Cell 63: 1149–1157 (1990)]. CNTF-, LIF- und OSM-Rezeptor-Aktivierung resultiert aus der Heterodimerisierung zwischen gp130 und einem zweiten gp130-verwandten Protein, das als LIFR β bekannt ist [Davis et al., Science 260: 1805–1808 (1993)], welches anfänglich durch seine Fähigkeit, LIF zu binden, identifiziert worden war [Gearing et al., EMBO, J. 10: 2839–2848 (1991)].

[0003] Zusätzlich zu den β -Komponenten erfordern einige dieser Cytokine auch Spezifitätbestimmende " α "-Komponenten, welche hinsichtlich ihrer Gewebeverteilung eingeschränkter sind als die β -Komponenten, und somit die zellulären Ziele der jeweiligen Cytokine bestimmen [Stahl und Yancopoulos, Cell 74: 587–590 (1993)]. Somit sind LIF und OSM breit wirkende Faktoren, welche nur die Gegenwart von gp130 und LIFR β auf antwortenden Zellen erfordern können, wohingegen CNTF CNTFR α erfordert [Stahl und Yancopoulos, Cell 74: 587–590 (1993)] und IL-6 IL-6R α erfordert [Kishimoto et al., Science 258: 593–597 (1992)]. Sowohl CNTFR α (Davis et al., Science 259: 1736–1739 (1993)) als auch IL-6R α [Hibi et al., Cell 63: 1149–1157, Murakami et al., Science 260: 1808–1810 (1990); Taga et al., Cell 58: 573–581 (1989)] können als lösliche Proteine wirken, konsistent mit der Vorstellung, dass sie nicht mit intrazellulären Signalisierungs-Molekülen wechselwirken, sondern dass sie dazu dienen, ihren Liganden dabei zu helfen, mit den passenden signaltransduzierenden β -Untereinheiten zu interagieren [Stahl und Yancopoulos, Cell 74: 587–590 (1993)].

[0004] Zusätzliche Beweise aus anderen Cytokinsystemen unterstützen ebenfalls die Vorstellung, dass eine Dimerisierung einen üblichen Mechanismus bereitstellt, durch welchen alle Cytokin-Rezeptoren die Signaltransduktion initiieren. Wachstumshormon (GH) dient vielleicht als das beste Beispiel in dieser Hinsicht. Kristallographische Untersuchungen haben enthüllt, dass jedes GH-Molekül zwei distinkte Rezeptorbindungsstellen enthält, von denen beide durch die gleiche Bindungsdomäne im Rezeptor erkannt werden, was ermöglicht, dass ein einzelnes Molekül von GH an zwei Rezeptormolekülen ankoppelt [de Vos et al., Science 255: 306–312 (1992)]. Eine Dimerisierung findet sequenziell statt, wobei die Stelle 1 auf dem GH zuerst an ein Rezeptormolekül bindet, gefolgt von der Bindung von Stelle 2 an ein zweites Rezeptormolekül [Fuh et al., Science 256: 1677–1680 (1992)]. Untersuchungen mit dem Erythropoietin(EPO)-Rezeptor stehen ebenfalls in Übereinstimmung mit der Bedeutsamkeit von Dimerisierung bei der Rezeptoraktivierung, da EPO-Rezeptoren konstitutiv aktiviert werden können durch einen einzigen Aminosäureaustausch, welcher einen Cysteinrest einführt und zu Disulfid-verknüpften Homodimeren führt [Watowich et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 2140–2144 (1992)].

[0005] Zusätzlich zu Homo- oder Heterodimerisierung von β -Untereinheiten als dem kritischen Schritt für die Rezeptoraktivierung besteht ein zweites wichtiges Merkmal darin, dass die Bildung des letztendlichen Rezeptorkomplexes durch die CNTF-Familie von Cytokinen durch einen Mechanismus stattfindet, bei welchem der Ligand sukzessiv an Rezeptorkomponenten in einer geordneten Reihenfolge bindet [Davis et al., Science 260: 1805–1818 (1993); Stahl und Yancopoulos, Cell 74: 587–590 (1993)]. Somit bindet CNTF zuerst an CNTFR α unter Bildung eines Komplexes, welcher dann an gp130 bindet, um ein Intermediat zu bilden (hierin bezeichnet als das $\alpha\beta$ -Intermediat), welches nicht Signalisierungs-kompetent ist, weil es nur eine einzige β -Komponente

aufweist, bevor letztendlich LIFR β herangezogen wird, um ein Heterodimer von β -Komponenten zu bilden, welches dann eine Signaltransduktion initiiert. Obwohl ein ähnliches Intermediat, enthaltend IL-6, gebunden an IL-6Ra und ein einzelnes Molekül von gp130, nicht direkt isoliert worden ist, haben wir postuliert, dass es existiert, und zwar durch Analogie zu seinem entfernten Verwandten, CNTF, sowie die Tatsache, dass der letztendliche aktive IL-6-Rezeptorkomplex zwei gp130-Monomere rekrutiert bzw. heranzieht. Zusammengenommen führen diese Befunde zu einem Vorschlag für die Struktur eines generischen Cytokin-Rezeptorkomplexes (**Fig. 1**), in welchem jedes Cytokin bis zu 3 Rezeptorbindungsstellen aufweisen kann: Eine Stelle, welche an eine wahlfreie α -Spezifitätsbestimmungs-Komponente bindet (α -Stelle), eine Stelle, welche an die erste β -Signaltransduzierungs-Komponente bindet (β_1 -Stelle), und eine Stelle, welche an die zweite β -Signaltransduzierungs-Komponente bindet, (β_2 -Stelle) [Stahl und Yancopoulos, Cell 74: 587–590 (1993)]. Diese 3 Stellen werden in sequenzieller Weise verwendet, wobei der letzte Schritt in der Komplexbildung – der zur β -Komponenten-Dimerisierung führt – kritisch für die Initiierung der Signaltransduktion ist [Davis et al., Science 260: 1805–1818 (1993)]. Die Kenntnis der Einzelheiten der Rezeptoraktivierung und die Existenz des nicht-funktionalen β_1 -Intermediates für CNTF haben zur Feststellung geführt, dass CNTF ein Hochaffinitäts-Antagonist für IL-6 unter gewissen Umständen ist und die strategische Grundlage für einen Entwurf von Ligand- oder Rezeptorbasierten Antagonisten für die CNTF-Familie von Cytokinen bereitstellt, wie es nachstehend ausführlich geschildert wird.

[0006] Sobald eine Cytokinbindung die Rezeptorkomplexbildung induziert, aktiviert die Dimerisierung von β -Komponenten eine intrazelluläre Tyrosinkinaseaktivität, welche zur Phosphorylierung einer großen Vielzahl von Substraten führt [Ip et al., Cell 69: 121–1132 (1992)]. Diese Aktivierung von Tyrosinkinase scheint kritisch für stromabwärts erfolgende Ereignisse zu sein, da Inhibitoren, welche die Tyrosin-Phosphorylierungen blockieren, ebenfalls spätere Ereignisse, wie Geninduktionen, verhindern [Ip et al., Cell 69: 121–1132 (1992); Nakajima und Wall, Mol. Cell. Biol. 11: 1409–1418 (1991)]. Kürzlich haben wir demonstriert, dass eine neu entdeckte Familie von Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen, welche Jak1, Jak2 und Tyk2 (bezeichnet als die Jak/Tyk-Kinasen) einschließt [Firbach-Kraft et al., Oncogene 5: 1329–1336 (1990); Wilks et al., Mol. Cell. Biol. 11: 2057–2065 (1991)], und welche bei der Signaltransduktion mit anderen Cytokinen beteiligt sind [Argetsinger et al., Cell 74: 237–244 (1993); Silvennoinen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 8429–8433 (1993); Velazquez et al., Cell 70: 313–322 (1992); Witthuhn et al., Cell 74: 227–236 (1993)], mit den cytoplasmatischen Domänen der β -Untereinheiten gp130 und LIFR β in Abwesenheit von Ligand präassoziiieren und nach Liganden-Zugabe bzw. – Addition Tyrosin-phosphoryliert und aktiviert werden [Stahl et al., Science 263: 92–95 (1994)]. Deshalb scheinen diese Kinasen der proximalste Schritt der intrazellulären Signaltransduktion zu sein, aktiviert innerhalb der Zelle, als ein Ergebnis der Ligandenbindung außerhalb der Zelle. Assaysysteme zum Screenen von Sammlungen von kleinen Molekülen hinsichtlich spezifischer Agonisten- oder Antagonisten-Aktivitäten, welche auf diesem System basieren, werden nachstehend beschrieben.

[0007] Die CNTF-Familie von Cytokinen spielt wichtige Rollen in einer großen Vielzahl von physiologischen Vorgängen, welche potenzielle therapeutische Anwendungen sowohl für Antagonisten als auch Agonisten vorsehen.

[0008] Zum Beispiel betrifft die WO 95/11303 Cytokin-Fallen, aufgebaut aus einer extrazellulären Domäne der Spezifitätsbestimmungs-Komponente und der extrazellulären Domäne einer Signalisierungs-Komponente.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0009] Ein Ziel der vorliegenden Erfindung ist die Herstellung von Cytokin-Antagonisten, welche nützlich bei der Behandlung von Cytokin-verwandten Krankheiten oder Erkrankungen sind.

[0010] Ein weiteres Ziel der Erfindung ist die Verwendung der offebarten Cytokin-Antagonisten für die Behandlung von Cytokin-verwandten Krankheiten oder Erkrankungen. Zum Beispiel kann ein hierin beschriebener IL-6-Antagonist für die Behandlung von Osteoporose, der primären und sekundären Auswirkungen von Krebsarten, einschließlich multiplem Myelom, oder Cachexie verwendet werden.

[0011] Folglich sieht die Erfindung ein isoliertes Nukleinsäuremolekül vor, welches ein Fusionspolypeptid codiert, wobei das Fusionspolypeptid die folgenden Fusionspolypeptidkomponenten umfasst:

- (a) ein Cytokin-Bindungsteil der extrazellulären Domäne der Spezifität-bestimmenden Komponente eines Cytokin-Rezeptors;
- (b) ein Cytokin-Bindungsteil einer extrazellulären Domäne der Signaltransduzierenden Komponente eines Cytokin-Rezeptors; und
- (c) eine Multimerisierungs-Komponente;

wobei die Multimerisierungs-Komponente (c) mit einer Multimerisierungs-Komponente (c), die in einem anderen der Fusionspolypeptide vorhanden ist, multimerisiert, wodurch ein Multimer der Fusionspolypeptide gebildet wird;
wobei das Multimer an einem Cytokin bindet und es einfängt und somit als ein Antagonist des Cytokins wirkt; und
wobei das Cytokin aus Interleukin-4 (IL-4), Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-13 (IL-13) gewählt wird.

[0012] Die Erfindung des Weiteren ein Multimer vor, umfassend zwei oder mehrere Fusionspolypeptide, die von Nukleinsäuremolekülen, wie eben beschrieben, codiert werden, wobei das Multimer an ein Cytokin bindet und es einfängt und somit als ein Antagonist des Cytokins wirkt. Vorzugsweise ist das Multimer ein Dimer.

[0013] Die vorliegende Erfindung stellt ebenfalls einen Vektor bereit, der ebenfalls ein Nukleinsäuremolekül der Erfindung umfasst.

[0014] Die Erfindung sieht auch einen Expressionsvektor vor, umfassend ein Nukleinsäuremolekül der Erfindung, wobei das Nukleinsäuremolekül in funktionsfähiger Weise an einer Expressionskontrollsequenz gebunden ist.

[0015] Die Erfindung sieht ebenfalls ein Wirt-Vektor-System zur Herstellung eines Fusionspolypeptids vor, welches den Expressionsvektor in einer Wirtszelle umfasst.

[0016] Die Erfindung sieht des Weiteren ein Verfahren zur Herstellung von Fusionspolypeptiden vor, welches das Wachsenlassen von Zellen des Wirt-Vektor-Systems der Erfindung unter Bedingungen umfasst, die die Herstellung der Fusionspeptide und das Gewinnen der so hergestellten Fusionspolypeptide erlauben.

[0017] Die Erfindung sieht ebenfalls eine pharmazeutische Zusammensetzung vor, umfassend ein Multimer, vorzugsweise ein Dimer, der Erfindung in einem pharmakologisch annehmbaren flüssigen, festen oder halbfesten Träger, geknüpft an einen Träger oder ein Zielsuchmolekül und/oder eingebracht in Liposomen, Mikrokapseln oder eine Präparation mit regulierter Freisetzung.

[0018] Die Erfindung stellt ebenfalls ein Multimer, bevorzugt ein Dimer, der Erfindung zur Verwendung bei der Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers bereit.

KURZE BESCHREIBUNG DER FIGUREN

[0019] [Fig. 1:](#) Der Reihenfolge nach erfolgende bzw. geordnete Bindung von Rezeptorkomponenten in einem Modell eines generischen Cytokin-Rezeptors. Das Modell zeigt, dass Cytokine bis zu 3 Rezeptorbindungsstellen enthalten und wechselwirken mit ihren Rezeptorkomponenten durch Bindung zuerst der wahlfreien α -Komponente, gefolgt von Bindung an $\beta 1$, und dann $\beta 2$. Die β -Komponenten für viele Cytokin-Rezeptoren interagieren über membran-proximale Regionen (schattierte Kästen) mit der Jak/Tyk-Familie von cytoplasmatischen Proteintyrosinkinasen. Nur nach Dimerisierung von β -Komponenten wird eine Signaltransduktion initiiert, wie schematisch dargestellt durch die Tyrosinphosphorylierungen (P) der β -Komponenten und der Jak/Tyk-Kinasen.

[0020] [Fig. 2:](#) CNTF inhibiert IL-6-Antworten in einer PC12-Zelllinie (bezeichnet als PC12D), welche IL6R α , gp130, CNTFR α , aber nicht LIFR β exprimiert. Serumausgezehrte PC12D-Zellen wurden + IL-6 (50 ng/ml) in Gegenwart oder Abwesenheit von CNTF inkubiert, wie angegeben. Einige Platten erhielten auch lösliches IL6R α (1 mg/ml) oder lösliches CNTFR α (1 mg/ml), wie angezeigt. Zelllysate wurden einer Immunpräzipitation mit Anti-gp130 unterzogen und mit Anti-Phosphotyrosin immunoblotet. Die Tyrosin-Phosphorylierung von gp130 ist kennzeichnend für die IL-6-induzierte Aktivierung des IL-6-Rezeptorsystems, welche nach Co-Zugabe von CNTF blockiert wird.

[0021] [Fig. 3:](#) Scatchard-Analyse der Bindung von iodiertem CNTF auf PC12D-Zellen. PC12D-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen an iodiertem CNTF in Gegenwart oder Abwesenheit von überschüssigem nicht-radioaktiven Kompetitor inkubiert, um die spezifische Bindung zu bestimmen. Die Figur zeigt einen Scatchard-Plot der Menge an spezifisch gebundenem, iodierten CNTF und gibt Daten an, konsistent mit zwei Bindungsstellen mit Dissoziationskonstanten von 9 pM und 3,4 nM.

[0022] [Fig. 4.](#) Die Aminosäuresequenz von humanem gp130-Fc-His₆. Die Aminosäuren 1 bis 619 sind von humanem gp130 (Hibi et al., Cell 63: 1149–1157 (1990)). Es ist zu bemerken, dass die Aminosäure Nummer

2 von einem Leu zu einem Val verändert wurde, um eine Kozak-Sequenz in der codierenden DNA-Sequenz aufzunehmen. Das Signalpeptid von gp130-Fc-His₆ ist in Kursivdruck dargestellt worden (Aminosäuren 1 bis 22). Die Ser-Gly-Brücke wird in Fettdruck gezeigt (Aminosäuren 620, 621). Die Aminosäuren 662 bis 853 sind aus der Fc-Domäne von humanem IgG1 (Lewis et al., J. Immunol. 151: 2829–2838 (1993)). (†) markieren die zwei Cysteine (Aminosäuren Nummer 632 und 635) des IgG-Gelenks, welches dem Fc vorausgeht, welche die Zwischen-Ketten-Disulfidbrücken bilden, welche zwei FC-Domänen verknüpfen. Das Hexahistidin-Tag wird in Fettdruck/Kursivdruck-Lettern gezeigt (Aminosäuren 854 bis 859). (•) zeigt die Position des STOP-Codons.

[0023] [Fig. 5](#): Die Aminosäuresequenz von humanem IL6Ra-FC. Schlüssel: Die Aminosäuren 1 bis 358 sind aus humanem IL-6Ra (Yamasaki et al., Science 241: 825–828 (1988)). Es ist zu bemerken, dass die Aminosäure Nummer 2 von einem Leu zu einem Val geändert wurde, um eine Kozak-Sequenz in der codierenden DNA-Sequenz aufzunehmen. Das Signalpeptid von IL-6Ra-FC ist in Kursivdruck dargestellt worden (Aminosäuren 1–19). Die Ala-Gly-Brücke ist in Fettdruck gezeigt (Aminosäuren 359, 360). Die Aminosäuren 361 bis 592 sind aus der Fc-Domäne von humanem IgG1 (Lewis et al., J. Immunol. 151: 2829–2838 (1993)). (†) markieren die zwei Cysteine (Aminosäuren Nummer 371 und 374) des IgG-Gelenks, welches dem Fc vorausgeht, welche die Zwischenketten-Disulfidbrücken bilden, welche zwei Fc-Domänen verknüpfen. (•) zeigt die Position des STOP-Codons.

[0024] [Fig. 6](#): Das CNTF/IL-6/IL-11-Rezeptorsystem. Die geordnete Bildung des hexameren signaltransduzierenden Rezeptorkomplexes ist schematisch dargestellt. Das Cytokin assoziiert mit der Ra-Komponente unter Bildung eines obligatorischen Cytokin-Ra-Komplexes (Kd beläuft sich auf etwa 5 nM). Dieser Niederaffinitäts-Komplex assoziiert als Nächstes mit der ersten signaltransduzierenden Komponente, gekennzeichnet als β1, unter Bildung eines Hochaffinitäts-Cytokin-Ra·β1-Komplexes (Kd beträgt etwa 10 pM). Im Falle von IL-6Ra ist diese Komponente gp130. Dieser trimere Hochaffinitäts-Komplex assoziiert nachfolgend mit einem anderen derartigen Komplex. Die Bildung dieses Komplexes führt zu Signaltransduktion, zumal sie die Dimerisierung von zwei signaltransduzierenden Komponenten beinhaltet, welche als β1 bzw. β2 gekennzeichnet sind (adaptiert aus (Ward et al., J. Bio. Chem. 269: 23286–23289 (1994); Stahl und Yancopoulos, J. Neurobiology 25: 1454–1466 (1994); Stahl und Yancopoulos, Cell 74: 587–590 (1993))).

[0025] [Fig. 7](#): Entwurf von heterodimeren, Rezeptor-basierenden Ligandenfallen für IL-6. Die heterodimere Ligandenfalle besteht aus zwei Interdisulfid-verknüpften Proteinen, gp130-Fc und IL-6Ra-Fc. Der gp130-Fc·IL-6Ra-Fc-Komplex (obere Tafel) ahmt nachgewiesenermaßen den Hochaffinitäts-Cytokin-Ra·β1-Komplex (untere Tafel) nach. Die Ligandenfalle wirkt als ein Antagonist, indem sie IL-6 maskiert und es somit für eine Wechselwirkung mit den nativen Rezeptoren auf IL-6-responsiven Zellen unverfügbar macht.

[0026] [Fig. 8](#): Heteromere Immunglobulin-Schwer/Leichtketten-Rezeptor-Fusionen. Ein Beispiel eines Schwer/Leichtkette-Rezeptor-Fusionsmoleküls wird schematisch dargestellt. Die extrazelluläre Domäne von gp130 ist an Cy fusioniert, wohingegen die extrazelluläre Domäne von IL-6Ra an die konstante Region der Kappa-Kette (κ) fusioniert ist. Die Zwischen-Ketten-Disulfidbrücken sind ebenfalls abgebildet (S-S).

[0027] [Fig. 9](#): Aminosäuresequenz von gp130-Cy1. Schlüssel: Die Aminosäuren 1 bis 619 sind aus humanem gp130 (Hibi et al., Cell 63: 1149–1157 (1990)). Die Ser-Gly-Brücke ist in Fettdruck gezeigt. Die Aminosäuren 662 bis 651 stammen aus der konstanten Region von humanem IgG1 (Lewis et al. J. Immunol. 151: 2829–2838 (1993)). (*) zeigt die Position des STOP-Codons.

[0028] [Fig. 10](#): Aminosäuresequenz von gp130Δ3fibro. Schlüssel: Aminosäuren 1 bis 330 stammen aus humanem gp130 (Hibi et al., Cell 63: 1149–1157 (1990)). Sonstige Symbole sind wie in [Fig. 9](#) beschrieben.

[0029] [Fig. 11](#): Aminosäuresequenz von J-CH1. Schlüssel: Die Ser-Gly-Brücke ist in Fettdruck gezeigt, das J-Peptid ist in Kursivdruck gezeigt, die C_H1-Domäne ist unterstrichen.

[0030] [Fig. 12](#): Aminosäuresequenz von Cy4. Schlüssel: Die Ser-Gly-Brücke ist in Fettdruck gezeigt. Die Aminosäuren 2 bis 239 umfassen die Cy4-Sequenz.

[0031] [Fig. 13](#): Aminosäuresequenz der κ-Domäne. Schlüssel: Die Ser-Gly-Brücke ist in Fettdruck gezeigt. Die Aminosäuren 2 bis 108 umfassen die κ-Domäne. Das C-terminale Cystein (Aminosäure 108) ist dasjenige, welches an der Disulfidbindung der κ-Domäne mit der C_H1-Domäne von Cy beteiligt ist.

[0032] [Fig. 14](#): Aminosäuresequenz der λ-Domäne. Schlüssel: Die Ser-Gly-Brücke ist in Fettdruck gezeigt. Die Aminosäuren 2 bis 106 umfassen die λ-Domäne (Cheung et al., J. Virol. 66: 6714–6720 (1992)). Das C-ter-

minate Cystein (Aminosäure 106) ist dasjenige, welches an der Disulfidbindung der λ -Domäne mit der C_{H_1} -Domäne von Cy beteiligt ist.

[0033] [Fig. 15](#): Aminosäuresequenz der löslichen IL-6R α -Domäne. Schlüssel: Die Aminosäuren 1 bis 358 umfassen die lösliche IL-6R α -Domäne (Yamasaki et al., Science 241: 825–828 (1988)). Die Ala-Gly-Brücke ist in Fettdruck gezeigt.

[0034] [Fig. 16](#): Aminosäuresequenz der löslichen IL-6R α 313-Domäne: Schlüssel: Die Aminosäuren 1 bis 313 umfassen die trunkierte IL6R α -Domäne (IL-6R α 313). Die Thr-Gly-Brücke ist in Fettdruck gezeigt.

[0035] [Fig. 17](#): Reinigung von gp130-Cy1·IL-6R α -k. 4 %iges bis 12 %iges SDS-PAGE-Gradientengel, welches unter nichtreduzierenden Bedingungen laufen gelassen wurde. Die Proteine wurden durch Färbung mit Silber sichtbar gemacht. Spur 1: ungefähr 100 ng Material, gereinigt über Protein-A-Sepharose (Pharmacia). Spur 2: Molekulargrößen-Standards (Amersham). Spur 3: Das hier gezeigte Protein A-gereinigte Material nach weiterer Reinigung über einen IL-6-Affinitätschromatographie-Schritt. Die Positionen des gp130-Cy1-Dimers [(gp130-Cy1)₂], des gp130-Cy1-Dimers, assoziiert mit einem IL-6R α -k[(gp130-Cy1)₂·(IL-6R α -k)₁], und des gp130-Cy1-Dimers, assoziiert mit zwei IL-6R α -k[(gp130-Cy1)₂·(IL-6R α -k)₂] sind gezeigt, ebenso wie die Größen für die Molekulargrößen-Standards in Kilodalton (200, 100 und 46).

[0036] [Fig. 18](#): IL-6 dissoziiert langsam aus der Ligandenfalle. Die Dissoziationsgeschwindigkeit von IL-6 aus einer Schwer/Leichtketten-Rezeptor-basierenden Ligandenfalle (gp130-Cy1·IL-6R α -k) wurde mit derjenigen verglichen, erhalten mit dem neutralisierenden monoklonalen Antikörper B-E8 (BE8-MAb).

[0037] [Fig. 19](#): IL-6 kann Multimerisierung der Ligandenfalle induzieren. (A) Zwei unterschiedliche Liganden-fallen sind schematisch abgebildet und gemäß ihrer Fähigkeit, Protein A zu binden, aufgelistet. gp130-Fc·IL-6R α -Fc(GF6F) bindet Protein A über seine Fc-Domänen, wohingegen gp130-C H_1 ·IL-6R α -k(G16K) nicht an Protein A bindet. (B) Anti-Kappa-Western-Blotting von Proteinen, präzipitiert mit Protein A-Sepharose aus Mischungen von GF6F ± IL-6, G16K ± IL-6 oder GF6F plus G16K ± IL-6, wie gekennzeichnet.

[0038] [Fig. 20](#): Inhibition von IL-6-abhängiger XG-1-Zellproliferation. XG-1-Zellen [Zhang et al., Blood 83: 3654–3663 (1994)] wurden für einen Proliferationsassay durch Auszehrung der Zellen bezüglich IL-6 während 5 Stunden vorbereitet. Die Assays wurden in 96-Vertiefungs-Gewebekulturschalen in RPMI + 10 % fötales Kälberserum + Penicillin/Streptomycin + 0,050 nM 2-Mercaptoethanol + Glutamin angesetzt. 0,1 ml dieses Mediums wurde pro Vertiefung verwendet. Die Zellen wurden bei einer Dichte von 250000 pro ml beim Start des Assays suspendiert. 72 Stunden nach Zugabe von IL-6 ± Liganden-Fallen oder Antikörpern wurde ein MTT-Assay durchgeführt, wie beschrieben (Panayotatos et al., Biochemistry 33: 5813–5818 (1994)). Die unterschiedlichen verwendeten Ligandenfallen sind aufgelistet.

[0039] [Fig. 21A–Fig. 21D](#): Nukleotidsequenz, codierend für, und abgeleitete Aminosäuresequenz des als 424 bezeichneten Fusionspolypeptids, das zur Bindung des Cytokins IL-4 unter Bildung eines nichtfunktionalen Komplexes in der Lage ist.

[0040] [Fig. 22A–Fig. 22D](#): Nukleotidsequenz, codierend, und abgeleitete Aminosäuresequenz des als 603 bezeichneten Fusionspolypeptids, welches zur Bindung des Cytokins IL-4 unter Bildung eines nichtfunktionalen Komplexes in der Lage ist.

[0041] [Fig. 23A–Fig. 23D](#): Nukleotidsequenz, codierend, und abgeleitete Aminosäuresequenz des als 622 bezeichneten Fusionspolypeptids, welches zur Bindung des Cytokins IL-4 unter Bildung eines nichtfunktionalen Komplexes in der Lage ist.

[0042] [Fig. 24A–Fig. 24F](#): Nukleotidsequenz, codierend, und abgeleitete Aminosäuresequenz des als 412 bezeichneten Fusionspolypeptids, welches zur Bindung des Cytokins IL-6 unter Bildung eines nichtfunktionalen Komplexes in der Lage ist.

[0043] [Fig. 25A–Fig. 25F](#): Nukleotidsequenz, codierend, und abgeleitete Aminosäuresequenz des als 616 bezeichneten Fusionspolypeptids, welches zur Bindung des Cytokins IL-6 unter Bildung eines nichtfunktionalen Komplexes in der Lage ist.

[0044] [Fig. 26](#): Nicht vorhanden.

[0045] [Fig. 27](#): Zeigt, dass eine als 4SC375 bezeichnete IL-4-Falle, welche ein Fusionspolypeptid von IL-2R γ -scb-IL4R α -Fc Δ C1 ist, als ein IL-4-Antagonist um mehrere Größenordnungen besser als IL4R α Fc Δ C1 allein im TF1-Zell-Bioassay ist.

[0046] [Fig. 28](#): Zeigt, dass eine als 4SC375 bezeichnete IL-4-Falle, antagonistische Aktivität im TF1-Zell-Bioassay aufzeigt, äquivalent zu einer IL-4-Falle, bezeichnet als 4SC424 (beschrieben in [Fig. 21A–Fig. 21D](#)), welche ein Fusionspolypeptid von IL-2R γ -IL4R α -Fc Δ C1 ist, bei welcher die IL-2R γ -Komponente fluchtend bzw. bündig mit der IL-4R α -Komponente ist.

[0047] [Fig. 29](#): Diese zeigt, dass die IL6-Falle (6SC412 IL6R-scb-gpx-Fc Δ C1), welche in [Fig. 24A–Fig. 24F](#) beschrieben wird, ein besserer Antagonist von IL-6 im XG1-Bioassay ist als der neutralisierende monoklonale Antikörper gegen humanes IL-6-BE8.

[0048] [Fig. 30](#): Nicht vorhanden.

[0049] [Fig. 31A–Fig. 31G](#): Die Nukleotid- und codierte Aminosäuresequenz des IL-4R α .IL-13R α 1.Fc-Einzelketten-Fallenkonstrukt wird dargestellt.

[0050] [Fig. 32A–Fig. 32G](#): Die Nukleotid- und codierte Aminosäuresequenz des IL-13R α 1.IL-4R α .Fc-Einzelketten-Fallenkonstrukt wird dargestellt.

[0051] [Fig. 33](#): Blockierung von IL-13 durch IL-4R α .IL-13R α 1.Fc und IL-13R α 1.IL-4R α Fc. Die Zugabe von entweder IL-4R α .IL-13R α 1.Fc- oder IL-13R α 1.IL-4R α .Fc-Falle bei einer Konzentration von 10 nM blockiert IL-13-induziertes Wachstum bis zu ~ 2 nM. Bei einer IL-13-Konzentration von ~ 4–5 nM wird das Wachstum von TF1-Zellen um 50 % inhibiert.

[0052] [Fig. 34](#): Blockierung von IL-4 durch IL-4R α .IL-13R α 1.Fc und IL-13R α 1.IL-4R α Fc. Die Zugabe von entweder IL-4R α .IL-13R α 1.Fc- oder IL-13R α 1.IL-4R α .Fc-Falle bei einer Konzentration von 10 nm blockiert IL-4-induziertes Wachstum bis zu ~ 1 nM.

[0053] Bei einer IL-4-Konzentration von ~ 3–4 nM wird das Wachstum von TF1-Zellen um 50 % inhibiert.

[0054] [Fig. 35](#): Humane IL-1-Falle blockiert die in vivo-Effekte von exogen verabreichtem hull-1. BALB/c-Mäuse erhielten eine subkutane Injektion von hull-1 (0,3 µg/kg) zur Zeit 0. Vierundzwanzig Stunden vor der hull-1-Injektion wurden die Tiere vorbehandelt mit entweder Vehikel oder einem 150-fachen molaren Überschuss von hull-1-Falle. Zwei Stunden vor der Tötung (26 Stunden) wurden die Mäuse erneut mit einer zweiten Injektion von hull-1 (0,3 µg/kg, s.c.) herausgefordert. Blutproben wurden an verschiedenen Zeitpunkten gesammelt, und Seren wurden hinsichtlich IL-1-Spiegeln geassayt (ausgedrückt als Mittelwert +/- Standardabweichung bzw. SEM; n = 5 je Gruppe).

[0055] [Fig. 36A](#) & [Fig. 36B](#): Humane IL-4-Falle antagonisiert die Effekte von humanem IL-4 in Affen. [Fig. 36A](#): Cynomologus-Affen bzw. Makaken wurden in drei Teilen behandelt, wie angegeben. Humanes IL-4 (25 µg/kg) wurde zweimal täglich während 4 Tagen subkutan injiziert, und humane IL-4-Falle (8 mg/ml) und Vehikel wurden intravenös täglich während 5 Tagen gegeben, beginnend 1 Tag vor der Verabreichung von humanem IL-4. Plasma wurde täglich abgenommen und hinsichtlich MCP-1-Spiegeln geassayt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert +/- SEM ausgedrückt; n = 4. (ANOVA p < 0,0007; Tukey-Kramer: Teil 2 gegenüber Teil 1, p, 0,05; Teil 2 gegen Teil 3, p, 0,05; Teil 1 gegen Teil 3, nicht signifikant). [Fig. 36B](#): Cynomologus-Affen wurden in drei Teilen behandelt, wie angegeben. Humanes IL-4 (25 µg/kg) wurde subkutan zweimal täglich während 4 Tagen injiziert, und humane IL-4-Falle (8 mg/ml) und Vehikel wurden intravenös täglich während 5 Tagen gegeben, beginnend 1 Tag vor der Verabreichung von humanem IL-4. Gesamtblut wurde täglich für eine Flusszytometrie-Analyse hinsichtlich CD16 abgenommen. Die Ergebnisse wurden ausgedrückt als Mittelwert +/- SEM; n = 4. (ANOVA p < 0,042; Tukey-Kramer: Teil 2 gegen Teil 1, p < 0,05; Teil 2 gegen Teil 3 und Teil 1 gegen Teil 3, nicht signifikant).

[0056] [Fig. 37](#): Murine bzw. Maus-IL-4-Falle verhinderte teilweise eine IL-4-vermittelte IgE-Erhöhung in Mäusen. BALB/C-Mäuse, injektionsbehandelt mit Anti-Maus-IgD (100 µl/Maus, s.c.), wurden statistisch in 3 Gruppen unterteilt, jede erhielt (an den Tagen 3–5) entweder Vehikel, Maus-IL-4-Falle (1 mg/kg, s.c.) oder einen monoklonalen Antikörper gegen Maus-IL-4 (1 mg/kg, s.c.). Die Seren wurden an verschiedenen Zeitpunkten abgenommen und hinsichtlich IgE-Spiegeln geassayt. Die Ergebnisse wurden ausgedrückt als Mittelwert +/- SEM (n = 5 je Gruppe). (ANOVA p = 0,0002; Tukey-Kramer: Vehikel gegen IL-4-Falle, p < 0,01; Vehikel gegen

IL-4-Antikörper, $p < 0,001$; IL-4-Falle gegen IL-4-Antikörper, nicht signifikant).

AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0057] Die vorliegende Erfindung stellt ein isoliertes Nukleinsäuremolekül bereit, welches ein Fusionspolypeptid codiert, wobei das Fusionspolypeptid die folgenden Fusionspolypeptidkomponenten umfasst:

- (a) ein Cytokin-Bindungsteil der extrazellulären Domäne der Spezifität-bestimmenden Komponente eines Cytokin-Rezeptors;
- (b) ein Cytokin-Bindungsteil einer extrazellulären Domäne der signaltransduzierenden Komponente eines Cytokin-Rezeptors; und
- (c) eine Multimerisierungs-Komponente;

wobei die Multimerisierungs-Komponente (c) mit einer Multimerisierungs-Komponente (c), welche in einem anderen der Fusionspolypeptide vorhanden ist, multimerisiert, wodurch ein Multimer der Fusionspolypeptide gebildet wird;

wobei das Multimer an ein Cytokin bindet und es einfängt und somit als ein Antagonist des Cytokins wirkt; und wobei das Cytokin aus Interleukin-4 (IL-4), Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-13 (IL-13) gewählt wird.

[0058] Mit "Cytokin-Bindungsteil" wird der minimale Abschnitt der extrazellulären Domäne gemeint, der zum Binden des Cytokins notwendig ist. Vom Fachmann auf dem Gebiet wird es anerkannt, dass ein definierendes Merkmal eines Cytokin-Rezeptors die Gegenwart der zwei Fibronectin-ähnlichen Domänen, welche kanonische Cysteine enthalten, und der WSXWS-Box ist (Bazan, J. F., 1990, PNAS 87: 6934–6938). Sequenzen, welche die extrazellulären Domänen der Bindungskomponente des Rezeptors des Cytokins und der signaltransduzierenden Komponente des Cytokin-Rezeptors codieren, können auch verwendet werden, um das Fusionspolypeptid der Erfindung zu erzeugen. In ähnlicher Weise können längere Sequenzen, welche größere Teile der Komponenten des Cytokin-Rezeptors codieren, verwendet werden. Es wird jedoch in Betracht gezogen, dass kleinere Fragmente als die extrazelluläre Domäne funktionieren werden, um das Cytokin zu binden, und deshalb zieht die Erfindung Fusionspolypeptide in Betracht, welche den minimalen Abschnitt bzw. Teil der extrazellulären Domäne, notwendig zum Binden des Cytokins, als den Cytokin-Bindungsteil umfassen.

[0059] Die Erfindung umfasst eine "Spezifität-bestimmende Komponente" eines Cytokin-Rezeptors und eine "signaltransduzierende Komponente" des Cytokin-Rezeptors. Ungeachtet der Nomenklatur, welche verwendet wird, um eine jeweilige Komponente oder Untereinheit eines Cytokin-Rezeptors zu bezeichnen, wird der Fachmann auf dem Gebiet erkennen, welche Komponente oder Untereinheit eines Rezeptors für die Bestimmung des zellulären Ziels des Cytokins verantwortlich ist, und wird daher wissen, welche Komponente die "Spezifität-bestimmende Komponente" ausmacht.

[0060] In ähnlicher Weise wird der Fachmann auf dem Gebiet, ungeachtet der verwendeten Nomenklatur, wissen, welche Komponente oder Untereinheit eines Rezeptors die "signaltransduzierende Komponente" ausmachen wird. Wie hierin verwendet, ist die "signaltransduzierende Komponente" eine Komponente des nativen Rezeptors, welche nicht die Spezifität-bestimmende Komponente ist, und welche das Cytokin in Abwesenheit der Spezifität-bestimmenden Komponente nicht bindet oder schwach bindet. Im nativen Rezeptor kann die "signaltransduzierende Komponente" an der Signalleitung beteiligt sein.

[0061] Während manche Cytokin-Rezeptoren Komponenten aufweisen, welche als α und β bezeichnet werden, besitzt der IL-4-Rezeptor zum Beispiel eine signaltransduzierende Komponente, welche als IL-2R γ bezeichnet wird. Ungeachtet dessen, welcher Name mit dieser Komponente assoziiert ist, wird der Fachmann auf dem Gebiet wissen, welche Komponente des IL-4-Rezeptors die signaltransduzierende Komponente ist. Somit wird der Fachmann auf dem Gebiet, um die vorliegende Erfindung auszuführen und eine Hochaffinitäts-Falle für IL-4 zu erzeugen, eine isolierte Nukleinsäure erzeugen, welche eine Nukleotidsequenz, die eine erste Fusionspolypeptidkomponente, umfassend die Aminosäuresequenz des Cytokin-Bindungsteils der extrazellulären Domäne der Spezifität-bestimmenden Komponente des IL-4-Rezeptors (IL-4R α), codiert; eine Nukleotidsequenz, welche eine zweite Fusionspolypeptidkomponente, umfassend die Aminosäuresequenz des Cytokin-Bindungsteils der extrazellulären Domäne der signaltransduzierenden Komponente des IL-4-Rezeptors (IL-2R γ), codiert; und eine Nukleotidsequenz, welche eine dritte Fusionspolypeptidkomponente, umfassend die Aminosäuresequenz einer Multimerisierungs-Komponente (zum Beispiel eine Fc-Domäne von IgG), codiert, umfasst, um eine Hochaffinitäts-Falle für IL-4 zu erzeugen.

[0062] Einige weitere Beispiele der Rezeptorkomponenten, welche verwendet werden können, um Cytokin-Antagonisten, einschließlich IL-4-Antagonisten, gemäß der Erfindung herzustellen, sind in der Tabelle 1

dargestellt. Die Tabelle 1 stellt, in der Weise eines Beispiels, aber nicht zur Einschränkung, einiges der mannigfaltigen Nomenklatur dar, die in der wissenschaftlichen Literatur verwendet wird, um diejenigen Komponenten, welche als Spezifität-bestimmende Komponenten fungieren, und diejenigen, welche als signaltransduzierende Komponenten von gewissen Cytokin-Rezeptoren fungieren, zu beschreiben.

TABELLE 1

<u>Cytokin</u>	<u>Spezifität-bestimmende Komponente</u>	<u>signaltransduzierende Komponente</u>
Interleukin-1 (IL-1)	Typ I IL-1R (Ref. 8)	IL-1R AcP (Refs. 8, 11)
	Typ II IL-1R (Ref. 8)	
	IL-1RI (Ref. 11)	
	IL-1RII (Ref. 11)	
Interleukin-2 (IL-2)	α -Untereinheit (Ref. 2)	β -Kette (Ref. 3)
	α -Kette (Ref. 3)	β -Untereinheit (Ref. 2)
	IL-2R α (Ref. 1)	γ -Kette (Ref. 3)
		IL-2R β (Refs. 1, 10)
Interleukin-3 (IL-3)	IL-3R α (Ref. 1)	β_c (Ref. 1)
	α -Untereinheit (Ref. 2)	β -Untereinheit (Ref. 2)
	α -Rezeptorkomponente (Ref. 5)	β -Kette (Ref. 3)
		β -Rezeptorkomponente (Ref. 5)
Interleukin-4 (IL-4)	IL-4R (Ref. 1)	γ -Kette (Ref. 3)
		IL-2R γ (Ref. 1)
Interleukin-5 (IL-5)	IL-5R α (Ref. 1)	β_c (Ref. 1)
	α -Untereinheit (Ref. 2)	β -Untereinheit (Ref. 2)
	α -Rezeptorkomponente (Ref. 5)	β -Kette (Ref. 3)
		β -Rezeptorkomponente (Ref. 5)

TABELLE 1 (Fortsetzung)

<u>Cytokin</u>	<u>Spezifität-bestimmende Komponente</u>	<u>signaltransduzierende Komponente</u>
Granulocyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF)	α -Rezeptorkomponente (Ref. 5) α -Untereinheit (Ref. 2) GMR α (Refs. 1, 2)	β -Rezeptorkomponente (Ref. 5) β -Untereinheit (Ref. 2) β -Kette (Ref. 3) β_c (Ref. 1) GMR β (Refs. 1, 2)
Leukämie-inhibitorischer Faktor (LIF)	LIFBP (Ref. 1) α -Rezeptorkomponente (Ref. 5)	gp130 (Refs. 1, 3) β -Rezeptorkomponente (Ref. 5)
Interleukin-11 (IL-11)	α -Kette (Ref. 4) NR1 (Ref. 4)	gp130 (Ref. 4)
Interleukin-15 (IL-15)	IL-15R α (Ref. 10)	IL-2R β (Ref. 10) IL-2R γ (Ref. 10)
Interferon- γ (IFN γ)	IFN- γ R (Ref. 7) IFN- γ R1 (Ref. 7)	AF-1 (Ref. 7) IFN- γ R2 (Ref. 7)
TGF β	Typ II (Refs. 6, 9)	Type I (Refs. 6, 9)

[0063] Nur wenige von der Vielzahl von Literaturbezugsstellen sind in der Tabelle 1 zitiert, und sie werden wie folgend dargestellt:

1. Sato und Miyajima, Current Opinions in Cell Biology 6:174–179 (1994) – Siehe Seite 176, Zeilen 9–16;
2. Miyajima et al., Annual Review of Immunology 10: 295–331 (1992) – Siehe Seite 295, Zeile 4 bis Seite 296, Zeile 1; Seite 305, letzter Absatz;
3. Kondo et al., Science 262: 1874–1877 (1993) – Siehe Seite 1874, Spalten 1 & 2;
4. Hilton et al., EMBO Journal 13: 4765–4775 (1994) – Siehe Seite 4766, Spalte 1, Zeilen 20–24;
5. Stahl und Yancopoulos, Cell 74: 587–590 (1993) – Siehe Seite 587, Spalte 2, Zeilen 15–22;
6. Bassing et al., Journal of Biological Chemistry 269:14861–14864 (1994) – Siehe Seite 14861, Spalte 2, Zeilen 1–9 und 21–28;
7. Kotenko et al., Journal of Biological Science 270: 20915–20921 (1995) – Siehe Seite 20915, Zeilen 1–5 der Zusammenfassung;
8. 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;
9. Lebrun und Vale, Molecular Cell Biology 17: 1682–1691 (1997) – Siehe Seite 1682, Zusammenfassung, Zeilen 2–6;
10. Kennedy und Park, Journal of Clinical Immunology 16: 134–143 (1996) – Siehe Seite 134, Zeilen 1–7 der Zusammenfassung; Seite 136, Spalte 2, Zeilen 1–5;
11. Wesche, et al., Journal of Biological Chemistry 272: 7727–7731 (1997) Siehe Seite 7731, Zeilen 20–26.

[0064] Bei der Herstellung der Nukleinsäuresequenz, welche das Fusionspolypeptid der Erfindung codiert, werden die ersten, zweiten und dritten Komponenten des Fusionspolypeptids in einem einzelnen Strang von Nukleotiden codiert, welcher, wenn er von dem Wirt-Vektor-System exprimiert wird, eine monomere Spezies des Fusionspolypeptids herstellt. Die so exprimierten Monomere multimerisieren dann aufgrund der Wechselwirkungen zwischen den Multimerisierungs-Komponenten (den dritten Fusionspolypeptid-Komponenten). Die Herstellung der Fusionspolypeptide auf diese Weise vermeidet die Notwendigkeit für eine Aufreinigung von heterodimeren Mischungen, welche resultieren würde, wenn die ersten und zweiten Komponenten als separate Moleküle herstellt und dann multimerisiert werden würden. Zum Beispiel beschreibt das U.S.-Patent Nr. 5 470 952, erteilt am 28. November 1995, die Herstellung von heterodimeren Proteinen, welche als CNTF- oder IL-6-Antagonisten wirken. Die Heterodimere werden aus Zelllinien gereinigt, welche mit den passenden Alpha (α)- und Beta (β)-Komponenten cotransfiziert wurden. Heterodimere werden dann von Homodimeren getrennt, unter Anwendung von Verfahren, wie passiver Elution aus präparativen, nicht-denaturierenden Polyacrylamidgelen oder durch Verwendung von Hochdruck-Kationenaustausch-Chromatographie. Die Notwendigkeit für

diesen Reinigungsschritt wird durch die Verfahren der vorliegenden Erfindung vermieden.

[0065] Darüber hinaus gibt die internationale PCT-Anmeldung WO 96/11213, veröffentlicht am 18. April 1996, mit dem Titel "Dimere IL-4-Inhibitoren" an, dass der Anmelder Homodimere hergestellt hat, in welchen zwei IL-4-Rezeptoren durch einen polymeren Abstandhalter gebunden sind, und Heterodimere hergestellt hat, in welchen ein IL-4-Rezeptor durch einen polymeren Abstandhalter an eine IL-2-Rezeptor-Gamma-Kette verknüpft ist. Der beschriebene polymere Abstandhalter ist Polyethylenglycol (PEG). Die zwei Rezeptorkomponenten, IL-4R und IL-2R γ , werden separat exprimiert und gereinigt. PEG-ylierte Homodimere und Heterodimere werden dann hergestellt durch Zusammenknüpfen der Komponenten unter Verwendung von bifunktionellen PEG-Reagenzien. Es ist ein Vorteil der vorliegenden Erfindung, dass sie die Notwendigkeit für derartige zeitaufwendige und kostspielige Reinigungs- und PEG-ylierungs-Schritte vermeidet.

[0066] In einer Ausführungsform der Erfindung befindet sich die Nukleotidsequenz, welche die erste Komponente codiert, stromaufwärts der Nukleotidsequenz, welche die zweite Komponente codiert. In einer anderen Ausführungsform der Erfindung befindet sich die Nukleotidsequenz, welche die erste Komponente codiert, stromabwärts der Nukleotidsequenz, welche die zweite Komponente codiert. Weitere Ausführungsformen der Erfindung können hergestellt werden, in welchen die Reihenfolge der ersten, zweiten und dritten Fusionspolypeptidkomponenten umgeordnet wird. Wenn zum Beispiel die Nukleotidsequenz, welche die erste Komponente codiert, als 1 bezeichnet wird, die Nukleotidsequenz, welche die zweite Komponente codiert, als 2 bezeichnet wird, und die Nukleotidsequenz der dritten Komponente als 3 bezeichnet wird, dann kann die Reihenfolge der Komponenten in der isolierten Nukleinsäure der Erfindung, gelesen von 5' nach 3', jedwede der folgenden sechs Kombinationen sein: 1,2,3; 1,3,2; 2,1,3; 2,3,1; 3,1,2 oder 3,2,1.

[0067] In bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung umfasst die Multimerisierungs-Komponente eine Immunglobulin-abgeleitete Domäne. Genauer gesagt, kann die Immunglobulin-abgeleitete Domäne gewählt werden aus der Gruppe, welche aus der Fc-Domäne von IgG, der schweren Kette von IgG und der leichten Kette von IgG besteht. In einer anderen Ausführungsform kann die Multimerisierungs-Komponente eine Fc-Domäne sein, aus welcher die ersten fünf Aminosäuren (einschließlich eines Cysteins) entfernt worden sind, um eine Multimerisierungs-Komponente herzustellen, welche als Fc(Δ C1) bezeichnet wird. Alternativ kann die Multimerisierungs-Komponente eine Fc-Domäne sein, in welcher ein Cystein innerhalb der ersten fünf Aminosäuren durch eine andere Aminosäure substituiert worden ist, wie zum Beispiel Serin oder Alanin.

[0068] Die vorliegende Erfindung sieht des Weiteren Fusionspolypeptide vor, die von den isolierten Nuklein-säuremolekülen der Erfindung codiert werden. Vorzugsweise liegen die Fusionspolypeptide in multimerer Form vor, aufgrund der Funktion der dritten Multimerisierungs-Komponente. In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Multimer ein Dimer. Geeignete Multimerisierungs-Komponenten sind Sequenzen, welche eine Immunglobulin-Schwerketten-Gelenkregion codieren (Takahashi et al., 1982, Cell 29: 671–679); Immunglobulin-Gensequenzen und Abschnitte davon. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden Immunglobulin-Gensequenzen, speziell eine solche, welche die Fc-Domäne codiert, verwendet, um die dritte Multimerisierungs-Komponente zu codieren.

[0069] Die vorliegende Erfindung zieht auch einen Vektor in Betracht, welcher das Nukleinsäuremolekül der Erfindung, wie hierin beschrieben, umfasst.

[0070] Ebenfalls vorgesehen wird ein Expressionsvektor, umfassend ein Nukleinsäuremolekül der Erfindung, wie hierin beschrieben, wobei das Nukleinsäuremolekül funktionsfähig an eine Expressionskontrollsequenz gebunden ist. Ebenfalls vorgesehen wird ein Wirt-Vektor-System für die Herstellung eines Fusionspolypeptids, welches den Expressionsvektor der Erfindung umfasst, welcher in eine Wirtszelle eingeführt worden ist, die geeignet für die Expression des Fusionspolypeptids ist. Die geeignete Wirtszelle kann eine bakterielle Zelle, wie *E. coli*, eine Hefezelle, wie *Pichia pastoris*, eine Insektenzelle, wie *Spodoptera frugiperda*, oder eine Säuerzelle, wie COS, CHO, 293, BHK- oder NSO-Zelle, sein.

[0071] Die vorliegende Erfindung stellt ebenfalls Verfahren zur Herstellung der Fusionspolypeptide der Erfindung durch Wachsenlassen von Zellen des Wirt-Vektor-Systems, welches hierin beschrieben wurde, unter Bedingungen, welche die Herstellung des Fusionspolypeptids und die Gewinnung des so hergestellten Fusionspolypeptids erlauben, bereit.

[0072] Die vorliegende Erfindung sieht neue Antagonisten vor, welche auf Rezeptorkomponenten basieren, die Cytokinen, wie der CNTF-Familie von Cytokinen, gemeinsam sind.

[0073] Die hierin beschriebene Erfindung schließt die Herstellung von Antagonisten gegen IL-6 ein. IL-6 verwendet eine α -Spezifitätsbestimmungs-Komponente, welche, wenn sie mit dem Cytokin kombiniert wird, an eine erste β -Signaltransduzierungs-Komponente unter Bildung eines nichtfunktionalen Intermediats bindet, welches dann an eine zweite β -Signaltransduzierungs-Komponente bindet, was eine β -Rezeptor-Dimerisierung und anschließende Signaltransduktion verursacht. Gemäß der Erfindung werden die lösliche α -Spezifitätsbestimmungs-Komponente des Rezeptors ($sR\alpha$) und die extrazelluläre Domäne der ersten β -Signaltransduzierungs-Komponente des Cytokin-Rezeptors ($\beta 1$) kombiniert, um Heterodimere ($sR\alpha:\beta 1$) zu formen, welche als Antagonisten zu dem Cytokin wirken, indem das Cytokin unter Bildung eines nichtfunktionellen Komplexes gebunden wird.

[0074] Wie beschrieben in Beispiel 1, ist CNTF und IL-6 die $\beta 1$ -Rezeptorkomponente gp130 gemeinsam. Die Tatsache, dass CNTF ein Intermediat mit CNTFR α und gp130 bildet, kann demonstriert werden (Beispiel 1) in Zellen, denen LIFR β fehlt, wobei der Komplex von CNTF und CNTFR α gp130 bindet und Homodimerisierung von gp130 durch IL-6 und IL-6R α verhindert, wodurch eine Signaltransduktion blockiert wird. Diese Untersuchungen liefern die Grundlage für die Entwicklung der hierin beschriebenen IL-6-Antagonisten, da sie zeigen, dass, wenn, in Gegenwart eines Liganden, ein nichtfunktioneller Intermediatkomplex, bestehend aus dem Liganden, seiner α -Rezeptorkomponente und seiner $\beta 1$ -Rezeptorkomponente, gebildet werden kann, dieser effektiv die Wirkung des Liganden blockieren wird. Andere Cytokine können andere $\beta 1$ -Rezeptorkomponenten, wie LIFR β , verwenden.

[0075] So bestehen zum Beispiel, in einer Ausführungsform der Erfindung, effektive Antagonisten von IL-6 aus Heterodimeren der extrazellulären Domänen der α -Spezifitätbestimmungs-Komponenten des Rezeptors ($sIL-6R\alpha$) und der extrazellulären Domäne von gp130. Das resultierende Heterodimer, welches hierin nachstehend als $sIL-6R\alpha:\beta 1$ bezeichnet wird, wirkt als eine Hochaffinitäts-Falle für IL-6, wodurch das Cytokin unzugänglich gemacht wird für die Bildung eines signaltransduzierendes Komplexes mit den nativen membrangebundenen Formen ihrer Rezeptoren.

[0076] Obwohl lösliche Liganden-Bindungsdomänen aus dem extrazellulären Bereich von Rezeptoren sich als einigermaßen wirksam als Fallen für ihre Liganden erwiesen haben und somit als Antagonisten wirken [Bargetzi et al., Cancer Res. 53: 4010–4013 (1993); et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 8616–8620 (1992); Mohler et al., J. Immunol. 151: 1548–1561 (1993); Narasaki et al., Blood 82: 1120–1126 (1993)], sind die IL-6- und CNTF-Rezeptoren dahingehend ungewöhnlich, weil die α -Rezeptorkomponenten Ligandenbindungsdomänen darstellen, welche in Verbindung mit ihren Liganden in der löslichen Form effektiv als Rezeptor-Agonisten fungieren [Davis et al., Science 259: 1736–1739 (1993); Taga et al., Cell 58: 573–581 (1989)]. Die gemäß der vorliegenden Erfindung hergestellten $sR\alpha:\beta 1$ -Heterodimere stellen effektive Fallen für ihre Liganden bereit, wobei sie diese Liganden mit Affinitäten im Picomolar-Bereich (basierend auf Bindungsuntersuchungen für CNTF an PC12D-Zellen) binden, ohne funktionelle Intermediate zu erzeugen. Die hierin beschriebene Technologie kann eingesetzt werden, um eine Cytokin-Falle für jedwedes Cytokin zu entwickeln, welche eine α -Komponente, die Spezifität vermittelt, sowie eine β -Komponente, welche, wenn sie an die α -Spezifitätsskomponente gebunden wird, eine höhere Affinität für das Cytokin als jede Komponente allein aufweist, benutzt.

[0077] Die extrazellulären α - und β -Rezeptordomänen können hergestellt werden unter Anwendung von Verfahren, welche dem Fachmann auf dem Gebiet bekannt sind. Der CNTFR α -Rezeptor ist kloniert, sequenziert und exprimiert worden [Davis et al., (1991) Science 253: 59–63]. Die Klonierung von LIFR β und gp130 wird beschrieben in Gearing et al., in EMBO J. 10: 2839–2848 (1991), Hibi et al., Cell 63: 1149–1157 (1990), und in der veröffentlichten PCT-Anmeldung WO 93/10151, welche am 27. Mai 1993 veröffentlicht wurde.

[0078] Die Rezeptormoleküle, welche nützlich zur Ausführung der vorliegenden Erfindung sind, können hergestellt werden durch Klonierung und Expression in einem prokaryotischen oder eukaryotischen Expressionsystem. Das rekombinante Rezeptorgen kann unter Anwendung jedweder Anzahl von Verfahren exprimiert und gereinigt werden. Das den Faktor codierende Gen kann in einen bakteriellen Expressionsvektor subkloniert werden, wie zum Beispiel, jedoch nicht zur Einschränkung, pCP110.

[0079] Die rekombinanten Faktoren können durch jedwede Technik gereinigt werden, welche die anschließende Bildung eines stabilen, biologisch aktiven Proteins gestattet. Zum Beispiel, und nicht zur Einschränkung, können die Faktoren aus Zellen entweder als lösliche Proteine oder als Einschlussskörper gewonnen werden, aus welchen sie quantitativ durch 8M Guanidiniumhydrochlorid und Dialyse extrahiert werden können. Um die Faktoren weiter zu reinigen, können herkömmliche Ionenaustausch-Chromatographie, hydrophobe Wechselwirkungs-Chromatographie, Umkehrphasen-Chromatographie oder Gelfiltration angewandt werden.

[0080] Die sRa:β-heterodimeren Rezeptoren können unter Anwendung bekannter Fusionsregionen manipuliert werden, wie beschrieben in der veröffentlichten PCT-Anmeldung WO 93/10151, veröffentlicht am 27. Mai 1993 mit dem Titel "Receptor for Oncostatin M and Leukemia Inhibitory Factor", welche die Herstellung von β-Rezeptor-Heterodimeren beschreibt, oder sie können durch Vernetzen von extrazellulären Domänen durch chemische Methoden hergestellt werden. Die verwendeten Domänen können aus der gesamten extrazellulären Domäne der α- und β-Komponenten bestehen, oder sie können aus Mutanten oder Fragmenten davon bestehen, welche die Fähigkeit beibehalten, einen Komplex mit ihrem Liganden und anderen Komponenten im sRa:β1-Komplex zu bilden. Zum Beispiel, wie nachstehend beschrieben in Beispiel 4, sind IL-6-Antagonisten unter Verwendung von gp130 hergestellt worden, dem seine drei Fibronectin-ähnlichen Domänen fehlten.

[0081] In einer Ausführungsform der Erfindung werden die extrazellulären Domänen unter Verwendung von Leucin-Zippern technisch verändert. Die Leucin-Zipper-Domänen der humanen Transkriptionsfaktoren c-jun und c-fos bilden gezeigtermaßen stabile Heterodimere [Busch und Sassone-Corsi, Trends Genetics 6: 36–40 (1990); Gentz et al., Science 243: 1695–1699 (1989)] mit einer 1:1-Stoichiometrie. Obwohl auch die Bildung von jun-jun-Homodimeren gezeigt worden ist, sind sie etwa 1000-fach weniger stabil als jun-fos-Heterodimere. Fos-fos-Homodimere sind nicht nachgewiesen worden.

[0082] Die Leucin-Zipper-Domäne entweder von c-jun oder c-fos wird/werden im Leseraster an den C-Terminus der löslichen oder extrazellulären Domänen der oben erwähnten Rezeptorkomponenten durch gentechnische Erzeugung von chimären Genen fusioniert. Die Fusionen können direkt sein oder sie können eine flexible Linker-Domäne verwenden, wie die Gelenkregion von humanem IgG, oder Polypeptid-Linker, bestehend aus kleinen Aminosäuren, wie Glycin, Serin, Threonin oder Alanin, bei verschiedenen Längen und Kombinationen. Zusätzlich können die chimären Proteinen durch His-His-His-His-His-His (His6) [SEQ ID NR.: 1] zum Erlauben einer raschen Reinigung durch Metall-Chelat-Chromatographie und/oder durch Epitope, gegen welche Antikörper verfügbar sind, zum Erlauben von Detektion auf Western-Blots, Immunpräzipitation oder Aktivitätsdepletion/Blockierung in Bioassays getagged werden.

[0083] In einer anderen Ausführungsform, wie nachstehend beschrieben in Beispiel 3, wird das sRa:β1-Heterodimer hergestellt unter Anwendung eines ähnlichen Verfahrens, aber unter Verwendung der Fc-Domäne von humanem IgG1 [Aruffo et al., Cell 67: 35–44 (1991)]. Im Gegensatz zum Letztgenannten muss die Bildung von Heterodimeren biochemisch erreicht werden, da chimäre Moleküle, welche die Fc-Domäne tragen, als Disulfid-verknüpfte Homodimere exprimiert werden. Daher können Homodimere unter Bedingungen reduziert werden, welche die Zerstörung von Zwischen-Ketten-Disulfiden begünstigen, aber Intra-Ketten-Disulfide nicht beeinflussen. Dann werden Monomere mit unterschiedlichen extrazellulären Bereichen in äquimolaren Mengen gemischt und oxidiert, um eine Mischung von Homo- und Heterodimeren zu bilden. Die Komponenten dieser Mischung werden durch chromatographische Techniken getrennt. Alternativ dazu kann die Bildung dieses Typs von Heterodimeren durch gentechnisches Erzeugen und Exprimieren von Molekülen begünstigt werden, welche aus dem löslichen oder extrazellulären Bereich der Rezeptorkomponenten, gefolgt von der Fc-Domäne von hIgG, gefolgt von entweder den oben beschriebenen c-jun- oder c-fos-Leucin-Zippern [Kostelny et al., J. Immunol. 148: 1547–1553 (1992)], bestehen. Da diese Leucin-Zipper vorwiegend Heterodimere bilden, können sie verwendet werden, um die Bildung der Heterodimere anzutreiben, falls dies gewünscht ist. Hinsichtlich der beschriebenen chimären Proteine unter Verwendung von Leucin-Zippern können diese des Weiteren mit Metallchelaten oder einem Epitop markiert bzw. getaggt werden. Diese getaggte Domäne kann für eine rasche Aufreinigung durch Metall-Chelat-Chromatographie und/oder durch Antikörper verwendet werden, um eine Detektion auf Western-Blots, Immunpräzipitation oder Aktivitäts-Depletion/Blockierung in Bioassays zu ermöglichen.

[0084] In zusätzlichen Ausführungsformen können Heterodimere unter Anwendung anderer Immunglobulin-abgeleiteter Domänen, welche die Bildung von Dimeren vorantreiben, hergestellt werden. Derartige Domänen schließen zum Beispiel die schweren Ketten von IgG (Cy1 und Cy4), sowie die konstanten Regionen von Kappa (κ)- und Lambda (λ)-Leichtketten von humanen Immunglobulinen ein. Die Heterodimerisierung von Cy mit der leichten Kette findet zwischen der CH1-Domäne von Cy und der konstanten Region der leichten Kette (C_l) statt und wird stabilisiert durch kovalente Verknüpfung der zwei Domänen mittels einer einzigen Disulfidbrücke. Folglich, wie beschrieben in Beispiel 4, können Konstrukte unter Verwendung dieser Immunglobulin-Domänen hergestellt werden. Alternativ dazu schließen die Immunglobulin-Domänen Domänen ein, welche aus T-Zell-Rezeptor-Komponenten abgeleitet werden können, welche eine Dimerisierung antreiben. In einer anderen Ausführungsform der Erfindung werden die sRa:β1-Heterodimere durch Expression als chimäre Moleküle unter Verwendung von flexiblen Linker-Schleifen hergestellt. Ein DNA-Konstrukt, welches das chimäre Protein codiert, wird so entworfen, dass es zwei lösliche oder extrazelluläre Domänen exprimiert, welche in Tandemanordnung ("Kopf an Kopf") durch eine flexible Schleife aneinander fusioniert sind. Diese Schleife kann

vollständig künstlich (z. B. Polyglycinwiederholungen, unterbrochen durch Serin oder Threonin bei einem bestimmten Intervall) oder aus natürlich vorkommenden Proteinen "ausgeborgt" (z. B. die Gelenkregion von hlgG) sein. Moleküle können konstruiert werden, in welchen die Reihenfolge der löslichen oder extrazellulären fusionierten Domänen vertauscht ist (z. B. sIL6Ra/Schleife/sgp130 oder sgp130/Schleife/sIL-6Ra), und/oder in welchen die Länge und Zusammensetzung der Schleife variiert wird, um eine Selektion von Molekülen mit erwünschten Merkmalen zu gestatten.

[0085] Alternativ dazu können die Heterodimere, hergestellt gemäß der vorliegenden Erfindung, aus Zelllinien gereinigt werden, welche mit den passenden α - und β -Komponenten co-transfiziert wurden. Heterodimere können von Homodimeren unter Anwendung von Verfahren getrennt werden, welche dem Fachmann auf dem Gebiet zur Verfügung stehen. Beispielsweise können beschränkte Mengen an Heterodimeren durch passive Elution aus präparativen, nicht-denaturierenden Polyacrylamidgelen gewonnen werden. Alternativ dazu können Heterodimere unter Anwendung von Hochdruck-Kationenaustauschchromatographie gereinigt werden. Eine ausgezeichnete Reinigung ist unter Verwendung einer Mono-S-Kationen-Austausch-Säule erhalten worden.

[0086] Zusätzlich zu sRa: β 1-Heterodimeren, welche als Antagonisten durch Bindung von freiem CNTF oder IL-6 wirken, zieht die vorliegende Erfindung des Weiteren die Verwendung von technisch erzeugten, mutierten Versionen von IL-6 mit neuen Eigenschaften in Betracht, welche ihm gestatten, an IL-6Ra und ein einzelnes gp130-Molekül zu binden, jedoch darin versagen, das zweite gp130 anzukoppeln, um die β -Komponenten-Homodimerisierung zu vervollständigen, und somit als ein effektiver IL-6-Antagonist auf jedweder IL-6-responsiven Zelle wirken. Unser Modell für die Struktur der IL-6- und CNTF-Rezeptorkomplexe zeigt an, dass diese Cytokine verschiedene Stellen für die Bindung der α -, β 1- und β 2-Rezeptorkomponenten aufweisen [Stahl und Yancopoulos, Cell 74: 587–590 (1993)]. Mutationen von kritischen Aminosäureresten, umfassend jede dieser Stellen, führen zur Entstehung neuer Moleküle, welche die gewünschten antagonistischen Eigenschaften aufweisen. Eine Eliminierung der β 1-Stelle würde ein Moleköl ergeben, welches noch an die α -Rezeptorkomponente, aber nicht an die β 1-Komponente binden könnte, und dadurch einen Antagonisten mit nanomolarer Affinität umfassen. Mutationen von kritischen Aminosäureresten, umfassend die β 2-Stelle von IL-6 (IL-6 β 2 $^{-}$), würden ein Moleköl ergeben, welches an IL-6Ra und das erste gp130-Monomer binden würde, jedoch darin versagt, das zweite gp130 anzukoppeln, und somit funktionell inaktiv sein wird. In ähnlicher Weise würden Mutationen der CNTF- β 2-Stelle ein Moleköl ergeben (CNTF β 2 $^{-}$), welches CNTFRa und gp130 binden wird, jedoch darin versagt, LIFR β anzukoppeln, wodurch der CNTF-Wirkung durch Bildung des nicht-funktionellen β 1-Intermediats entgegengewirkt wird. Basierend auf den oben beschriebenen Bindungsergebnissen, worin CNTF das β 1-Intermediat mit hoher Affinität bildet, würden sowohl CNTF β 2 $^{-}$ als auch IL-6 β 2 $^{-}$ Antagonisten mit einer Affinität im Bereich von 10 pM darstellen.

[0087] Eine Vielzahl von Methoden wird verwendet, um Mutationen von IL-6 oder CNTF zu erzeugen und zu identifizieren, welche die gewünschten Eigenschaften aufweisen. Eine durch Standardverfahren erfolgende statistische Mutagenese der DNA, welche IL-6 oder CNTF codiert, kann eingesetzt werden, gefolgt von einer Analyse der Kollektion von Produkten, um mutierte Cytokine mit den gewünschten neuen Eigenschaften, wie oben stehend skizziert, zu identifizieren. Eine Mutagenese durch gentechnische Verfahren ist umfassend eingesetzt worden, um die strukturelle Organisation der funktionellen Domänen von rekombinanten Proteinen aufzuklären. Mehrere unterschiedliche Vorgehensweisen sind in der Literatur zur Ausführung von Deletions- oder Substitutions-Mutagenese beschrieben worden. Die erfolgreichste scheint die Alanin-Scanning-Mutagenese [Cunningham und Wells (1989), Science 244: 1081–1085] und die Homolog-Scanning-Mutagenese [Cunningham et al., (1989), Science 243: 1330–1336] zu sein.

[0088] Die zielgerichtete Mutagenese der IL-6- oder CNTF-Nukleinsäuresequenzen unter Anwendung derartiger Verfahren kann angewandt werden, um CNTF β 2- oder IL-6 β 2-Kandidaten zu erzeugen. Die Auswahl von für zielgerichtete Mutagenese geeigneten Regionen wird systematisch vorgenommen oder aus Untersuchungen bestimmt, bei welchen Auswahlen von monoklonalen Antikörpern gegen jeden Faktor verwendet werden, um Regionen des Cytokins zu kartieren, welche nach Bindung des Cytokins an die α -Rezeptorkomponente allein oder an die oben beschriebenen $\alpha\beta$ 1-heterodimerischen löslichen Rezeptoren exponiert sein könnten. In ähnlicher Weise könnte eine chemische Modifikation oder eingeschränkte Proteolyse des Cytokins allein oder in einem Komplex, gebunden an die α -Rezeptorkomponente oder die oben stehend beschriebenen $\alpha\beta$ 1-heterodimerischen löslichen Rezeptoren, gefolgt von Analyse der geschützten und exponierten Regionen, potentielle β 2-Bindungsstellen enthüllen.

[0089] Assays zur Identifizierung von CNTF- oder IL-6-Mutanten mit den gewünschten Eigenschaften beinhalten die Fähigkeit, mit hoher Affinität die Wirkung von IL-6 oder CNTF auf geeignet responsive Zelllinien zu blockieren [Davis et al., Science 259: 1736–1739 (1993); Murakami et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:

11349–11353 (1991)]. Derartige Assays schließen Zellproliferation, Überleben oder DNA-Synthese, angetrieben von CNTF oder IL-6, oder die Konstruktion von Zelllinien, worin die Bindung von Faktor die Produktion von Reportern, wie CAT oder β -Galactosidase induziert, ein [Savino et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 4067–4071 (1993)].

[0090] Alternativ dazu können die Eigenschaften verschiedener Mutanten mit einem Rezeptor-basierenden Assay überprüft werden. Ein derartiger Assay besteht aus dem Screenen von Mutanten hinsichtlich ihrer Fähigkeit, die sRa: β 1-Rezeptor-Heterodimere, welche oben beschrieben sind, unter Verwendung von Epitopgetaggten [Davis et al., Science 253: 59–63 (1991)] sRa: β 1-Reagenzien zu binden. Darüber hinaus kann man hinsichtlich der Gegenwart oder Abwesenheit der β 2-Stelle durch Überprüfung sondieren, ob ein Epitop-getaggtes lösliches β 2-Reagenz an das Cytokin in Gegenwart des β 1-Heterodimers binden wird. Zum Beispiel bindet CNTF nur an LIFR β (die β 2-Komponente) in Gegenwart von sowohl CNTFR α als auch gp130 [Davis et al., Science 260: 1805–1808 (1993); Stahl et al., J. Biol. Chem. 268: 7628–7631 (1993)]. Somit wird ein lösliches LIFR β -Reagenz nur an CNTF in Gegenwart des löslichen sRa: β 1-Dimers sCNTFR α : β 1 binden. Für IL-6 wäre das sRa: β 1-Reagenz IL-6Ra: β 1, und die Sonde für die β 2-Stelle wäre Epitopgetaggtes sgp130. Somit werden β 2-Mutanten von CNTF als diejenigen identifiziert, welche an das sRa: β 1-Reagenz gebunden haben, wodurch gezeigt wird, dass die α - und β 1-Stelle des Cytokins intakt waren, jedoch darin versagt haben, das β 2-Reagenz zu binden.

[0091] Darüber hinaus sieht die vorliegende Erfindung Verfahren zum Detektieren oder Messen der Aktivität von potenziellen β 2-Mutanten durch Messen der Phosphorylierung einer β -Rezeptorkomponente oder einer Signaltransduktionskomponente, gewählt aus der Gruppe, bestehend aus Jak1, Jak2 und Tyk2, oder jeden anderen Signaltransduktionskomponente, wie den CLIPs, von welchen bestimmt wird, phosphoryliert zu werden in Antwort auf ein Mitglied der CNTF-Familie von Cytokinen, vor.

[0092] Eine Zelle, welche die hierin beschriebenen Signaltransduktionskomponente(n) exprimiert, kann dies entweder natürlich vollführen oder kann gentechnisch verändert werden, um dies zu tun. Zum Beispiel können Jak1 und Tyk-2 codierende Nukleinsäuresequenzen, die wie beschrieben in Velazquez et al., Cell, Band 70: 313–322 (1992), erhalten wurden, in eine Zelle durch Transduktion, Transfektion, Mikroinjektion, Elektroporation, mittels eines transgenischen Tiers etc. unter Anwendung jeglichen im Fachgebiet bekannten Verfahrens, eingebracht werden.

[0093] Gemäß der Erfindung werden Zellen an einen potenziellen Antagonisten exponiert, und die Tyrosinphosphorylierung von entweder den β -Komponente(n) oder Signaltransduktionskomponente(n) wird mit der Tyrosinphosphorylierung der gleichen Komponente(n) in Abwesenheit des potenziellen Antagonisten verglichen. In einer anderen Ausführungsform der Erfindung wird die Tyrosinphosphorylierung, welche aus dem Kontaktieren der oben stehenden Zellen mit dem potenziellen Antagonist resultiert, mit der Tyrosinphosphorylierung der gleichen Zellen verglichen, welche an das Stammform-CNTF-Familienmitglied exponiert wurden. In derartigen Assays müssen die Zellen entweder den extrazellulären Rezeptor (α -Komponente) exprimieren, oder die Zellen können an das Testagens in Gegenwart der löslichen Rezeptorkomponente exponiert werden. Somit kann, zum Beispiel in einem Assay-System, das zum Identifizieren von Agonisten oder Antagonisten von CNTF entworfen ist, die Zelle die α -Komponente CNTFR α , die β -Komponenten gp130 und LIFR β und eine signaltransduzierende Komponente, wie Jak1, exprimieren. Die Zelle wird an Test-Agentien exponiert und die Tyrosinphosphorylierung von entweder den β -Komponenten oder der signaltransduzierenden Komponente wird mit dem Phosphoryierungsmuster, welches in Gegenwart von CNTF hergestellt wird, verglichen. Alternativ dazu wird die Tyrosinphosphorylierung, welche aus Exposition an ein Test-Agens resultiert, mit der Phosphorylierung verglichen, welche in Abwesenheit des Test-Agens stattfindet. Alternativ dazu kann ein Assay-System, zum Beispiel für IL-6, das Exponieren einer Zelle, welche die β -Komponente gp130 und ein signaltransduzierendes Protein, wie Jak1, Jak2 oder Tyk2, exprimiert, an ein Test-Agens zusammen mit dem löslichen IL-6-Rezeptor beinhalten.

[0094] In einer anderen Ausführungsform der Erfindung werden die obenstehenden Vorgehensweisen angewandt, um ein Verfahren zum Screening nach kleinen Molekül-Antagonisten zu entwickeln, welche an verschiedenen Schritten im Verfahren der Ligandenbindung, Rezeptorkomplexbildung und der anschließenden Signaltransduktion wirken. Moleküle, welche potenziell Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen stören, werden durch Überprüfen der Störung der Komplexbildung zwischen den löslichen Rezeptoren und Ligand, wie oben beschrieben, gescreent. Alternativ dazu werden Zell-basierende Assays, in welchen IL-6 oder CNTF eine Antwort eines Reportergens induzieren, gegen Bibliotheken von kleinen Molekülen oder natürlichen Produkten gescreent, um potenzielle Antagonisten zu identifizieren. Diejenigen Moleküle, welche Antagonistenaktivität zeigen, werden erneut auf Zell-basierenden Assays gescreent, welche auf andere Faktoren antworten (wie

GM-CSF oder Faktoren, wie Neurotrophin-3, welche Rezeptortyrosinkinasen aktivieren), um ihre Spezifität gegen die CNTF/IL-6/OSM/LIF-Familie von Faktoren auszuwerten. Derartige Zellbasierenden Screens bzw. Rasteruntersuchungen werden angewandt, um Antagonisten zu identifizieren, welche jedwedes von zahlreichen Zielen im Signaltransduktionsprozess inhibieren.

[0095] In einem derartigen Assay-System ist das spezifische Ziel für Antagonisten die Wechselwirkung der Jak/Tyk-Familie von Kinasen [Firbach-Kraft, Oncogene 5: 1329–1336 (1990); Wilks et al., Mol. Cell. Biol. 11: 2057–2065 (1991)] mit den Rezeptor-β-Untereinheiten. Wie oben beschrieben, präassoziiieren LIFRβ und gp130 mit Mitgliedern der Jak/Tyk-Familie von cytoplasmatischen Proteintyrosinkinasen, welche in Antwort auf Liganden-induzierte β-Komponenten-Dimerisierung aktiviert werden; Stahl et al., Science 263: 92–95 (1993). Somit könnten kleine Moleküle, welche in das Zellcytoplasma eintreten könnten und die Wechselwirkung zwischen der β-Komponente und der Jak/Tyk-Kinase unterbrechen könnten, potenziell die gesamte nachfolgende intrazelluläre Signalleitung blockieren].

[0096] Die hierin beschriebenen CNTF-Familien-Antagonisten binden an oder kompetitieren mit IL-6. Folglich sind sie nützlich zur Behandlung von Krankheiten oder Erkrankungen, welche von IL-6 vermittelt werden. Zum Beispiel werden therapeutische Anwendungen von IL-6-Antagonisten die folgenden einschließen:

(1) Bei Osteoporose, welche durch Senkung von Östrogenspiegeln in Frauen nach der Menopause oder durch Ovarioktomerie verschlimmert werden kann, scheint IL-6 ein kritischer Mediator der Osteoklastengenese zu sein, was zu Knochenresorption führt [Horowitz, Science 260: 626–627 (1993); Jilka et al., Science 257: 88–91 (1992)]. Bedeutenderweise scheint IL-6 nur eine hauptsächliche Rolle im Östrogenentleerten Zustand zu spielen und ist scheinbar minimal bei der normalen Knochen-Aufrechterhaltung beteiligt. Konsistent damit zeigen experimentelle Beweise, dass Funktions-blockierende Antikörper gegen IL-6 die Anzahl von Osteoklasten verringern können [Jilka et al., Science 257: 88–91 (1992)]. Während Östrogen-Ersatztherapie ebenfalls angewandt wird, scheint es Nebenwirkungen zu geben, welche ein erhöhtes Risiko von Endometriums- und Brustkrebs einschließen. Somit werden IL-6-Antagonisten, wie hierin beschrieben, spezifischer sein, um die Osteoklasten-Genese auf normale Spiegel zu reduzieren.

(2) IL-6 scheint direkt beteiligt zu sein an multiplem Myelom durch Wirken in entweder einer autokrinen oder parakrinen Weise, um die Tumorbildung zu fördern [van Oers et al., Ann. Hematol. 66: 219–223 (1993)]. Darüber hinaus erzeugen die erhöhten IL-6-Spiegel unerwünschte Sekundäreffekte, wie Knochenresorption, Hyperkalzämie und Cachexie; in limitierten bzw. limitierenden Untersuchungen besitzen Funktions-blockierende Antikörper gegen IL-6 oder IL-6Ra eine gewisse Wirksamkeit [Klein et al., Blood 78: 1198–1204 (1991); Suzuki et al., Eur. J. Immunol. 22: 1989–1993 (1992)]. Deshalb wären IL-6-Antagonisten, wie hierin beschrieben, nützlich sowohl für die Sekundäreffekte als auch für die Hemmung von Tumorwachstum.

(3) IL-6 kann ein Mediator von Tumornekrosefaktor (TNF) sein, welcher zu Cachexie führt, assoziiert mit AIDS und Krebs [Strassmann et al., J. Clin. Invest. 89: 1681–1684 (1992)], möglicherweise durch Reduzieren der Lipoprotein-Lipase-Aktivität in Fettgewebe [Greenberg et al., Cancer Research 52: 4113–4116 (1992)]. Folglich werden hierin beschriebene Antagonisten nützlich zur Linderung oder Reduzierung von Cachexie in solchen Patienten sein.

[0097] Effektive Dosierungen, nützlich zur Behandlung dieser oder anderer mit der CNTF-Familie zusammenhängenden Krankheiten oder Erkrankungen, können unter Verwendung von dem Fachmann auf dem Gebiet bekannten Verfahren bestimmt werden [siehe zum Beispiel Fingl et al., The Pharmacological Basis of Therapeutics, Goodman und Gilman, Hrsg., Macmillan Publishing Co., New York, S. 1–46 (1975)]. Pharmazeutische Zusammensetzungen zur Verwendung gemäß der Erfindung schließen die oben beschriebenen Antagonisten in einem pharmazeutisch annehmbaren flüssigen, festen oder halbfesten Träger, welche, vor der Verabreichung in vivo, an einen Träger oder ein Zielsuchmolekül (z. B. Antikörper, Hormon, Wachstumsfaktor etc.) geknüpft und/oder in Liposomen, Mikrokapseln und eine Präparation mit regulierter Freisetzung (einschließlich Antagonisten-exprimierenden Zellen) eingebracht werden, ein. Zum Beispiel kann die pharmazeutische gebracht werden, ein. Zum Beispiel kann die pharmazeutische Zusammensetzung einen oder mehrere der Antagonisten in einer wässrigen Lösung, wie steriles Wasser, Kochsalzlösung, Phosphatpuffer oder Dextroselösung umfassen. Alternativ dazu können die aktiven Mittel in einer festen (z. B. Wachs) oder halbfesten (z. B. gelatineartigen) Formulierung beinhaltet sein, welche in einen Patienten implantiert werden kann, der einer solchen Behandlung bedarf. Der Verabreichungsweg kann jedweder im Fachgebiet bekannte Verabreichungsmodus sein, einschließlich, ohne jedoch darauf eingeschränkt zu sein, intravenös, intrathekal, subkutan, durch Injektion in betroffenes Gewebe, intraarteriell, intranasal, oral oder mittels einer implantierten Einrichtung.

[0098] Die Verabreichung kann zur Verteilung des aktiven Mittels der Erfindung über den gesamten Körper hinweg oder in einem lokalisierten Gebiet führen. Beispielsweise kann, bei manchen Zuständen, welche entlegene Regionen des Nervensystems betreffen, eine intravenöse oder intrathekale Verabreichung des Mittels

wünschenswert sein. In einigen Situationen kann ein Implantat, welches aktives Mittel enthält, in oder nahe dem geschädigten Gebiet platziert werden. Geeignete Implantate schließen, ohne jedoch darauf eingeschränkt zu sein, Gelschaum, Wachs oder Mikropartikelbasierende Implantate ein.

BEISPIELE

BEISPIEL 1: CNTF KONKURRIERT MIT IL-6 UM DIE BINDUNG AN GP130

MATERIALIEN UND METHODEN

[0099] Materialien. Ein Klon von PC12-Zellen, welche auf IL-6 ansprechen (PC12D) wurde von DNAX erhalten. Ratten-CNTF wurde hergestellt, wie beschrieben [Masiakowski et al., J. Neurochem. 57: 1003–10012 (1991)]. IL-6 und sIL-6Ra wurden von R & D Systems erworben. Antiseren wurden in Kaninchen gegen ein Peptid, welches aus einer Region nahe dem C-Terminus von gp130 abgeleitet war (Sequenz: CGTEGQ-VER-FETVGME) [SEQ ID NR.: 2] durch das beschriebene Verfahren herangezüchtet (Stahl et al., J. Biol. Chem. 268: 7638–7631 (1993)). Monoklonales Anti-Phosphotyrosin 4G10 wurde von UBI, und Reagenzien für ECL von Amersham erworben.

[0100] Signaltransduktions-Assays. Platten (10 cm) von PC12D wurden in serumfreiem Medium (RPMI 1640 + Glutamin) 1 Stunde lang ausgezehrt, dann mit IL-6 (50 ng/ml) + sIL-6R (1 mg/ml) in Gegenwart oder Abwesenheit von zugesetztem Ratten-CNTF bei den angegebenen Konzentrationen während 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Proben wurden dann einer Anti-gp130-Immunpräzipitation, SDS-PAGE und Anti-Phosphotyrosin-Immunoblotting unterzogen, wie beschrieben (Stahl et al., J. Biol. Chem. 268: 7628–7631 (1993)).

ERGEBNISSE

[0101] Die Fähigkeit von CNTF, IL-6-Antworten zu blockieren, wurde unter Verwendung einer PC12-Zelllinie (bezeichnet als PC12D) gemessen, welche IL-6Ra, gp130 und CNTFRα, aber nicht LIFRβ exprimiert. Wie man vorhersagen würde, antworten diese Zellen auf IL-6, aber nicht auf CNTF ([Fig. 2](#)), weil LIFRβ eine erforderliche Komponente für die CNTF-Signaltransduktion ist [Davis et al., Science 260: 59–63 (1993)]. Gemäß den Ergebnissen auf anderen Zelllinien [Ip et al., Cell 69: 1121–1132 (1992)] ergeben PC12D-Zellen eine Tyrosinphosphorylierung von gp130 (sowie einer Vielzahl anderer Proteine, welche CLIPs genannt werden) in Antwort auf 2 nM IL-6 ([Fig. 2](#)). Die Zugabe von rekombinantem löslichem IL-6Ra (sIL-6Ra) steigert den Spiegel der gp130-Tyrosinphosphorylierung, wie in einigen anderen Systemen berichtet worden ist [Tags et al., Cell 58: 573–581 (1989)]. Allerdings verringert eine Zugabe von 2 nM CNTF gleichzeitig mit IL-6 stark die Tyrosinphosphorylierung von gp130. Obwohl eine leichte gp130-Phosphorylierungsantwort in Gegenwart von CNTF, IL-6 und sIL-6Ra bestehen bleibt, wird sie eliminiert, wenn die CNTF-Konzentration vierfach auf 8 nM erhöht wird. Somit ist, in IL-6-responsiven Zellen, welche CNTFRα aber kein LIFRβ enthalten, CNTF ein ziemlich wirksamer Antagonist der IL-6-Wirkung.

BEISPIEL 2. BINDUNG VON CNTF AN DEN CNTFRα:β

MATERIALIEN UND METHODEN

[0102] Scatchard-Analyse der CNTF-Bindung. ^{125}I -CNTF wurde hergestellt und gereinigt, wie beschrieben [Stahl et al., JBC 268: 7628–7631 (1993)]. Sättigungsbindungsuntersuchungen wurden in PC12-Zellen unter Verwendung von Konzentrationen an ^{125}I -CNTF im Bereich von 20 pM bis 10 nM ausgeführt. Die Bindung wurde direkt auf einer Monoschicht von Zellen durchgeführt. Medium wurde aus den Vertiefungen entfernt, und die Zellen wurden einmal mit Assaypuffer gewaschen, der aus phosphatgepuffterter Kochsalzlösung (PBS; pH 7,4), 0,1 mM Bacitracin, 1 mM PMSF, 1 mg/ml Leupeptin und 1 mg/ml BSA bestand. Die Zellen wurden in ^{125}I -CNTF während 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, gefolgt von zwei schnellen Waschungen mit Assaypuffer. Die Zellen wurden lysiert mit PBS, welches 1 % SDS enthielt, und in einem Packard-Gamma-Zähler bei 90–95 % Effizienz gezählt. Nichtspezifische Bindung wurde definiert durch die Gegenwart eines 100-fachen Überschusses an unmarkiertem CNTF. Die spezifische Bindung lag im Bereich von 70 bis 95 %.

ERGEBNISSE

[0103] Die Gleichgewichtskonstante für die Bindung von CNTF an CNTFRα:β1 wurde aus der Scatchard-Analyse der Bindung von iodiertem CNTF auf PC12D-Zellen abgeschätzt ([Fig. 3](#)). Die Daten sind konsistent mit einer 2-Stellen-Passung, welche Dissoziationskonstanten von 9 pM und 3,4 nM aufweist. Die

Niedrigaffinitäts-Stelle entspricht der Wechselwirkung von CNTF mit CNTFR α , welche einen Kd nahe 3 nM aufweist [Panayotatos et al., J. Biol. Chem. 268: 19000-19003 (1993)]. Wir interpretieren den Hochaffinitätskomplex als das Intermediat, welches CNTF, CNTFR α und gp130 enthält. Eine Ewing-Sarkom-Zelllinie (EW-1), welche CNTFR α , gp130 und LIFR β enthält, und deshalb eine starke Tyrosinphosphorylierung in Antwort auf CNTF ergibt, zeigt eine sehr ähnliche Zwei-Stellen-Passung mit Dissoziationskonstanten von 1 nM und 10 auf. Somit ist es offensichtlich, dass CNTF mit gleich hoher Affinität an einen Komplex, welcher nur CNTFR α und gp130 enthält, bindet, wie es dies bei einem Komplex, welcher zusätzlich LIFR β enthält, vollführt, wodurch die Machbarkeit der Erzeugung der hierin beschriebenen sRa: β -Antagonisten verdeutlicht wird.

BEISPIEL 3. VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON CYTOKIN-LIGANDEN-FALLEN

Virus-Stammlösungs-Herstellung

[0104] SF21-Insektenzellen, welche aus Spodoptera frugiperda erhalten worden waren, wurden bei 27 °C in Gibco SF900 II-Medium zu einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ml wachsen gelassen. Die individuelle Virus-Stammlösung entweder für GP130-Fc-His₆ ([Fig. 4](#)) oder IL6Ra-Fc ([Fig. 5](#)) wurde zu dem Bioreaktor bei einer niedrigen Multiplizität, 0,01–0,1 PFU/Zelle, zugesetzt, um die Infektion zu beginnen. Der Infektionsvorgang wurde 5–7 Tage lang fortlaufen gelassen, wobei eine Maximum-Virusreplikation zugelassen wurde, ohne dass eine wesentliche Zellysis erfahren wurde. Die Zellsuspension wurde aseptisch in sterile Zentrifugenflaschen allquotiert, und die Zellen wurden durch Zentrifugation entfernt. Der zellfreie Überstand wurde in sterilen Flaschen gesammelt und bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

[0105] Der Virustiter wurde durch Plaque-Assay bestimmt, wie beschrieben von O'Reilly, Miller und Luckow. Das Verfahren wird in 60-mm-Gewebekulturschalen ausgeführt, welche mit 2×10^6 Zellen angeimpft werden. Reihenverdünnungen der Virusstammlösung werden zu den angehefteten Zellen gegeben, und die Mischung wird unter Schwenken inkubiert, um zu gestatten, dass das Virus an individuelle Zellen adsorbiert. Eine Agar-Deckschicht wird zugefügt und die Platten werden 5–7 Tage lang bei 27 °C inkubiert. Eine Färbung von lebensfähigen Zellen mit Neutralrot enthüllte resultierende kreisförmige Plaques, welche gezählt wurden, um den Virustiter zu ergeben.

Co-Infektion von Zellen für die Proteinproduktion

[0106] Nicht-infizierte SF21-Zellen wurden einem 60 l großen ABEC-Bioreaktor wachsen gelassen, welcher 40 l SF900 II-Medium enthielt. Die Temperatur wurde auf 27 °C gesteuert, und der Spiegel an gelöstem Sauerstoff wurde bei 50 % der Sättigung gehalten, indem die Fließrate von Sauerstoff im Einlass-Gasstrom gesteuert wurde. Als eine Dichte von 2×10^6 Zellen/ml erreicht war, wurden die Zellen innerhalb des Bioreaktors auf ein Volumen von 20 l unter Verwendung einer dampfsterilisierbaren Niedrigscher-Pumpe mit einer Tangentialfluss-Filtrationsvorrichtung mit Millipore Prostak 0,65-Mikrometer-Membranen konzentriert. Nach der Konzentrierung wird frisches steriles Wachstumsmedium langsam zu dem Bioreaktor zugefügt, während das Filtrationssystem damit fortsetzt, das verbrauchte Wachstumsmedium mittels Diafiltration zu entfernen. Nachdem zwei Volumenwechsel (40 l) ausgeführt worden sind, wurden weitere 20 l frisches Medium zu dem Bioreaktor gegeben, um die Zellen zum Ursprungsvolumen von 40 l zu resuspendieren. Die Zelldichte wurde erneut durch Auszählen der lebensfähigen Zellen unter Verwendung eines Hämacytometers bestimmt.

[0107] Die erforderliche Menge jeder Virusstammlösung wurde berechnet, basierend auf der Zelldichte, dem Virustiter und der gewünschten Multiplizität der Infektion (MOI). Virusstammlösungs-Verhältnisse von 5:1, 5:2, 10:2 und 10:4, IL6Ra-Fc zu GP130-Fc-His₆, führten alle zur Herstellung von signifikanten Mengen an Heterodimer. Das ideale Virusstammlösungs-Verhältnis ist in hohem Maße von der Leichtigkeit der Reinigung des Heterodimers von jedem der zwei Homodimere abhängig. Das IL6Ra-Fc-Homodimer ist relativ einfach stromabwärts durch immobilisierte Metallaffinitäts-Chromatographie zu entfernen. Es sind Virusinfektionsverhältnisse gewählt worden, um die Bildung des GP130-Fc-His₆-Homodimers, welches stromabwärts schwieriger zu klären ist, zu minimieren. Die relative Menge an GP130-Fc-His₆-Virusstammlösung, gewählt für die Infektion, ist mit aufeinanderfolgenden Ansätzen gesteigert, zumal sich das Reinigungsverfahren zur Klärung bzw. Entfernung des resultierenden Homodimers verbessert hat.

[0108] Die Virusstammlösungen wurden aseptisch in einem Einzelgefäß gemischt, und dann in den Bioreaktor überführt. Dies führt zur synchronen Infektion der SF21-Zellen. Die Infektion wird drei bis vier Tage lang voranschreiten gelassen, wobei ausreichend Zeit für die Maximalproduktion des Heterodimerproteins zugelassen wird.

Gewinnung und Protein-A-chromatographische Reinigung

[0109] Beim Abschluß der Infektionsphase des Biorektor-Prozesses wurden die Zellen im Bioreaktor konzentriert unter Verwendung eines 10-Quadratfuß-Millipore-Prostak-Filters (0,65 Mikrometer Porengröße). Das zellfreie Permeat, welches durch den Filter hindurchläuft, wurde in einem sauberen Verfahrensgefäß aufgefangen. Beim Abschluss des Filtrationsvorgangs wurde der pH-Wert des Permeat-Stroms, welcher das Proteinprodukt enthielt, mit 10 N NaOH auf 8,0 eingestellt. Das resultierende Präzipitat wurde entfernt durch Hindurchpressen des Extraktes durch einen Filter von 0,8 Mikrometer Tiefe (Sartorius), gefolgt von einem 0,2-Mikrometer-Filter. Ausreichend 0,5 M EDTA-Stammlösung wurde zugesetzt, um eine Endkonzentration von 5 mM zu ergeben. Die gefilterte Proteinlösung wurde auf eine Säule mit einem Durchmesser von 10 cm, enthaltend 100–200 ml "Protein A-Sepharose 4 Fast Flow" von Pharmacia, welches mit PBS äquilibriert worden war, aufgetragen. Protein A besitzt eine sehr hohe Affinität für die Fc-Fc-Domäne von jedem der 3 rekombinanten Proteinprodukte, was ihnen gestattet, zu binden, während andere Proteine in dem zellfreien Extrakt durch die Säule fließen. Nach dem Auftragen wurde die Säule mit PBS, welches weiteres 350 mM NaCl enthielt, bis zur Basislinie gewaschen. Die IgG-Fc-getaggten Proteine wurden bei niedrigem pH eluiert, entweder mit 0,5 M Essigsäure oder mit einem sinkenden pH-Gradienten aus 0,1 M Zitronensäure- und 0,2 M Dinatriumphosphat-Puffern. Tris-Base oder Dinatriumphosphat wurde zu dem eluierten Protein zugegeben, um eine verlängerte Exposition an Niedrig-pH-Bedingungen zu vermeiden.

[0110] Das vereinigte Protein wurde in PBS- oder HEPES-Puffer diafiltriert und mit 1 mM Iodacetamid derivatisiert, um die exponierte Sulphydrylgruppe auf dem freien Cystein nahe der Gelenkregion jeder Fc-Domäne zu schützen. Dies verhindert eine Disulfidvermittelte Aggregation von Proteinen. Eine 6-Quadratfuß-Millipore-spiralgewundene Ultrafiltrationsmembran mit einem nominalen Ausschluss von 30 Kilodalton wurde verwendet, um den Pufferwechsel durchzuführen. Das Gesamtprotein wurde durch UV-Absorption bei 280 nm unter Verwendung des Diafiltrations-Puffers als einer Leerprobe bestimmt. Die relativen Mengen von Heterodimer und zwei Homodimer-Proteinen wurden durch SDS-PAGE-Gel-Elektroporese unter Verwendung eines 6 %igen Tris-Glycin-Gels (Novex) bestimmt. Die Gele wurden Coomassie-gefärbt und dann in Entfärber-Lösung über Nacht überführt. Ein Shimadzu-Scanning-Densitometer wurde verwendet, um die relative Intensität der individuellen Proteinbanden auf dem SDS-PAGE-Gel zu bestimmen. Die Peak-Flächenverhältnisse werden verwendet, um den Anteil an Heterodimer und jedem der Homodimere in den Säulen-Vereinigungsfraktionen zu berechnen.

Immobilisierte Metall-Affinitätschromatographie-Reinigung

[0111] Die sechs Histidinreste auf dem C-Terminus des GP130-Fc-His₆-Fusionsproteins liefern einen exzellenten molekularen Handgriff für die Trennung des heterodimeren IL6-Antagonisten von den zwei Homodimeren. Die Imidazolgruppe auf jedem der C-terminalen Histidine der GP130-Fc-His₆-Einheit besitzt eine starke Bindungskonstante mit mehreren zweiwertigen Metallen, einschließlich Kupfer, Nickel, Zink, Kobalt, Eisen und Calcium. Da das IL6Rα-Fc-Homodimer keine C-terminalen Histidinreste aufweist, besitzt es in klarer Weise die niedrigste Affinität. Das IL6Rα-Fc-GP130-Fc-His₆-Heterodimer besitzt einen einzelnen Stand, besetzt mit sechs Histidinen, welcher ihm eine größere Affinität für das Metall gibt, wohingegen das GP130-Fc-His₆-Homodimer zwei Sätze von jeweils sechs Histidinen aufweist, welche ihm die höchste Affinität der drei IgG-getaggten Proteine zu der Metallaaffinitätssäule gibt. Eine selektive Elution der drei Proteine mit steigenden Mengen von Imidazol im Elutionspuffer eluiert daher die Proteine in der folgenden Reihenfolge:

1. IL6Rα-Fc-Homodimer
2. IL6Rα-Fc-GP130-Fc-His-Heterodimer
3. GP130-Fc-His-Homodimer

[0112] Eine Säule von 26 mm Durchmesser, enthaltend 100 ml Pharmacia-"Chelating Sepharose Fast Flow", wurde mit einer Lösung von Nickelsulfat gesättigt, bis eine signifikante grüne Farbe im Säuleneluat beobachtet wird. Die Säule wird dann mit mehreren Säulenvolumina an entionisiertem Wasser gewaschen, dann mit 50 mM HEPES, 40 mM Imidazol, pH 8,0, äquilibriert. Die Bindung von Imidazol an das immobilisierte Nickel führt zu einer Farbveränderung von grün nach blau. Imidazol wurde zu der Proteinbeladung zu einer Endkonzentration von 40 mM zugesetzt. Die Zugabe von Imidazol zu der Proteinbeladung reduziert die Bindung von IL6Rα-Fc-Homodimer, wodurch der Oberflächenbereich, welcher für die restlichen zwei Spezies verfügbar ist, erhöht wird. Nach der Beladung wurde die Säule mit mehreren Säulenvolumina an 50 mM HEPES, 80 mM Imidazol, pH 8,0, gewaschen, bis erneut eine stetige Basislinie eingerichtet war. Das Heterodimer wurde selektiv mit 50 mM HEPES, 150 mM Imidazol, pH 8,0, über mehrere Säulenvolumina hinweg eluiert. Die Proteinfraktionen wurden vereinigt und in PBS diafiltriert, wie es im obenstehenden Abschnitt beschrieben wurde.

BEISPIEL 4. ALTERNATIVE VERFAHREN ZUM KONSTRUIEREN VON LIGANDENFALLEN

[0113] Wie oben beschrieben, folgt eine Rezeptoraktivierung durch CNTF und in analoger Weise durch IL-6 und IL-11 einer geordneten Abfolge von Bindungssereignissen ([Fig. 6](#)). Das Cytokin bindet anfänglich an seinen zugehörigen Ra mit geringer Affinität ($K_d = 3$ bis 10 nM); dies ist ein erforderlicher Schritt – Zellen, welche den zugehörigen Ra nicht exprimieren, antworten nicht auf das zugehörige Cytokin. Der Cytokin-Ra-Komplex assoziiert mit der ersten signaltransduzierenden Komponente, gp130, unter Bildung eines Hochaffinitätskomplexes (K_d in der Größenordnung von 10 pM für den Komplex CNTF-CNTFRa-gp130). Dieser Komplex transduziert kein Signal, da es die Dimerisierung der signaltransduzierenden Komponenten ist, welche eine Signaliierung hervorbringt (Stahl und Yancopoulos, *J. Neurobiology* 25: 1454–1466 (1994); Stahl et al., *Science* 267: 1349–1353 (1995); Davis et al., *Science* 260: 1805–1808 (1993); Stahl et al., *Science* 263: 92–95 (1994); Murakami et al., *Science* 260: 1808–1810 (1993)). Zumindest im Falle von IL-6 assoziiert der heterotrimere Cytokin-Ra-Signaltransducer-Komplex anschließend mit einem anderen gleichen Komplex unter Bildung eines hexameren Komplexes ([Fig. 6](#)) (Ward et al., *J. Biol. Chem.* 269: 23286–23289 (1994)). Die resultierende Dimerisierung der Signaltransducer – gp130 im Fall von IL-6 (Murakami et al., *Science* 260: 1808–1810 (1993)) und IL-11, gp130 und LIFR im Fall von CNTF (Davis et al., *Science* 260: 1805–1808 (1993)) – führt zu einer Signaltransduktion.

[0114] Die anfänglichen heterodimeren Moleküle, welche hergestellt wurden, umfassten eine lösliche Ra-Komponente, verknüpft an die extrazelluläre Domäne von gp130. Diese Moleküle ahmen gezeigtermaßen den Hochaffinitätskomplex Cytokin-Ra-gp130 nach und verhalten sich als ein Hochaffinitätsantagonist ihres zugehörigen Cytokins ([Fig. 7](#)). Um diese Moleküle herzustellen, wurde die extrazelluläre Domäne von gp130 mit der extrazellulären Domäne der α-Rezeptorkomponenten für IL-6 und CNTF, IL-6Ra bzw. CNTFRa, gepaart. Um den Ra mit der extrazellulären Domäne von gp130 zu verknüpfen, wurden die löslichen Ra-Komponenten und gp130 an den Fc-Bereich von humanem IgG1 fusioniert, um Ra-Fc bzw. gp130-Fc herzustellen. Die Fc-Domäne wurde ausgewählt, hauptsächlich, aber nicht ausschließlich, weil sie auf natürliche Weise Disulfid-verknüpfte Dimere bildet. Heterodimere Moleküle, umfassend Ra-Fc-gp130-Fc, wurden exprimiert, gereinigt, und von ihnen wurde gezeigt, sich als hochwirksame Antagonisten ihres zugehörigen Liganden zu verhalten. Darüber hinaus wurde von diesen Molekülen gefunden, in hohem Maße spezifisch für ihr zugehöriges Cytokin zu sein, da es die Wahl der α-Rezeptorkomponente ist, welche spezifiziert, welches Cytokin gebunden und eingefangen wird (es gibt keine messbare Bindung des Cytokins an gp130 in Abwesenheit des passenden Ra).

[0115] Hier beschreiben wir eine Erweiterung dieser Technologie, welche die Konstruktion verschiedener heteromerer löslicher Rezeptorligandenfallen gestattet, welche dank ihres Entwurfs zusätzliche nutzbringende Merkmale aufweisen können, wie Stabilität, Fc-Rezeptor-vermittelte Klärung oder verringerte Effektorfunktionen (wie Komplement-Fixation). Darüber hinaus sollte sich die beschriebene Technologie als geeignet für die Konstruktion jedwedes heteromeren Proteins in Säuger- oder anderen geeigneten Proteinexpressionssystemen erweisen, einschließlich, ohne jedoch darauf eingeschränkt zu sein, heteromeren Moleküle, welche Rezeptoren, Liganden und katalytische Komponenten, wie Enzyme oder katalytische Antikörper, verwenden.

MATERIALIEN UND METHODEN

Gentechnische Erzeugung von heteromeren, auf löslichem Rezeptor basierenden Immunglobulin-Schwer/Leichtkette-Ligandenfallen für IL-6.

[0116] Die hier beschriebenen IL-6-Fallen wurden konstruiert unter Verwendung von humanem gp130, humanem IL-6-α-Rezeptor (IL-6Ra), der konstanten Region der Schwerketten (Cy) von humanem IgG1 (Cy1) (Lewis et al., *Journal of Immunology* 151: 2829–2838 (1993)) oder IgG4 (Cy4) mit oder ohne einer Verknüpfungs- bzw. Join-Region (J), und den konstanten Regionen von leichten Ketten Kappa (κ) und Lambda (λ) (Cheung et al., *Journal of Virology* 66: 6741–6720 (1992)) von humanem Immunglobulin (Ig), ebenfalls mit oder ohne einem unterschiedlichen j-Peptid (j). Dieser Entwurf zieht einen Vorteil aus der natürlichen Fähigkeit der Cy-Domäne, mit κ- oder λ-Leichtketten zu heterodimerisieren. Die Heterodimerisierung von Cy mit der leichten Kette findet zwischen der CH1-Domäne von Cy und der konstanten Region der leichten Kette (C_L) statt und wird stabilisiert durch kovalentes Verknüpfen der zwei Domänen über eine einzelne Disulfidbrücke. Wir nahmen an, dass, wie die Fc-Domäne von humanem IgG1, die Kombination von Cy mit C_L verwendet werden könnte, um Disulfid-verknüpfte heteromere Proteine herzustellen, bestehend aus der extrazellulären Domäne von gp130 auf einer Kette und der extrazellulären Domäne von IL-6Ra auf der anderen Kette. Wie ihre Fc-basierenden Gegenstücke wurde von derartigen Proteinen postuliert Hochaffinitäts-Ligandenfallen für IL-6 zu sein und als ein Ergebnis die Wechselwirkung von IL-6 mit dem nativen Rezeptor auf IL-6-responsiven Zellen zu inhibieren, wodurch

sie als IL-6-Antagonisten fungieren. Weiterhin würden Konstrukte unter Verwendung der Volllängen-Cy-Region, sehr ähnlich wie Antikörper, Homodimere der Cy-Kette bilden, was zur Entstehung von antikörperähnlichen Molekülen führt, bestehend aus zwei "Leichtketten" und zwei "Schwerketten" ([Fig. 8](#)). Der potenzielle Vorteil dieses Entwurfs besteht darin, dass er noch näher den Komplex IL-6·IL-6Ra·gp130 nachahmen kann und eine höhere Affinität für den Liganden als vergleichbare einzelne Heterodimere aufzeigen kann. Ein zusätzlicher Entwurf wird eingebunden durch Verwenden von trunkierten Versionen von Cy, welche lediglich aus der C_H-1-Domäne bestehen. Diese werden heterodimere Moleküle mit Rezeptor-κ-Fusionsproteinen bilden und werden daher dem Fab-Fragment von Antikörpern ähneln.

[0117] Alle die löslichen Rezeptor-Ig-chimären-Gene können in Plasmidvektoren konstruiert werden, einschließlich, ohne jedoch darauf eingeschränkt zu sein, Vektoren, geeignet für Säuger-Expression (COS-Affenzellen, Chinesische-Hamster-Ovar-Zellen [CHO], und ras-transformierte Fibroblasten [MG-ras]), und schließen eine Kozak-Sequenz (CGC CGC CAC CAT GGT G) am Beginn jedes chimären Gens für eine effiziente Translation ein. Die technische Erzeugung wurde unter Anwendung von standardmäßiger Gentechnik-Methodik durchgeführt. Jedes Konstrukt wurde überprüft durch DNA-Sequenzierung, Säuger-Expression, gefolgt von Western-Blotting mit geeigneten Antikörpern, biophysikalischen Assays, welche die Ligandenbindung und -dissoziation bestimmen, und Wachstumsinhibitionssassays (XG-1, wie später beschrieben). Da die Domänen, die zum Konstruieren dieser chimären Proteine verwendet wurden, von geeigneten Restriktionsstellen flankiert werden, ist es möglich, diese Domänen zu verwenden, um andere chimäre Proteine zu erzeugen, einschließlich Chimären unter Verwendung der extrazellulären Domänen der Rezeptoren für Faktoren wie IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, GM-CSF, LIF, IL-11, IL-15, IFNy, TGFβ und andere. Die Aminosäurekoordinaten für jede Komponente, welche bei der Herstellung der IL-6-Fallen verwendet wird, sind nachstehend aufgelistet (Anmerkung: Die Nummerierung beginnt mit dem einleitenden Methionin als #1; lange Sequenzen sind unter Verwendung des Ein-Buchstaben-Codes für die zwanzig Aminosäuren aufgelistet):

(a) Konstrukte unter Verwendung von humanem gp130:

- (i) gp130-Cy1 wurde erzeugt durch rastergerechtes Fusionieren bzw. Im-Raster-Fusionieren der extrazellulären Domäne von gp130 (Aminosäuren 1 bis 619) an eine Ser-Gly-Brücke, gefolgt von den 330 Aminosäuren, welche Cy1 und ein Terminationscodon umfassen ([Fig. 9](#)).
- (ii) gp130-J-Cy1 wurde in der gleichen Weise wie gp130-Cy1 erzeugt, außer, dass ein J-Peptid (Aminosäuresequenz: GQGTLTVSS) zwischen der Ser-Gly-Brücke und der Sequenz von Cy1 eingefügt wurde (siehe [Fig. 9](#)).
- (iii) gp130Δ3fibro-Cy1 wurde erzeugt durch rastergerechtes Fusionieren der extrazellulären Domäne von gp130 ohne ihre drei Fibronectin-ähnlichen Domänen ([Fig. 10](#)). Der restliche Teil dieses chimären Proteins ist identisch zu gp130-Cy1.
- (iv) gp130-J-C_H1 wurde auf eine identische Weise zu derjenigen erzeugt, die für gp130-Cy1 beschrieben wurde, mit der Ausnahme, dass anstelle der Cy1-Region nur der C_H-1-Teil von Cy1 verwendet worden ist ([Fig. 11](#)). Die C-terminale Domäne dieses Konstruktts schließt den Teil des Gelenks ein, welcher den Cysteinrest enthält, der für die Heterodimerisierung der Schwerkette von IgG mit einer Leichtkette verantwortlich ist. Der Teil des Gelenks, welcher die zwei Cysteine enthält, die an Cy1-Homodimerisierung beteiligt sind, ist zusammen mit den C_H-2- und C_H-3-Domänen deletiert worden.
- (v) gp130-Cy4 wurde auf eine identische Weise zu derjenigen erzeugt, welche für gp130-Cy1 beschrieben wurde, außer, dass Cy4 anstelle von Cy1 verwendet wurde ([Fig. 12](#)). Darüber hinaus wurde eine Rsrll-DNA-Restriktionsstelle an der Gelenkregion der Cy4-Domäne technisch erzeugt durch Einführung von zwei stillen Basenmutationen. Die Rsrll-Stelle gestattet andere erwünschte gentechnische Manipulationen, wie die Konstruktion des C_H1-Äquivalents von gp130-Cy4.
- (vi) gp130-κ wurde in einer identischen Weise zu derjenigen erzeugt, welche für gp130-Cy1 beschrieben wurde, außer, dass die konstante Region der κ-Leichtkette von humanem Ig anstelle von Cy1 verwendet wurde ([Fig. 13](#)).
- (vi) gp130-J-κ wurde in einer identischen Weise zu derjenigen technisch erzeugt, welche für gp130-J-κ beschrieben wurde, außer, dass ein j-Peptid (Aminosäuresequenz: TFGQGTKVEIK) zwischen die Ser-Gly-Brücke und die κ-Region eingefügt wurde.
- (viii) gp130-λ wurde in einer identischen Weise zu derjenigen technisch hergestellt, beschrieben für gp130-Cy1, außer, dass die konstante Region der λ-Leichtkette (Cheung et al., Journal of Virology 66: 6714–6720 (1992)) von humanem Ig anstelle von Cy1 verwendet wurde ([Fig. 14](#)).

(b) Konstrukte unter Verwendung von humanem IL-6Ra:

- (i) IL6Ra-Cy1 wurde technisch erzeugt durch rastergerechtes Fusionieren der Aminosäuren 1 bis 358 von

IL-6Ra (Yamasaki et al., Science 241: 825–828 (1988)), welche die extrazelluläre Domäne von IL-6Ra umfassen ([Fig. 15](#)), an eine Ala-Gly-Brücke, gefolgt von den 330 Aminosäuren, welche Cy1 und ein Terminationscodon umfassen.

- (ii) IL-6Ra- κ wurde erzeugt, wie beschrieben für IL6Ra-Cy1, außer, dass die κ -Domäne ([Fig. 13](#)), welche für gp130- κ verwendet wurde, anstelle von Cy1 verwendet wurde.
- (iii) IL6Ra-j- κ wurde erzeugt, wie beschrieben für IL6Ra- κ , außer, dass das für gp130-j- κ beschriebene j-Peptid zwischen die Ala-Gly-Brücke und die κ -Domäne platziert wurde.
- (iv) Drei weitere Konstrukte, IL6Ra313-Cy1, IL6Ra313- κ und IL6Ra313-j- κ wurden technisch erzeugt durch Verwendung einer trunkierten Form von IL-6Ra, bestehend aus den Aminosäuren 1 bis 313 ([Fig. 16](#)). Jedes dieser Konstrukte wurde hergestellt durch rastergerechtes Fusionieren von IL6Ra313 mit einer Thr-Gly-Brücke, gefolgt von den Cy1-, κ - und j- κ -Domänen, welche oben beschrieben wurden. Diese Konstrukte wurden technisch erzeugt, um die gp130 Δ 3fibro-abgeleiteten Konstrukte zu komplementieren.

Expression und Reinigung von Ligandenfallen

[0118] Um kovalent verknüpfte Heterodimere von löslichem gp130 und löslichem IL-6Ra herzustellen, wurden gp130-Ig-Chimärenproteine mit geeigneten IL-6Ra-Ig-Chimärenproteinen in komplementierenden Paaren co-exprimiert. Die Co-Expression wurde erreicht durch Co-Transfizieren der entsprechenden Expressionsvektoren in geeignete Säugerzelllinien, und zwar entweder stabil oder transient. Die resultierenden Disulfid-verknüpften Heterodimere wurden aus konditionierten Medien durch mehrere unterschiedliche Verfahren gereinigt, einschließlich, ohne jedoch darauf eingeschränkt zu sein, Affinitätschromatographie auf immobilisiertem Protein A oder Protein G, liganden-basierender Affinitätschromatographie, Ionenaustausch und Gelfiltration.

[0119] Ein Beispiel des Typs von Verfahren, welche verwendet wurden zur Reinigung eines Schwer/Leicht-Rezeptorfusionsproteins ist wie folgend: gp130-Cy1·IL-6Ra- κ wurde in COS-Zellen durch Co-Transfizieren zweier verschiedener Vektoren, welche gp130-Cy1 bzw. IL-6Ra- κ codieren, exprimiert. Serumfreie konditionierte Medien (400 ml) wurden zwei Tage nach der Transfektion abgesammelt, und Cy1-tragende Proteine wurden durch Affinitätschromatographie über eine 1 ml-Protein-A-Sepharose (Pharmacia) gereinigt. Das in diesem Schritt erzeugte Material wurde durch einen zweiten Affinitäts-Chromatographieschritt über eine 1 ml große NHS-aktivierte Sepharose (Pharmacia), welche mit rekombinantem humanen IL-6 derivatisiert worden war, weiter gereinigt, um gp130-Cy1-Dimer von gp130-Cy1·IL-6Ra- κ -Komplexen zu entfernen (das gp130-Cy1-Dimer bindet nicht IL-6). Durch dieses Verfahren erzeugte Proteine waren zu 90 % rein, wie durch SDS-PAGE, gefolgt von Silber-Färbung, bewiesen wurde ([Fig. 17](#)). Ähnliche Protokolle sind erfolgreich zur Reinigung von anderen Schwer/Leicht-Rezeptorheterodimeren angewandt worden.

ERGEBNISSE

Biologische Aktivität von Immunglobulin-Schwer/Leichtkette-Rezeptor-Fusions-Antagonisten

[0120] Die gereinigten Ligandenfallen wurden hinsichtlich ihres Vermögens, IL-6 zu binden, in einer Vielzahl von unterschiedlichen Assays getestet. Zum Beispiel wurde die Dissoziationsrate von an die Ligandenfalle gebundenem IL-6 parallel zur Dissoziationsrate von IL-6 von dem monoklonalen neutralisierenden Anti-IL-6-Antikörper B-E8 gemessen [Brochier et al., Int. J. Immunopharmacology 17: 41–48 (1995), und Zitate darin]. Ein Beispiel für diesen Typ von Experiment wird in der [Fig. 18](#) gezeigt. In diesem Experiment wurden 20 pM 125 I-IL-6 (1000 μ Ci/mMol; Amersham) mit 500 pM entweder von gp130-Cy1·IL-6Ra- κ oder mAB B-E8 während 20 Stunden präinkubiert. An diesem Punkt wurde ein 1000-facher Überschuss (20 nM) von "kaltem" IL-6 zugegeben. Periodisch wurden Aliquots der Reaktion entfernt, die Ligandenfalle oder B-E8 wurde mit Protein G-Sepharose gefällt, und die Anzahl an cpm von 125 I-IL-6, welche gebunden blieb, wurde bestimmt. In deutlicher Weise war die Dissoziationsrate von humanem 125 I-IL-6 aus der Ligandenfalle sehr langsam – nach drei Tagen waren ungefähr 75 % der anfänglichen Zähleinheiten noch an die Ligandenfalle gebunden. Im Gegensatz dazu blieben weniger als 5 % der Zähleinheiten nach drei Tagen mit dem Antikörper assoziiert. Dieses Ergebnis demonstriert, dass die Dissoziationsrate des Liganden aus diesen Ligandenfallen sehr langsam ist.

[0121] In einer unterschiedlichen Gruppe von Experimenten wurde die Fähigkeit der Ligandenfallen, in Gegenwart von Ligand zu multimerisieren, getestet. Ein Beispiel hierfür wird in der [Fig. 19](#) gezeigt. Die IL-6-induzierte Assoziation von gp130-Fc·IL-6Ra-Fc mit gp130-C_H1·IL-R6 α - κ wurde bestimmt durch Testen, ob gp130-C_H1·IL-6Ra- κ , welches von sich selbst aus Protein A nicht bindet, durch Protein A-Sepharose in Gegenwart von gp130-Fc·IL-6Ra-Fc in einer IL-6-abhängigen Weise präzipitiert werden konnte ([Fig. 9](#)). Die Präzipitation von gp130-C_H1 ·IL-6Ra- κ durch Protein A-Sepharose wurde durch Western-Blot mit einem Anti-Kappa-spezifischen HRP-Konjugat bestimmt, welches gp130-Fc·IL-6Ra-Fc nicht detektiert. gp130-C_H1·IL-6Ra- κ

konnte durch Protein A-Sepharose nur präzipitiert werden, wenn sowohl gp130-Fc·IL-6R α -Fc als auch IL-6 vorhanden waren. Dieses Ergebnis zeigt in schlüssiger Weise, dass IL-6 eine Ligandenfallen-Multimerisierung induzieren kann, und zeigt ferner, dass die Ligandenfalle den hexameren Cytokin·R α ·Signaltransducer-Komplex ([Fig. 1](#)) nachahmen kann. Eine Liganden-induzierte Multimerisierung kann eine bedeutende Rolle in der Klärung von Cytokin·Ligandenfalle-Komplexen in vivo spielen.

[0122] Die biologische Aktivität der verschiedenen Ligandenfallen kann ferner in Assays getestet werden, welche ligandenabhängige Zellproliferation messen. Es gibt mehrere Zellproliferations-Assays für IL-6, und sie verwenden Zelllinien, wie B9, CESS oder XG-1. Ein Beispiel für diesen Typ von Assay unter Verwendung der XG-1-Zelllinie wird nachstehend dargestellt: XG-1 ist eine Zelllinie, abgeleitet aus einem humanen multiplen Myelom (Zhang et al., Blood 83: 3654–3663 (1994)). XG-1 hängt von exogen zugeführtem humanem IL-6 für das Überleben und die Proliferation ab. Der EC₅₀ von IL-6 für die XG-1-Linie beläuft sich auf ungefähr 50 pMol/ml. Die Fähigkeit von mehreren unterschiedlichen IL-6-Fallen, IL-6-abhängige Proliferation von XG-1-Zellen zu blockieren, wurde durch Inkubieren steigender Mengen an gereinigten Ligandenfallen mit 50 pg/ml IL-6 in XG-1-Kulturen getestet. Die Ligandenfallen, welche getestet wurden, waren durch Verfahren exprimiert und gereinigt worden, ähnlich zu denjenigen, welche obenstehend beschrieben sind. Von allen getesteten Ligandenfallen wurde festgestellt, IL-6-abhängige Proliferation von XG-1 in einer dosisabhängigen Weise zu inhibieren ([Fig. 20](#)). Von den fünf getesteten verschiedenen Fallen war gp130-Cy1·IL-6R α -k die aktivste und zeigte(n) im Wesentlichen dieselbe neutralisierende Aktivität gegenüber IL-6 wie der Antikörper B-E8. So wenig wie ein 10-facher molarer Überschuss von entweder gp130-Cy1·IL-6R α -k oder B-E8 blockierte vollständig die Aktivität von IL-6 (eine Ablesung von A570 – 650 = 0,3 AU entspricht keiner Proliferation der XG-1-Zellen). Bei einem 100-fachen molaren Überschuss blockierten alle der getesteten Ligandenfallen vollständig die Aktivität von IL-6. Diese beobachtete Inhibition ist hochselektiv, da weder eine gp130-Fc·CNTFR α -Fc-Ligandenfalle, welche CNTF-Aktivität blockiert, noch gp130-Fc-Homodimer irgendeine Blockierungsaktivität gegenüber IL-6 zeigte, sogar, wenn sie bei einem 1000-fachen molaen Überschuss über IL-6 verwendet wurden (Daten nicht gezeigt). Diese Daten verdeutlichen, dass die heteromeren Immunglobulin-Schwer/Leichtketten-Ligandenfallen auf Rezeptorbasis als selektive Hochaffinitätsantagonisten ihres zugehörigen Liganden fungieren.

BEISPIEL 5 – KLONIERUNG VON FUSIONSPOLYPEPTID-KOMPONENTEN

[0123] Die extrazellulären Domänen der humanen Cytokin-Rezeptoren wurden durch Standard-PCR-Techniken unter Verwendung von Gewebe-cDNAs (CLONTECH) erhalten, in den Expressionsvektor pMT21 (Genetics Institute, Inc.) kloniert, und die Sequenzen wurden durch Standardtechniken unter Verwendung eines ABI 373A-DNA-Sequenzierers und des Taq-Didesoxy-Terminator-Zyklus-Sequenzierungs-Kits (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) sequenziert. Für den IL-4R α wurden die Nukleotide 241 bis 868 (entsprechend den Aminosäuren 24–231) aus der Genbank-Sequenz, X52425, kloniert. Für den IL-2R γ wurden die Nukleotide 15 bis 776 (entsprechend den Aminosäuren 1–233) aus der Genbank-Sequenz D11086 kloniert. Für den IL-6R α wurden die Nukleotide 52 bis 1044 (entsprechend den Aminosäuren 1–331) aus der Genbank-Sequenz X52425 kloniert. Für gp130 wurden die Nukleotide 322 bis 2112 (entsprechend den Aminosäuren 30–619) aus der Genbank-Sequenz M57230 kloniert.

BEISPIEL 6 – HERSTELLUNG VON FUSIONSPOLYPEPTIDEN (CYTOKIN-FALLEN)

[0124] Die Nukleotidsequenzen, welche die Cytokinfallen codierten, wurden aus den individuellen klonierten DNAs (obenstehend beschrieben) durch Standardklonierungs- und PCR-Techniken konstruiert. In jedem Fall wurden die Sequenzen so im Raster konstruiert, dass die Sequenz, welche die erste Fusionspolypeptidkomponente codiert, an die Sequenz fusioniert wurde, welche die zweite Fusionspolypeptidkomponente codiert, gefolgt von einer Fc-Domäne (Gelenk, CH2- und CH3-Region von humanem IgG1) als der multimerisierenden Komponente. In manchen Fällen wurden Extra-Nukleotide im Raster zwischen Sequenzen eingefügt, codierend die ersten und zweiten Fusionspolypeptid-Komponenten, um eine Linkerregion zwischen den zwei Komponenten hinzuzufügen (siehe [Fig. 21A–Fig. 21D](#) – Falle 424; [Fig. 24A–Fig. 24F](#) – Falle 412).

[0125] Für die IL-4-Fallen 424 ([Fig. 21A–Fig. 21D](#)), 603 ([Fig. 22A–Fig. 22D](#)) und 622 ([Fig. 23A–Fig. 23D](#)) liegt die IL-2R γ -Komponente 5', gefolgt von der IL4R α -Komponente und dann der Fc-Komponente. Für die IL-6-Fallen, 412 ([Fig. 24A–Fig. 24F](#)) und 616 ([Fig. 25A–Fig. 25F](#)) liegt die IL-6R α -Komponente 5', gefolgt von der gp130-Komponente und dann der Fc-Domäne. Die letztendlichen Konstrukte wurden in den Säugerexpressionsvektor pCDNA3.1 (STRATAGENE) kloniert.

[0126] In der 412-Sequenz ([Fig. 24A–Fig. 24F](#)) codieren die Nukleotide 1–993 die IL6R α -Komponente, die Nukleotide 994–1023 codieren eine Linkerregion, die Nukleotide 1024–2814 codieren die gp130-Komponente

und die Nukleotide 2815–3504 codieren die Fc-Domäne.

[0127] In der 616-Sequenz ([Fig. 25A–Fig. 25F](#)) codieren die Nukleotide 1–993 die IL6Ra-Komponente, die Nukleotide 994–2784 codieren die gp130-Komponente und die Nukleotide 2785–3474 codieren die Fc-Domäne.

[0128] In den Sequenzen 424 ([Fig. 21A–Fig. 21D](#)) und 622 ([Fig. 23A–Fig. 23D](#)) codieren die Nukleotide 1–762 die IL2Ry-Komponente, die Nukleotide 763–771 codieren eine Linkerregion, die Nukleotide 772–1395 codieren die IL4Ra-Komponente und die Nukleotide 1396–2082 codieren die Fc-Domäne.

[0129] Schließlich codieren in der 603-Sequenz ([Fig. 22A–Fig. 22D](#)) die Nukleotide 1–762 die IL2Ry-Komponente, die Nukleotide 763–1386 codieren die IL4Ra-Komponente und die Nukleotide 1387–2073 codieren die Fc-Domäne.

[0130] DNA-Konstrukte wurden entweder transient in COS-Zellen transfiziert oder stabil in CHO-Zellen transfiziert, durch Standardtechniken, welche dem Fachmann auf dem Gebiet allgemein bekannt sind. Überstände wurden aufgefangen und durch Protein A-Affinitäts-Chromatographie und Größenausschluss-Chromatographie mittels Standardtechniken gereinigt (siehe zum Beispiel Harlow und Lane, *Antibodies – A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988).

BEISPIEL 7: IL-4-BIOASSAY-PROTOKOLL UNTER VERWENDUNG VON TF-1 (ATCC)-ZELLEN.

Erforderliche Reagenzien und Ausrüstungen

MTT-Farbstoff-Lösung

MTT(3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl])(Sigma-Katalog # M2128)

Arbeitskonzentration: 5 mg wasserfreies MTT werden in 200 ml PBS ohne Ca^{+2} , Mg^{+2} aufgelöst.
Sterilfiltrieren und in aliquotierter Form aufbewahren bei -20°C .

Solubilisierungs-Lösung:

Für 1000 ml werden 100 g SDS, 950 ml dH₂O, 50 ml Dimethylformamid und 850 µl konzentriertes HCl vereinigt.
Es wird mit einer 0,45 µm-Filtereinheit sterilfiltriert.
Aufbewahren bei Raumtemperatur.

TF-1-Zell-Wachstumsmedium:

RPMI 1640, 10 % FBS, Pen/Strep, 2 mM L-Glutamin.

Sonstiges:

0,4 % Trypan-Blau-Färbung, sterile Röhrchen für Verdünnungen, sterile 96-Vertiefungs-Zellkulturplatten (Falcon #3072), Hämatomometer, Zentrifuge, ELISA-Platten-Lesegerät, Mehrkanal-Pipette für Volumen von 15, 25, 50 und 100 µl, sterile Reagenz-Reservoirs, sterile Pipettenspitzen, Handschuhe.

Assay-Protokoll

A. Herstellung von Assay-Platten

- Vorbereiten von sterilen 96-Vertiefungs-Gewebekulturplatten, um 50 µl Wachstumsmedium pro Vertiefung mit verschiedenen Konzentrationen an IL-4 und 10 nM IL-4-Antagonist zu enthalten. Dies kann durchgeführt werden durch Herstellen einer Arbeitsverdünnung von IL-4, welche das Vierfache der höchsten zu testenden Konzentration ist. In getrennten Röhrchen erfolgt eine zweifache serielle Verdünnung des IL-4. Zugeben von 25 µl jeder Verdünnung zu einer Reihe quer über die Platte (d. h. Reihe A erhält die höchste Konzentration, Reihe G erhält die niedrigste Konzentration). Zugeben von 25 µl Wachstumsmedium ohne IL-4 zu Reihe H. Vorbereiten der zu testenden Antagonisten durch Anfertigen einer Stammlösung, welche das Vierfache der Endkonzentration ist. Zugeben von 25 µl zu einem dreifach ausgefertigten Satz von IL-4-enthaltenden Vertiefungen (Spalten 1, 2, 3, A bis H). Vergewissern, dass Antagonist in Reihe H eingeschlossen wird.

2. Als eine Positivkontrolle wird ein Satz ohne Antagonist belassen. Diese Vertiefungen werden lediglich IL-4 und Medien enthalten.
3. Inkubieren der Platte während 1–2 Stunden bei 37 °C in einem befeuchteten 5 %-CO₂-Inkubator vor dem Vorbereiten von Zellen, welche für den Assay zu verwenden sind.

B. Vorbereitung von Zellen

4. Zweimaliges Waschen der Zellen durch Zentrifugation in Assay-Medium, welches frei von Wachstumsfaktor ist.
5. Bestimmen der Zellzahl und der Trypan-Blau-Lebensfähigkeit und Suspendieren der Zellen zu einer Endkonzentration von 8×10^5 /ml in Assay-Medium.
6. Austeilen von 50 µl der Zellsuspension (40 000 Zellen) in alle Vertiefungen der Platten. Das Gesamtvolumen sollte nun 100 µl/Vertiefung betragen.
7. Inkubiere die Platte bei 37 °C während 68 Stunden in einem befeuchteten 5 %-CO₂-Inkubator.

C. Farbentwicklung

8. Nach Inkubieren während 68 Stunden werden 15 µl der MTT-Farbstofflösung zu jeder Vertiefung zugesetzt.
9. Inkubiere die Platte bei 37 °C während 4 Stunden in einem angefeuchteten 5 %-Prozent CO₂-Inkubator.
10. Nach 4 Stunden werden 100 µl der Solubilisierungslösung zu jeder Vertiefung gegeben. Die Platte wird über Nacht in einem verschlossenen Behälter stehen gelassen, um die Formazan-Kristalle vollständig zu solubilisieren.
11. Aufzeichnung der Absorption bzw. Extinktion bei 570/650 nm.

ERGEBNISSE

[0131] Die [Fig. 27](#) zeigt, dass eine IL-4-Falle, bezeichnet als 4SC375, welche ein Fusionspolypeptid von IL-2Ry-scb-IL4Ra-FcΔC1 ist, als ein IL-4-Antagonist um mehrere Größenordnungen besser ist als IL4RaFcΔC1 allein, und zwar im TF1-Zell-Bioassay.

[0132] Die [Fig. 28](#) zeigt, dass die IL-4-Falle, welche als 4SC375 bezeichnet wird, antagonistische Aktivität im TF1-Zell-Bioassay zeigt, äquivalent zu einer IL-4-Falle, welche als 4SC424 bezeichnet wird, welche ein Fusionspolypeptid von IL-2Ry-IL4Ra-FcΔC1 ist, bei dem die IL-2Ry-Komponente mit der IL-4Ra-Komponente bündig ausgerichtet ist.

BEISPIEL 8: IL-6-BIOASSAY-PROTOKOLL UNTER VERWENDUNG VON XG-1-ZELLEN

Erforderliche Reagenzien und Gerätschaften

MTT-Farbstoff-Lösung

MTT(3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl])(Sigma-Katalog # M2128)

Arbeitskonzentration: 5 mg wasserfreies MTT werden in 200 ml PBS ohne Ca⁺², Mg⁺² aufgelöst.
Sterilfiltrieren und in aliquotierter Form aufbewahren bei –20 °C.

Solubilisierungs-Lösung:

Für 1000 ml werden 100 g SDS, 950 ml dH₂O, 50 ml Dimethylformamid und 850 µl konzentriertes HCl vereinigt.
Es wird mit einer 0,45-µm-Filtereinheit sterilfiltriert. Aufbewahren bei Raumtemperatur.

Assay-Medium:

RPMI 1640, 10 % FBS, Pen/Strep, 2 mM L-Glutamin, 50 µM Mercaptoethanol.

Sonstiges:

0,4 % Trypan-Blau-Färbung, sterile Röhrchen für Verdünnungen, sterile 96-Vertiefungs-Zellkulturplatten (Falcon #3072), Hämatomter, Zentrifuge, ELISA-Platten-Lesegerät, Mehrkanal-Pipette für Volumen von 15, 25, 50 und 100 µl, sterile Reagenzreservoirs, sterile Pipettenspitzen, Handschuhe.

Assay-Protokoll

A. Vorbereitung von Assay-Platten

1. Vorbereiten von sterilen 96-Vertiefungs-Gewebekulturplatten, um 50 µl Wachstumsmedium pro Vertiefung mit verschiedenen Konzentrationen an IL-6 und 10 nM IL-6-Antagonist zu enthalten. Dies kann durchgeführt werden durch Herstellen einer Arbeitsverdünnung von IL-6, welche das Vierfache der höchsten zu assayenden Konzentration ist. In getrennten Röhrchen erfolgt eine zweifache serielle Verdünnung des IL-6. Zugeben von 25 µl jeder Verdünnung zu einer Reihe quer über die Platte (d. h. Reihe A erhält die höchste Konzentration, Reihe G erhält die niedrigste Konzentration). Zugeben von 25 µl Wachstummedium ohne IL-6 zu Reihe H. Vorbereiten der zu testenden Antagonisten durch Anfertigen einer Stammlösung, welche das Vierfache der Endkonzentration ist. Zugeben von 25 µl zu einem dreifach ausgefertigten Satz von IL-6-enthaltenden Vertiefungen (Spalten 1, 2, 3, A bis H). Vergewissern, dass Antagonist in der Reihe H eingeschlossen ist. Eine typische IL-6-Titration beginnt bei 200 ng/ml, bis hinunter zu 3,1 ng/ml.
2. Als eine Positivkontrolle wird ein Satz ohne Antagonist belassen. Diese Vertiefungen werden IL-6 und Medien anstatt Antagonist enthalten.
3. Inkubieren der Platte während 1–2 Stunden bei 37 °C in einem befeuchteten 5 %-CO₂-Inkubator vor dem Vorbereiten von Zellen, welche für den Assay zu verwenden sind.

B. Vorbereitung von Zellen

4. Zweimaliges Waschen der Zellen durch Zentrifugation (5 Minuten bei 1000 U/min.) in Assay-Medium, welches frei von Wachstumsfaktor ist.
5. Bestimmen der Zellzahl und der Trypan-Blau-Lebensfähigkeit und Suspendieren der Zellen zu einer Endkonzentration von 8×10⁵/ml in Assay-Medium.
6. Austeiln von 50 µl der Zellsuspension (40 000 Zellen) in alle Vertiefungen der Platten. Das Gesamtvolumen sollte nun 100 µl/Vertiefung betragen.
7. Inkubieren der Platte bei 37 °C während 68 Stunden in einem befeuchteten 5 %-CO₂-Inkubator.

C. Farbentwicklung

8. Nach 68 Stunden werden 15 µl der Farbstofflösung zu jeder Vertiefung gegeben.
9. Inkubiere die Platte bei 37 °C während 4 Stunden in einem angefeuchteten 5 %-CO₂-Inkubator.
10. Nach 4 Stunden werden 100 µl der Solubilisierungslösung zu jeder Vertiefung gegeben. Die Platte wird über Nacht in einem verschlossenen Behälter stehen gelassen, um die Formazan-Kristalle vollständig zu solubilisieren.
11. Aufzeichnung der Extinktion bei 570/650 nm.

ERGEBNISSE

[0133] Die [Fig. 29](#) zeigt, dass die IL-6-Falle (6SC412 IL6R-scb-gpx-FcΔC1), welche in [Fig. 24A–Fig. 24F](#) beschrieben wird, ein besserer Antagonist von IL-6 im XG1-Bioassay ist als der neutralisierende monoklonale Antikörper gegen humanes IL-6 – BE8.

BEISPIEL 9 – KONSTRUKTION VON IL-13/IL-4-EINZELKETTEN-FALLEN

1. Um die IL-13/IL-4-Doppelfalle, bezeichnet als IL-4Ra(IL-13Ra1Fc), zu erzeugen, wurden die extrazelluläre Domäne von humanem IL-4Ra (entsprechend den Nukleotiden #1-693 von [Fig. 31A–Fig. 31G](#)) und die extrazelluläre Domäne von humanem IL-13Ra1 (entsprechend den Nukleotiden #700-1665 von [Fig. 31A–Fig. 31G](#)), durch Standard-PCR-Techniken amplifiziert und in einen Expressionsvektor pMT21 ligiert, welcher die humane Fc-Sequenz (entsprechend den Nukleotiden #1671–2355 von [Fig. 31A–Fig. 31G](#)) enthielt, wodurch ein Fusionsprotein erzeugt wurde, welches aus dem IL-4Ra, IL-13Ra1 und der Gelenk-, CH2- und CH3-Region von humanem IgG1, vom N- zum C-Terminus, besteht. Darüber hinaus wurde ein Zwei-Aminosäuren-Linker (entsprechend den Nukleotiden #694-699 von [Fig. 31A–Fig. 31G](#)) mit der Aminosäuresequenz SerGly im Raster zwischen dem IL-4Ra und dem IL-13Ra1 konstruiert, und ein Zwei-Aminosäuren-Linker (entsprechend den Nukleotiden #1666–1671 von [Fig. 31A–Fig. 31G](#)) mit der Aminosäuresequenz ThrGly wurde im Raster zwischen dem IL-13Ra1 und dem Fc-Teil konstruiert. Alle Sequenzen wurden hinsichtlich der Sequenz mittels Standardtechniken bestätigt. Die IL-4Ra(IL-13Ra1Fc) codierende Sequenz wurde dann in den Expressionsvektor pCDNA3.1 (Stratagene) unter Verwendung von standardmäßigen Molekularbiologie-Techniken subkloniert.

2. Um die IL-13/IL-4-Doppelfalle, bezeichnet als IL-13Ra1.IL-4Ra.Fc, zu erzeugen, wurden die extrazelluläre Domäne von IL-13Ra1 (entsprechend den Nukleotiden #1-1029 von [Fig. 32A–Fig. 32G](#)) und der humane IL-4Ra (entsprechend den Nukleotiden #1060-1692 von [Fig. 32A–Fig. 32G](#)) mittels Standard-PCR-Techniken amplifiziert und in den Expressionsvektor pJFE14 ligiert, welcher die humane Fc-Sequenz enthält (entsprechend den Nukleotiden #1699-2382 von [Fig. 32A–Fig. 32G](#)), um ein Fusionsprotein zu erzeugen, das aus dem IL-13Ra1, IL-4Ra und der Gelenk-, CH2- und CH3-Region von humanem IgG1, vom N- zum C-Terminus, besteht. Darüber hinaus wurde ein Zehn-Aminosäuren-Linker mit der Aminosäuresequenz GlyAlaProSerGlyGlyGlyArgPro (entsprechend Nukleotid #1030-1059 von [Fig. 32A–Fig. 32G](#)) im Raster zwischen dem IL-13Ra1 und dem IL-4Ra konstruiert, und ein Zwei-Aminosäuren-Linker (entsprechend den Nukleotiden #1693-1698 von [Fig. 32A–Fig. 32G](#)) mit der Aminosäuresequenz SerGly wurde im Raster zwischen IL-4Ra und dem Fc-Teil konstruiert. Alle Sequenzen wurden hinsichtlich der Sequenz unter Anwendung von Standardtechniken überprüft. Die codierende Sequenz von IL-13Ra1.IL-4Ra.Fc wurde dann in den Expressionsvektor pCDNA3.1 (Stratagene) unter Anwendung von Molekularbiologie-Standardtechniken subkloniert.

BEISPIEL 10: EXPRESSION VON IL-4Ra.IL-13Ra1.Fc UND IL-13Ra1.IL-4Ra.Fc

[0134] In großem Maßstab (1 Liter) angesetzte Kulturen von dem pCAE801 (dem DNA-Vektorkonstrukt, welches IL-4Ra.IL-13Ra1.Fc codiert) und pCAE802 (dem DNA-Plasmidkonstrukt, welches IL-13Ra1.IL-4Ra.Fc codiert) in DH10B-Zellen wurden über Nacht in LB + Ampicillin wachsen gelassen, und die Plasmid-DNA wurde extrahiert unter Anwendung eines Qiagen Endofree Mega-Kits unter Befolgung des Protokolls des Herstellers. Die Konzentration der gereinigten Plasmid-DNA wurde in einem UV-Spektrophotometer und Fluorometer bestimmt. Die Plasmid-DNA wurde auch durch Verdau von Aliquots mit den Restriktionsenzymen BbsI, XmnI und NcoI überprüft. Alle Restriktionsenzymverdau-Fragmente entsprachen den vorhergesagten Größen in einem 1 %igen Agarosegel.

[0135] Vierzig 15-cm-Petrischalen wurden mit CHO-K1/E1A-Zellen bei einer Dichte von 4×10^6 Zellen/Platte angeimpft. Das Plattierungsmedium war Gibco Ham's F-12 mit 10 % Hyclone-Fötal-Rinderserum (FBS) + Penicillin/Streptomycin, und war mit Glutamin ergänzt. Am folgenden Tag wurde jede Platte mit 6 µg pCAE801 oder pCAE802 unter Verwendung von Gibco Optimem und Gibco Lipofectamin in einem Volumen von 12 ml unter Befolgung des Protokolls des Herstellers transfiziert. Vier Stunden nach Zugeben der Transfektionsmischung zu den Zellen wurde 12 ml/Platte Optimem mit 10 % FBS zugesetzt. Die Platten wurden bei 37 °C in einem 5 %-CO₂-Inkubator über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Medien von jeder Platte entfernt und 25 ml Expressionsmedium (Gibco CHO-S-SFM II mit Glutamin + 1 mM Natriumbutyrat) wurde zugegeben. Die Platten wurden drei Tage lang bei 37 °C inkubiert.

[0136] Nach 3 Tagen Inkubation wurden die Medien von jeder Platte entfernt und bei 400 U/min. in einem Ausschwingbecher-Rotor zentrifugiert, um die Zellen zu pellettieren. Der Überstand wurde in sterile 1-Liter-Flaschen dekantiert, und exprimiertes Protein wurde gereinigt, wie nachstehend beschrieben.

BEISPIEL 11: REINIGUNG VON IL-4Ra.IL-13Ra1.Fc UND IL-13Ra1.IL-4Ra.Fc-PROTEIN AUS KULTURMEDIEN

1. Reinigung von IL-4Ra.IL-13Ra1.Fc.

[0137] Humanes IL-4Ra.IL-13Ra1.Fc wurde in CHO-Zellen transient exprimiert, und Überstände wurden aus Platteninfektionen, wie oben beschrieben, geerntet. Die Expression des sezernierten Proteins wurde durch einen Sandwich-ELISA unter Verwendung von Ziege-Anti-hIgG(γ-Ketten-spezifisch; Sigma 1-3382)- und Ziege-AntihIgG(Fc-spezifisch)-FITC-Konjugat (Sigma F9512)-Einfang- bzw. Reporter-Antikörpern bestimmt. Die Ausbeute reichte von 5,8 bis 9,2 mg (durchschnittlich 7,5 mg) pro Liter konditioniertem Medium. Complete™-Proteaseinhibitor-Tabletten (Roche Diagnostics Corp.) wurden in die Medien hinein gelöst (1 Tablette/Liter). Das konditionierte Medium wurde sterilfiltriert (0,22 µm Porengröße) vor Auftragen auf eine voräquilibrierte, 5 ml große HiTrap®-Protein A-Affinitätssäule (Amersham Pharmacia Biotech) in Dulbecco's PBS-Puffer (Life Technologies), pH 7,4 bei 4 °C. Die Fließgeschwindigkeit belief sich auf ~ 1–2 ml/min. Die Säule wurde gründlich mit PBS-Puffer gewaschen, um nichtspezifisch gebundene Proteine aus der Säule zu entfernen. IL-4Ra.IL-13Ra1.Fc wurde unter Verwendung von 20 mM Natriumcitrat, 150 mM NaCl, pH 3,5 eluiert. Das Eluat wurde unverzüglich durch Titrieren mit 1 M Tris-OH neutralisiert. Die Fraktionen, welche Protein enthielten, wurden vereinigt und unverzüglich in PBS-Puffer, pH 7,4, bei 4 °C dialysiert. Die Ausbeute aus der Protein A-Reinigung belief sich auf 6,8 mg (73 %). IL-4Ra.IL-13Ra1.Fc wurde ferner durch Größenauflösung-Chromatographie gereinigt, wobei eine Superose-6-Säule (25 ml Bettvolumen; Amersham Pharmacia Biotech) ver-

wendet wurde, die voräquilibriert war in PBS, 5 % v/v Glycerol, pH 7,4 bei Umgebungstemperatur. Die Fließgeschwindigkeit belief sich auf 0,5 ml/min. Proteinfraktionen wurden aus einer Coomassiegefärbten nicht-reduzierten und reduzierten SDS-PAGE (Novex NuPAGE 4–12 % Bis-Tris-Gele) eingeschätzt. Die Fraktionen wurden konservativ vereinigt, um die Menge an aggregiertem Protein zu reduzieren. Die Gesamtausbeute belief sich auf 51 (4,4 mg) mit einer Reinheit von 97 %, wie durch SDS-PAGE beurteilt wurde. Gereinigtes IL-4Ra.IL-13Ra1.Fc wurde analysiert durch nicht-reduzierte bzw. nichtreduzierende und reduzierte SDS-PAGE (4–12 % Bis-Tris), analytische Größenausschluss-Chromatographie (Tosohas TSKG4000SWXL), N-terminale Sequenzierung und Immunoblotting mit Ziege-Anti-hIgG-HRP-Konjugat (Promega W403B) und ebenfalls monoklonalem Maus-Anti-hIL-4R (R&D MAB230), gefolgt von Anti-mIgG-HRP-Konjugat (Promega W402B) als dem sekundären Antikörper.

2. Reinigung von IL-13Ra1.IL-4Ra.Fc

[0138] Humanes IL-13Ra1.IL-4Ra.Fc wurde in CHO-Zellen transient exprimiert, und Überstände wurden aus Plattentransfektionen, wie oben beschrieben, geerntet. Die Expression des sezernierten Proteins wurde durch einen Sandwich-ELISA unter Verwendung von Ziege-Anti-hIgG (γ -Ketten-spezifisch; Sigma 1-3382)- und Ziege-AntihIgG(Fc-spezifisch)-FITC-Konjugat (Sigma F9512)-Einfang- bzw. Reporter-Antikörpern bestimmt. Die Ausbeute belief sich auf 8,8 mg pro Liter konditioniertem Medium. Complete™-Proteaseinhibitor-Tabletten (Roche Diagnostics Corp.) wurden in dem Medium gelöst (1 Tablette/Liter). Die konditionierten Medien wurden sterilfiltriert (0,22 μ m Porengröße) vor dem Auftragen auf eine voräquilierte, 5 ml große HiTrap®-Protein A-Affinitätssäule (Amersham Pharmacia Biotech) in Dulbecco's PBS-Puffer (Life Technologies), pH 7,4 bei 4 °C. Die Fließgeschwindigkeit belief sich auf ~ 1–2 ml/min. Die Säule wurde gründlich mit PBS-Puffer gewaschen, um nichtspezifisch gebundene Proteine aus der Säule zu entfernen. IL-13Ra1.IL-4Ra.Fc wurde unter Verwendung von 20 mM Natriumcitrat, 150 mM NaCl, pH 3,5 eluiert. Das Eluat wurde unverzüglich durch Titrieren mit 1 M Tris-OH neutralisiert. Die Fraktionen, welche Protein enthielten, wurden vereinigt und unverzüglich in PBS-Puffer, pH 7,4, bei 4 °C dialysiert. Die Ausbeute aus der Protein A-Reinigung belief sich auf 3,8 mg (43 %). IL-13Ra1.IL-4Ra.Fc wurde ferner durch Größenausschluss-Chromatographie unter Verwendung einer Superose-6-Säule (25 ml Bettvolumen; Amersham Pharmacia Biotech), voräquilibriert in PBS, 5 % v/v Glycerol, pH 7,4, bei Umgebungstemperatur, gereinigt. Die Fließgeschwindigkeit belief sich auf 0,5 ml/min. Proteinfraktionen wurden eingeschätzt aus einer Coomassie-gefärbten nicht-reduzierten und reduzierten SDS-PAGE (Novex NuPAGE 4–12 % Bis-Tris-Gele). Fraktionen wurden konservativ vereinigt, um die Menge an aggregiertem Protein zu reduzieren. Die Gesamtausbeute belief sich auf 17 % (1,5 mg) mit einer Reinheit von 95 %, wie beurteilt durch SDS-PAGE. Gereinigtes IL-13Ra1.IL-4Ra.Fc wurde analysiert durch nicht-reduzierte und reduzierte SDS-PAGE (4–12 % Bis-Tris), analytische Größenausschluss-Chromatographie (Tosohas TSKG4000SWXL), N-terminale Sequenzierung und Immunoblotting mit Ziege-Anti-hIgG-HRP-Konjugat (Promega W403B) und auch monoklonalem Maus-Anti-hIL-4Ra (R&D MAB230), gefolgt von Anti-mIgG-HRP-Konjugat (Promega W402B) als dem sekundären Antikörper.

BEISPIEL 12: BLOCKIERUNG VON IL-4 UND IL-13 DURCH IL-4Ra.IL-13Ra.Fc UND IL-13Ra1.IL-4Ra.Fc

Materialien und Methoden

[0139] TF1-Bioassay. TF1-Zellen wurden in Wachstumsmedium (10 ng/ml GM-CSF, RPMI 1640, 10 % FBS, L-Glutamin, Penicillin, Streptomycin) gehalten. Für den Bioassay wurden Zellen zweimal in Assaymedium (wie oben, aber ohne GM-CSF) gewaschen und dann bei 2×10^5 Zellen in 50 μ l Assaymedium ausplattiert. Die gereinigten IL-4Ra.IL-13Ra1.Fc- und IL-13Ra1.IL-4Ra.Fc-Proteine wurden in Assaymedium bei einer Konzentration von 40 nM verdünnt. 25 μ l von jeder der Fallen wurde zu den Zellen gegeben. Entweder IL-13 oder IL-4 wurden zu 40 nM in Assaymedien verdünnt und dann wurden 2-fach-Verdünnungsreihen in Assaymedium vorgenommen. 25 μ l entweder von IL-13 oder IL-4 wurde dann zu den Vertiefungen gegeben, welche die Zellen und die Fallen enthielten. Die Zellen wurden dann bei 37 °C, 5 % CO₂, während ~ 70 Stunden inkubiert. Das Ausmaß der TF1-Zellproliferation wurde durch den MTS-Assay gemäß dem Protokoll des Herstellers (Promega, Inc.) gemessen.

ERGEBNISSE

[0140] Die Fähigkeit der IL-4Ra.IL-13Ra1.Fc- und IL-13Ra1.IL-4Ra.Fc-Fallen, sowohl humane IL-13- als auch humane IL-4-Aktivität zu blockieren, wurde im oben beschriebenen TF1-Bioassay gemessen. IL-13 stimuliert die Proliferation von TF1-Zellen, mit einem halbmaximalen Wachstum bei einer Konzentration von 0,2 nM. Die Zugabe von entweder IL-4Ra.IL-13Ra1.Fc- oder IL-13Ra1.IL-4Ra.Fc-Falle bei einer Konzentration von 10 nM blockiert IL-13-induziertes Wachstum bis zu ~ 2 nM ([Fig. 33](#)). Bei einer IL-13-Konzentration von ~

4–5 nM wird das Wachstum von TF1-Zellen um 50 inhibiert. TF1-Zellen sind empfindlicher gegenüber IL-4, welches ihre Proliferation mit einem halbmaximalen Wachstum bei 0,02 nM stimuliert. Die Zugabe von entweder IL-4R α .IL-13R α 1.Fc oder IL-13R α 1.IL-4R α .Fc bei einer Konzentration von 10 nM blockiert IL-4-induziertes Wachstum bis zu ~ 1 nM ([Fig. 34](#)). Bei einer IL-4-Konzentration von ~ 3–4 nM wird das Wachstum von TF1-Zellen um 50 % inhibiert. Diese Ergebnisse zeigen, dass sowohl IL-4R α .IL-13R α 1.Fc als auch IL-13R α 1.IL-4R α .Fc die Fähigkeit von sowohl IL-13 als auch IL-4, zelluläre Antworten zu stimulieren, blockieren können.

BEISPIEL 13: AUSWERTUNG DER FÄHIGKEIT EINER IL-4-FALLE DIE PHYSIO-LOGISCHEN ANTWORTEN AUF HUMANES IL-4 IN CYNOMOLOGUS-AFFEN ZU BLOCKIEREN.

[0141] Eine systemische Verabreichung von humanem IL-4 ruft systemische Antworten in Cynomologus-Affen (Gundel et al., 1996) hervor. Daher kann die Wirksamkeit der IL-4-Falle in der Blockierung von humanem IL-4 durch Messen dieser Antworten verdeutlicht werden.

Experimentelle Auslegung:

[0142] Das Experiment bestand aus 3 Teilen: Humanes IL-4 + Vehikel (Teil 1), humanes IL-4 + IL-4-Falle (Teil 2), und humanes IL-4 + Vehikel (Teil 3). Humanes IL-4 (25 µg/kg) wurde zweimal täglich subkutan während 4 Tagen injiziert, und IL-4-Falle (8 mg/kg) und Vehikel wurden intravenös täglich während 5 Tagen verabreicht, beginnend 1 Tag vor der Verabreichung von humanem IL-4. Gesamtblut wurde täglich für die Flusszytometrie-Analyse hinsichtlich CD16 aufgefangen, und Plasma wurde zum Assay hinsichtlich des Cytokins "Monocyten-chemotaktisches Protein 1" (MCP-1) erhalten. CD16 und MCP-1 sind Marker von IL-4-vermittelter Entzündung sowohl in Menschen als auch Affen.

ERGEBNISSE

[0143] In Gegenwart von humanem IL-4 stieg MCP-1 um das 2,5-Fache und wurde signifikant durch die IL-4-Falle blockiert ([Fig. 36A](#)). In ähnlicher Weise wurde die Verringerung im Prozentgehalt an CD16-positiven Lymphozyten im peripheren Blut durch die IL-4-Falle abgeschwächt ([Fig. 36B](#)). Nach einer Ruheperiode erhielten die Affen erneut eine Injektion mit humanem IL-4, und die Antwortfähigkeit der Tiere auf humanes IL-4 wurde erneut bestätigt ([Fig. 36A](#) und [Fig. 36B](#)), was nahe legt, dass die Inhibition der MCP-1- und CD16-Antworten spezifisch vermittelt wird von der IL-4-Falle.

BEISPIEL 14: DIE EFFEKTE VON IL-4-FALLE AUF IL-4-INDUZIERTE IgE-SEKRETION.

[0144] Es ist gezeigt worden, dass die Injektion von Anti-Maus-IgD-Antikörper eine IL-4-vermittelte IgE-Erhöhung in normalen Mäusen stimuliert. Dieses Modell ist weithin verwendet worden, um IL-4-Antagonisten, wie löslichen IL-4-Rezeptor und monoklonale Anti-IL-4-Antikörper, auszuwerten (Sato et al., 1993). Wir entschieden uns, dieses Modell anzuwenden, um das Vermögen der IL-4-Falle auszuwerten, IL-4-vermittelte Erhöhungen von IgE zu blockieren.

Experimentelle Auslegung:

[0145] BALB/C-Mäuse, welche eine Injektion mit Anti-Maus-IgD (100 µl/Maus, s. c.) erhalten hatten, wurden statistisch in 3 Gruppen unterteilt. Jede erhielt (an den Tagen 3–5) entweder Vehikel, Maus-IL-4-Falle (1 mg/kg, s. c.) oder einen monoklonalen Antikörper gegen Maus-IL-4 (1 mg/kg, s. c.). Serum wurde an verschiedenen Zeitpunkten abgenommen und bezüglich IgE-Spiegeln getestet.

ERGEBNISSE

[0146] Die Behandlung mit der murinen IL-4-Falle oder dem Maus-IL-4-Antikörper antagonisierte beiderfalls die IL-4-vermittelte IgE-Erhöhung in diesem Mausmodell signifikant ([Fig. 37](#)). Dies legt nahe, dass die murine IL-4-Falle murines IL-4 bindet und den physiologischen Antworten entgegenwirkt, welche von endogenem IL-4 in vivo hervorgerufen werden.

[0147] Die vorliegende Erfindung soll hinsichtlich des Umfangs nicht durch die hierin beschriebenen Ausführungsformen eingeschränkt sein. In der Tat werden verschiedene Modifikationen der Erfindung, über diejenigen hinaus, welche hierin beschrieben wurden, dem Fachmann auf dem Gebiet aus der vorangehenden Beschreibung und den begleitenden Figuren offensichtlich werden. Es wird beabsichtigt, dass derartige Modifika-

tionen innerhalb des Umfangs der beigefügten Patentansprüche liegen.

Patentansprüche

1. Isoliertes Nukleinsäuremolekül, welches ein Fusionspolypeptid kodiert, wobei das Fusionspolypeptid die folgenden Fusionspolypeptidkomponenten umfasst:
 - (a) ein Cytokin-Bindungsteil der extrazellulären Domäne der Spezifitätbestimmenden Komponente eines Cytokin-Rezeptors;
 - (b) ein Cytokin-Bindungsteil einer extrazellulären Domäne der Signaltransduzierenden Komponente eines Cytokin-Rezeptors; und
 - (c) Multimerisierungs-Komponente;
wobei die Multimerisierungs-Komponente (c) mit einer Multimerisierungs-Komponente (c), die in einem anderen der Fusionspolypeptide vorhanden ist, multimerisiert, wodurch ein Multimer der Fusionspolypeptide gebildet wird;
wobei das Multimer an einem Cytokin bindet und es einfängt und somit als ein Antagonist des Cytokins wirkt; und
wobei das Cytokin aus Interleukin-4 (IL-4), Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-13 (IL-13) gewählt wird.
2. Isoliertes Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 1, wobei das Cytokin IL-4 ist, die Komponente (a) des Fusionspolypeptids einen IL-4-Bindungsteil einer extrazellulären Domäne von IL-4R umfasst und die Komponente (b) einen IL-4-Bindungsteil einer extrazellulären Domäne vom IL-2R umfasst.
3. Isoliertes Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 1, wobei das Cytokin IL-4 ist, die Komponenten (a) und (b) des Fusionspolypeptids einen Cytokin-Bindungsteil einer extrazellulären Domäne von IL-4R und einen Cytokin-Bindungsteil einer extrazellulären Domäne von IL-13R1 umfasst und das Multimer an IL-13 bindet, es einfängt und als ein Antagonist davon wirkt.
4. Isoliertes Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 1, wobei das Cytokin IL-6 ist, die Komponente (a) einen IL-6-Bindungsteil von IL6Ra umfasst und die Komponente (b) einen IL-6-Bindungsteil von gp130 umfasst.
5. Isoliertes Nukleinsäuremolekül gemäß mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Multimer ein Dimer ist.
6. Isoliertes Nukleinsäuremolekül gemäß mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Multimerisierungskomponente eine von Immunoglobulin abgeleitete Domäne ist.
7. Isoliertes Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 6, wobei die vom Immunoglobulin abgeleitete Domäne aus der fc-Domäne von IgG, der schweren Kette von IgG und der leichten Kette von IgG gewählt ist.
8. Isoliertes Nukleinsäuremolekül gemäß mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Nukleotidsequenz, welche die Komponente (a) kodiert, stromaufwärts der Nukleotidsequenz, die die Komponente (b) kodiert, liegt.
9. Isoliertes Nukleinsäuremolekül gemäß mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Nukleotidsequenz, welche die Komponente (a) kodiert, stromabwärts der Nukleotidsequenz, welche die Komponente (b) kodiert, liegt.
10. Multimer, umfassend zwei oder mehrere Fusionspolypeptide, die durch die Nukleinsäuremoleküle nach einem der vorhergehenden Ansprüche kodiert werden, wobei das Multimer an Cytokin bindet und dieses einfängt und somit als ein Antagonist des Cytokins wirkt.
11. Multimer gemäß Anspruch 10, welches ein Dimer ist, das zwei der Fusionspolypeptide umfasst.
12. Vektor, welcher das Nukleinsäuremolekül gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 9 umfasst.
13. Expressionsvektor, der ein Nukleinsäuremolekül nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 9 umfasst, wobei das Nukleinsäuremolekül in funktionsfähiger Weise an einer Expressionskontrollsequenz gebunden ist.
14. Wirt-Vektor-System zur Herstellung eines Fusionspolypeptids, welches den Expressionsvektor von An-

spruch 13 in einer Wirtszelle umfasst.

15. Wirt-Vektor-System gemäß Anspruch 14, wobei die Wirtszelle eine Bakterienzelle, Hefezelle, Insektenzelle oder Säugerzelle ist.

16. Wirt-Vektor-System gemäß Anspruch 14, wobei die Wirtszelle E. coli, eine COS-Zelle, eine CHO-Zelle, eine 293-Zelle, eine BHK-Zelle oder eine NSO-Zelle ist.

17. Verfahren zur Herstellung von Fusionspolypeptiden, welches das Wachsenlassen von Zellen des Wirt-Vektor-Systems von Anspruch 14, 15 oder 16 unter Bedingungen umfasst, die die Herstellung der Fusionspolypeptide und das Gewinnen der so hergestellten Fusionspolypeptide erlauben.

18. Verfahren gemäß Anspruch 17, ferner umfassend, dass es den Fusionspolypeptiden gestattet wird, Multimere von Fusionspolypeptiden zu bilden, wie in Anspruch 13 definiert.

19. Verfahren gemäß Anspruch 18, wobei die Multimere Dimere sind, wie in Anspruch 11 definiert.

20. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend ein Multimer von Anspruch 10 oder ein Dimer von Anspruch 11 in einer(n) pharmakologisch annehmbaren Flüssigkeit, Träger oder halbfesten Träger, geknüpft an einen Träger oder ein Zielsuchmolekül und/oder eingebracht in Liposomen, Mikrokapseln oder eine Präparation mit regulierter Freisetzung.

21. Multimer gemäß Anspruch 10 oder ein Dimer gemäß Anspruch 11 zur Verwendung bei der Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers.

Es folgen 59 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

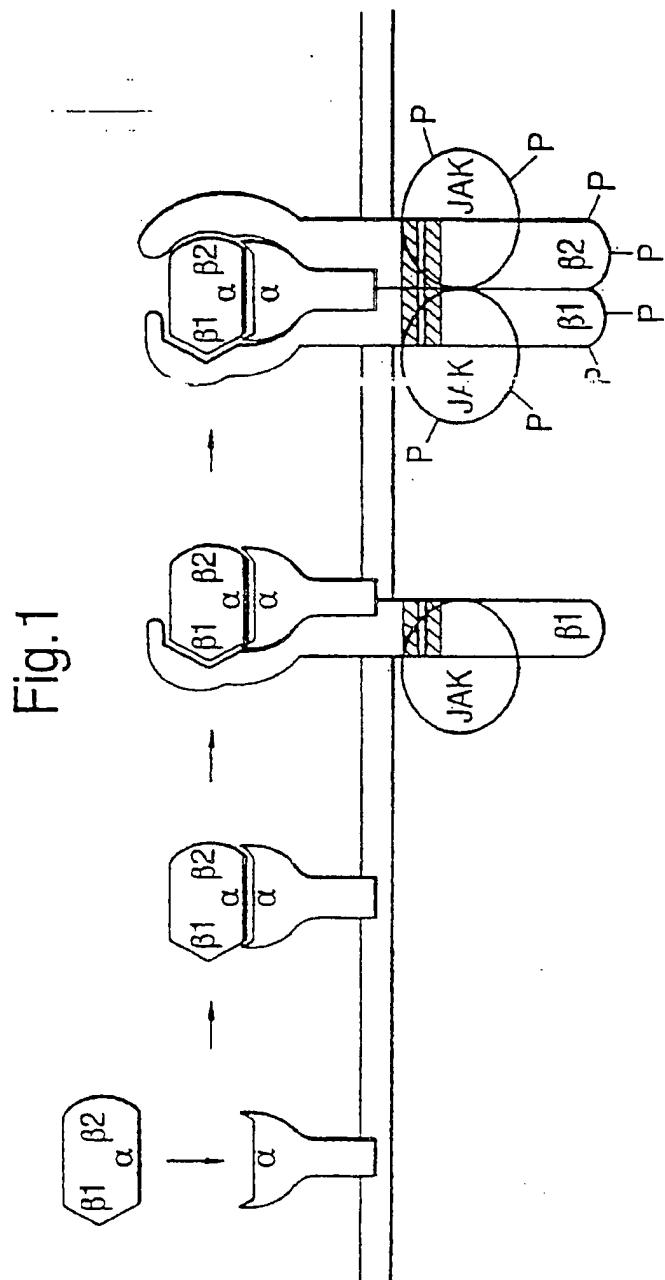


Fig.2

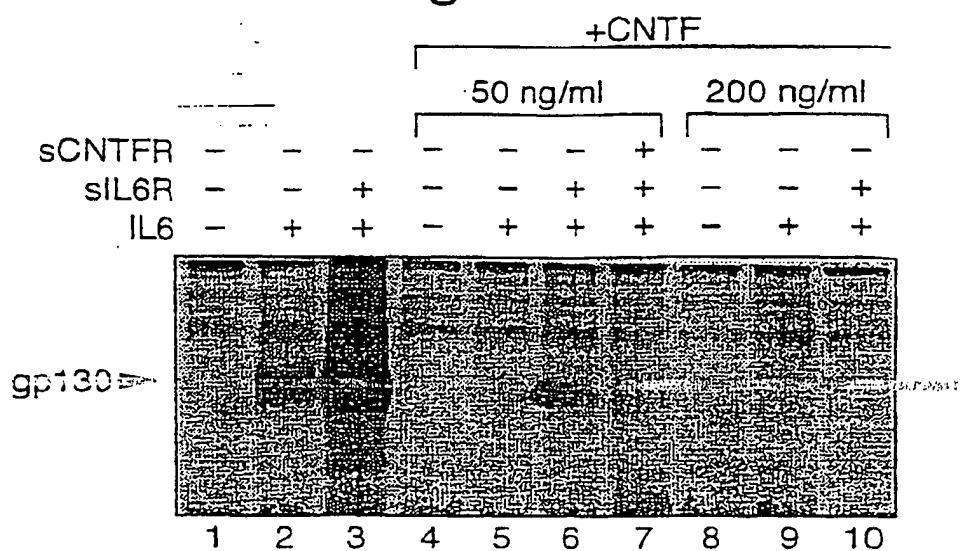


Fig.3

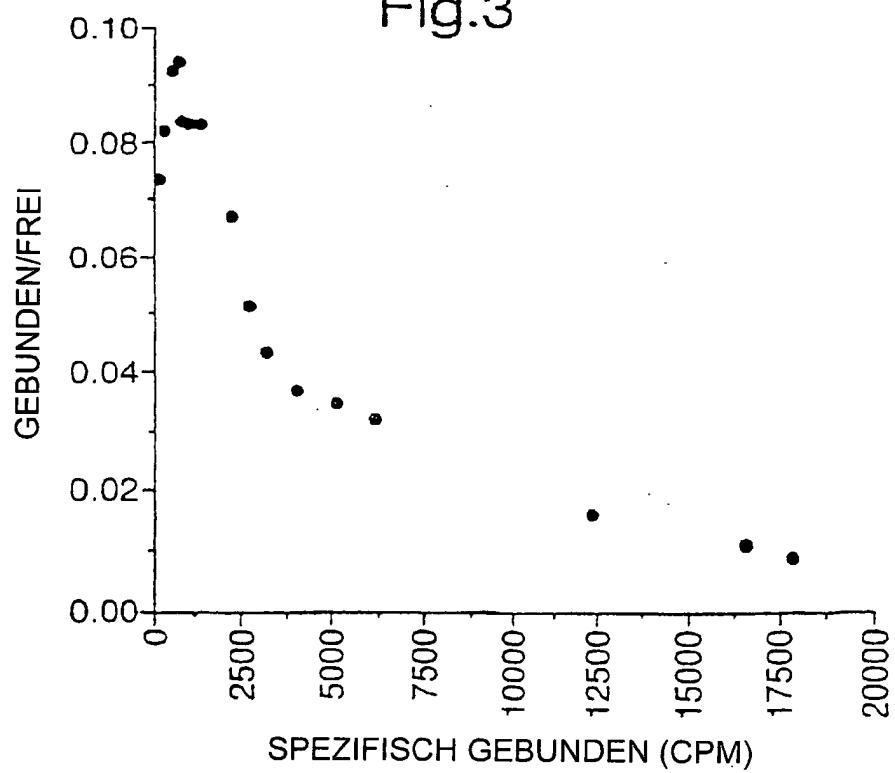


Fig.4

Aminosäuresequenz von humanem gp130-Fc-His6

Sequenzbereich: 1 bis 861

10	20	30	40	50	60
*	*	*	*	*	*
MVTLQTWVVQALFIFLTTE	S	TGELLDPCGYISPESPVVOL	HSNFTAVCVLKEKCMDYFHV		
70	80	90	100	110	120
*	*	*	*	*	*
NANYIVWKTNHFTIPKEQYT	I	IINRTASSVTFTDIASLNIQ	LTCNILTGFQLEQNIVYGITI		
130	140	150	160	170	180
*	*	*	*	*	*
ISGLPPEKPKNLSCIVNEGK	KMRCEWDGGRETHLETMFTL	KSEWATHKFADCKAKRDTPT			
190	200	210	220	230	240
*	*	*	*	*	*
SCTVDYSTVYFVNIEVVVEA	ENALGKVTS	DHINFDPVYKV	KPNPPHNLSVINSEELSSIL		
250	260	270	280	290	300
*	*	*	*	*	*
KLTWTNPSIKSVIILKYNIQ	YRTKDASTWSQIPPEDTAST	RSSFTVQDLKPPTEYVFRIR			
310	320	330	340	350	360
*	*	*	*	*	*
CMKEDGKGWSDWSEEASGI	TYEDRPSKAPSFWYKIDPSH	TQGYRTVQLWWKTLPPFEAN			
370	380	390	400	410	420
*	*	*	*	*	*
GKILDYEVTLTRWKSHLQNY	TVNATKLT	VNLTNDRYLATL	TVRNLVKGKSDAAVLTI	PACD	
430	440	450	460	470	480
*	*	*	*	*	*
FQATHPVM	DLKA	FPKDNMLW	VEWTTPRE	S	S
S	SPVKKYILEWCVL	SDKAPCITDWQQEDGT	VHRT		
490	500	510	520	530	540
*	*	*	*	*	*
YLRGNLAESKCYLITVTPVY	ADGPGSPESI	KAYLKQAPP	KGPTVR	T	KVGKNEAVLEWD
550	560	570	580	590	600
*	*	*	*	*	*
QLPVDVQNGFIRNYTIFYRT	IIGNETAVNV	DSHTEYTLS	SLTSDTLYMVRMAAYT	DEGG	
610	620	630	640	650	660
*	*	*	*	*	*
KDGPEFTFTTPKFAQGEIES	GEPKSCDKTHC	PPCPAPEL	LGGPSVLF	FPPKPKDTLMIS	
670	680	690	700	710	720
*	*	*	*	*	*
RTPEVTCVVVDVSHEDPEVK	FNWYUDGVEVHN	AKTKPREE	OYNSTYRVVSVLTVL	HODWL	
730	740	750	760	770	780
*	*	*	*	*	*

Fig.4 (Fortsetzung)

NGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGOPREPOVYTLPPS RDELTKNOVSLTCLVKGFYP
 790 800 810 820 830 840
 * * * * * *
SDIAVEWESNGOPENNYKTT PPVLDSDGSEFLYSKLTVDK SRWOOGNVSCSVHEALHN
 850 860 * * * *
HYTOKSLSLSPGKHHHHHH.

Fig.5

Die Aminosäuresequenz von humanem IL-6R α -Fc

Sequenzbereich: 1 bis 594

10	20	30	40	50	60
*	*	*	*	*	*
MVAVGCALLAALLAAPGAAL APRRCPAQEVARGVLTSLPG DSVTLTCPGVEPEDNATVHW					
70	80	90	100	110	120
*	*	*	*	*	*
VLRKPAAGSHPSRWAGMGRR LLLRSVQLHDSGNYSGYRAG RPAGTVHLLVDVPPEEPQLS					
130	140	150	160	170	180
*	*	*	*	*	*
CFRKSPLSNVVCEWGPRSTP SLTTKAVLLVRKFQNSPAED FQEPCQYSQESQKFSCQLAV					
190	200	210	220	230	240
*	*	*	*	*	*
PEGDSSFYIVSMCVASSVGS KFSKTQTFQGGCGILQPDPAA NITVTAVARNPRWLSVTWQD					
250	260	270	280	290	300
*	*	*	*	*	*
PHSWNSSFYRLRFELRYRAE RSKTFTTWMVKDLQHHCVIH DAWSGLRHVQLRAQEEFGQ					
310	320	330	340	350	360
*	*	*	*	*	*
GEWSEWSPEAMGTPWTESRP PPAENEVSTPMQALTNNKDD DNILFRDSANATSLPVQDAG					
370	380	390	400	410	420
*↑	*	*	*	*	*
<u>EPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPPDKDTLMISR TPEUTCVVUDVSHEDPEVKF</u>					
430	440	450	460	470	480
*	*	*	*	*	*
<u>NWYVDGVEVHNNAKTKPREEO YNSTYRVVSVLTVLHODWLNGKEYKCKVSNKALPAPIKT</u>					
490	500	510	520	530	540
*	*	*	*	*	*
<u>TISKAKGOPREPOVYTLPPSR DELTKNOVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGOPENNYKTP</u>					
550	560	570	580	590	
*	*	*	*	*	
<u>PVLDSDGSEFLYSKLTVDKS RWOOGNVSCSVHEALHNHYTOKSLSLSPGK.</u>					

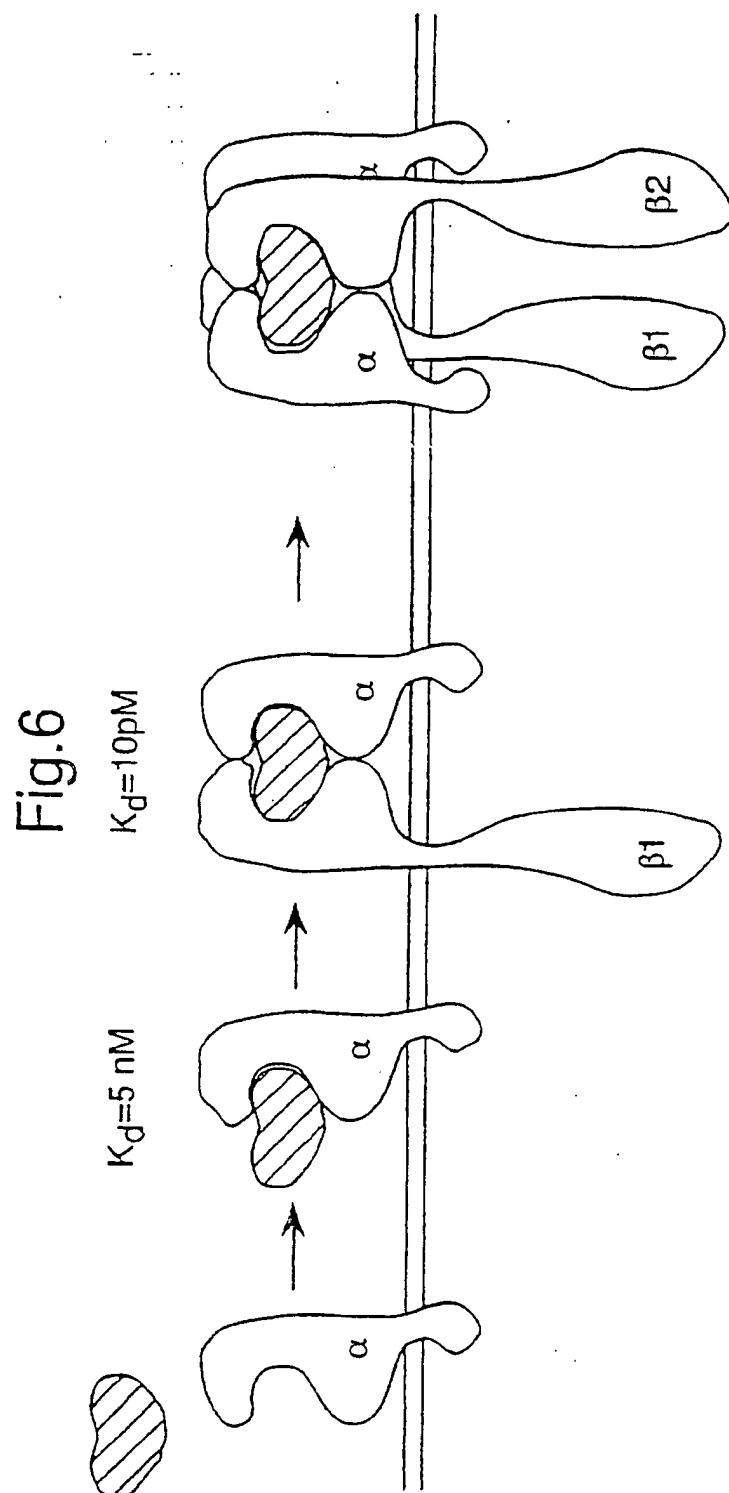


Fig. 7

Heterodimere Rezeptor-basierende Ligandenfälle

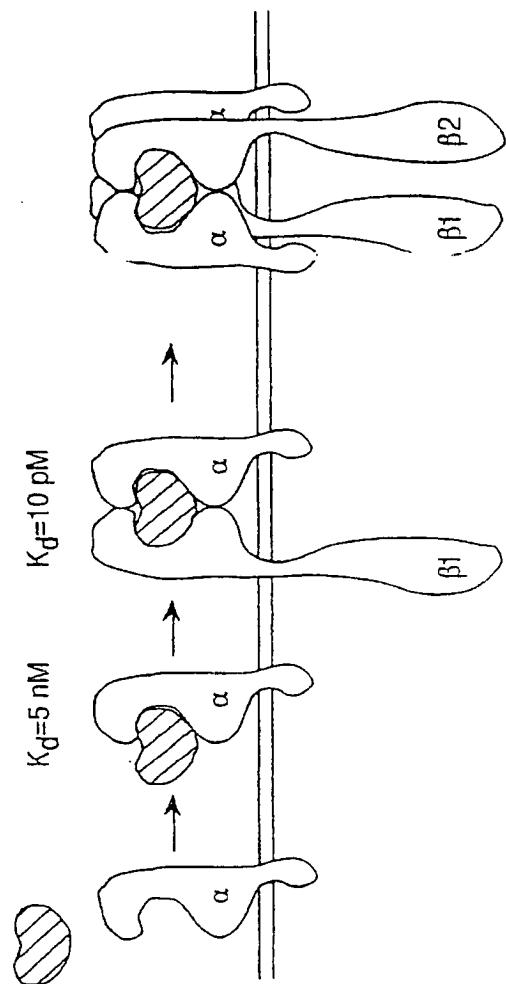
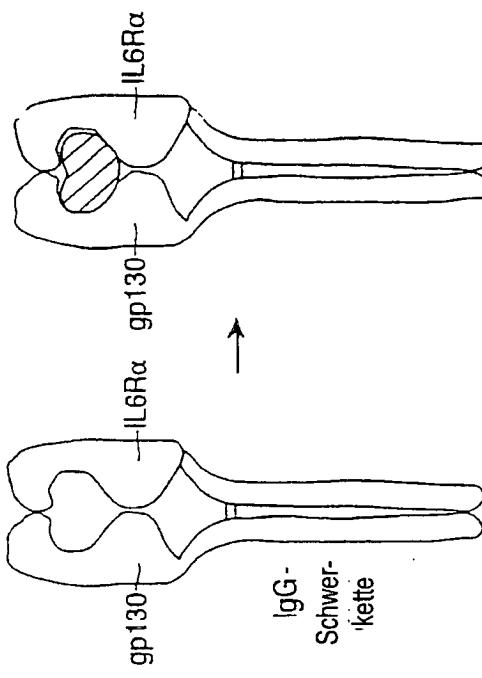


Fig.8

Immunglobulin-Schwer/Leichtketten-Rezeptor-Fusionen

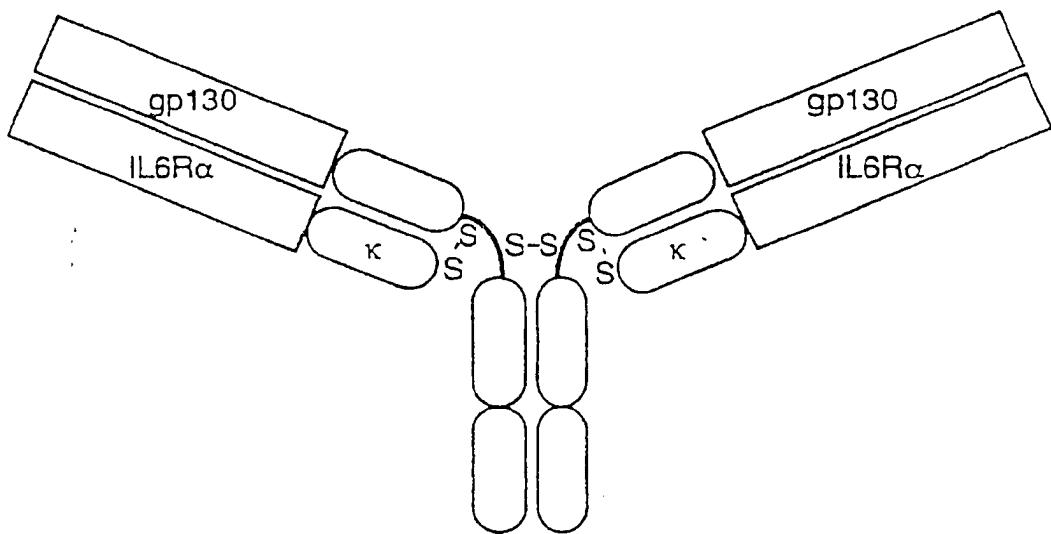


Fig.9

Aminosäuresequenz von gp130-Cγ1

Sequenzbereich: 1 bis 952

10	20	30	40	50	60
*	*	*	*	*	*
MVTLQTWVVQALFIFLTTE	S TGELLDPCGYISPESPVQL	HSNFTAVCVLKEKCMDYFH			
70	80	90	100	110	120
*	*	*	*	*	*
NANYIVWKTNHFTIPKEQYT	IINRTASSVTFTDIASLNIQ	LTCNILTFGQLEQNIVYGITI			
130	140	150	160	170	180
*	*	*	*	*	*
ISGLPPEKPKNLSCIVNEGK	KMRCEWDGGRETHLETNFTL	KSEWATHKFADCKAKRDTPT			
190	200	210	220	230	240
*	*	*	*	*	*
SCTVDYSTVYFVNIEVWVEA	ENALGKVTS	DHINFDPVYKV	KPNPPHNL	SVINSEELSSIL	
250	260	270	280	290	300
*	*	*	*	*	*
KLTWTNPSIKSVIILKYNIQ	YRTKDASTWSQIPPE	D TAST	RSSFTVQDLKPFT	EYVFRIR	
310	320	330	340	350	360
*	*	*	*	*	*
CMKEDGKGYWSDWSEEASGI	TYEDRPSKAPSFWYKIDPSH	TQGYRTVQLWKTLP	PFEAN		
370	380	390	400	410	420
*	*	*	*	*	*
GKILDYEVTLTRWKSHLQNY	TVNATKLT	VNLTNDRYLATL	TVRNLVGKS	DAAVLTIPACD	
430	440	450	460	470	480
*	*	*	*	*	*
FQATHPVMDLKAFPKDNMLW	VEWITPRESVKYILEWCVL	SDKAPCITDWQQEDGT	VHRT		
490	500	510	520	530	540
*	*	*	*	*	*
YLRGNLAESKCYLITVTPVY	ADGPGSPESIKAYLKQAPP	S KGPTVR	TKVGKNEAVLEWD		
550	560	570	580	590	600
*	*	*	*	*	*
QLPVDVQNGFIRNYTIFYRT	IIGNETAVNV	DSSHT	EYTLS	SLTS	DTLYMVRMAAYTDEGG
610	620	630	640	650	660
*	*	*	*	*	*
KDGPEFTFTPKFAQGEIES	GASTKGPSV	PLAPSSKSTS	GGTAALGCLV	KDYFPEPVTV	
670	680	690	700	710	720
*	*	*	*	*	*
<u>SWNSGALTSGVHTEPAVLOS</u>	<u>SGLYSLSSVVTVPSSSLGTO</u>	<u>TYICNVN</u>	<u>HKPSNTKVDKKVE</u>		
730	740	750	760	770	780
*	*	*	*	*	*
<u>PKSCDKTHTCP</u>	<u>PPCPAPELLG</u>	<u>GPSVLFRRPKDTLMISRT</u>	<u>PEVTCVVVDVSHEDPEVKFN</u>		

Fig.9 (Fortsetzung)

790	800	810	820	830	840
*	*	*	*	*	*
<u>WYVDGVEVHNAKTKPREEOX NSTYRVVSVLTVLHODWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTI</u>					
850	860	870	880	890	900
*	*	*	*	*	*
<u>SKAKGOPREPOVXTLPPSRD ELTKNOVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGOPENNYKTTPP</u>					
910	920	930	940	950	
*	*	*	*	*	
<u>VLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WOOGNVFSCSVMHEALHNHY TOKSLSLSPGK*</u>					

Fig.10

Aminosäuresequenz von gp130Δ3fibro

Sequenzbereich: 1 bis 332

10	20	30	40	50	60
*	*	*	*	*	*
<u>MVTLQTWVVQALFIFLTTES TGELLDPCGYISPESPVQL HSNFTAVCVLKEKCMDYFHV</u>					
70	80	90	100	110	120
*	*	*	*	*	*
<u>NANYIVWKTNHFTIPKEQYT IINRTASSVTFTDIASLNIQ LTCNILTGFQLEQNIVYGITI</u>					
130	140	150	160	170	180
*	*	*	*	*	*
<u>ISGLPPEKPKNLSCIVNEGK KMRCEWDGGRETHLETNFTL KSEWATHKFADCKAKRDTPT</u>					
190	200	210	220	230	240
*	*	*	*	*	*
<u>SCTVDYSTVYFVNIEVVWEA ENALGKVTSDDHINFDPVYKV KPNPPHNLSVINSEELSSIL</u>					
250	260	270	280	290	300
*	*	*	*	*	*
<u>KLTWTNPSIKSVIILKYNIQ YRTKDASTWSQIPPEDTAST RSSFTVQDLKPFTEVVFRIR</u>					
310	320	330			
*	*	*			
<u>CMKEDGKGWSDWSEEASGI TYEDRPSKAPSG</u>					

Fig.11

Aminosäuresequenz von J-CH1

Sequenzbereich: 1 bis 121

10	20	30	40	50	60
*	*	*	*	*	*

SGGQGTLVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFREPVTWSWNSGALT

70	80	90	100	110	120
*	*	*	*	*	*

GVHTFPAVLOSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTOTYTCNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHT*

Fig.12

Aminosäuresequenz von Cy4

Sequenzbereich: 1 bis 330

10	20	30	40	50	60
*	*	*	*	*	*

SGASTKGPSVFPLAPCSRST SESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQ

70	80	90	100	110	120
*	*	*	*	*	*

SSGLYSLSSVVTVPPSSLGT KTYTCNVDHKPSNTKVDKRV ESKYGPPCPSCPAPAEFLGGP

130	140	150	160	170	180
*	*	*	*	*	*

SVFLFPPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSQEDPEVQFNWY VDGVEVHNAAKTKPREEQFNS

190	200	210	220	230	240
*	*	*	*	*	*

TYRUVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPVYTLPPSQEEM

250	260	270	280	290	300
*	*	*	*	*	*

TKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTPPVVL DSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ

310	320	330			
*	*	*			

EGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSLGK*

Fig.13

Aminosäuresequenz der κ -Domäne

Sequenzbereich: 1 bis 108

10 *	20 *	30 *	40 *	50 *	60 *
SGTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQ					
70 *	80 *	90 *	100 *		
DSKDSTYSLSSTLTLSKADY EHKKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC*					

Fig.14

Aminosäuresequenz der λ -Domäne

Sequenzbereich: 1 bis 107

10 *	20 *	30 *	40 *	50 *	60 *
SGPKAAPSVTLFPPSSEELQ ANKATLVCLISDFYPGAVTV AWKADSSPVKAGVETTPSK					
70 *	80 *	90 *	100 *		
QSNNKYAASSYSLTPEQWK SHRSYSCQVTHEGSTVEKTV APTECS*					

Fig.15Aminosäuresequenz der löslichen IL-6R α -Domäne

Sequenzbereich: 1 bis 360

10	20	30	40	50	60
*	*	*	*	*	*
MVAVGCALLAALLAAPGAAL	APRRCPAQEVARGVLTSLPG	DSVTLTCPGVEPEDNATVHW			
70	80	90	100	110	120
*	*	*	*	*	*
VLRKPAAGSHPSRWAGMGRR	LLLRSVQLHDSGNYSYRAG	RPAGTVHLLVDVPPEEPQLS			
130	140	150	160	170	180
*	*	*	*	*	*
CFRKSPSLNVVCEWGPRTSP	SLTTKAVLLVRKFQNSPAED	FQEPCQYSQESQKFSCQLAV			
190	200	210	220	230	240
*	*	*	*	*	*
PEGDSSFYIVSMCVASSVGS	KFSKTQTFQGCGILQPDPAA	NITVTAVARNPRWLSVTWQD			
250	260	270	280	290	300
*	*	*	*	*	*
PHSWNSSFYRLRFELRYRAE	RSKTFTTWMVKDLQHHCVIH	DAWSGLRHVVQLRAQEEFGQ			
310	320	330	340	350	360
*	*	*	*	*	*
GEWSEWSPEAMGTPWTESRS	PPAENEVSTPMQALTNNKDD	DNILFRDSANATSLPVQDAG			

Fig.16Aminosäuresequenz der löslichen IL-6R α 313-Domäne

Sequenzbereich: 1 bis 315

10	20	30	40	50	60
*	*	*	*	*	*
MVAVGCALLAALLAAPGAAL	APRRCPAQEVARGVLTSLPG	DSVTLTCPGVEPEDNATVHW			
70	80	90	100	110	120
*	*	*	*	*	*
VLRKPAAGSHPSRWAGMGRR	LLLRSVQLHDSGNYSYRAG	RPAGTVHLLVDVPPEEPQLS			
130	140	150	160	170	180
*	*	*	*	*	*
CFRKSPSLNVVCEWGPRTSP	SLTTKAVLLVRKFQNSPAED	FQEPCQYSQESQKFSCQLAV			
190	200	210	220	230	240
*	*	*	*	*	*
PEGDSSFYIVSMCVASSVGS	KFSKTQTFQGCGILQPDPAA	NITVTAVARNPRWLSVTWQD			
250	260	270	280	290	300
*	*	*	*	*	*
PHSWNSSFYRLRFELRYRAE	RSKTFTTWMVKDLQHHCVIH	DAWSGLRHVVQLRAQEEFGQ			
310					
*					
GEWSEWSPEAMGTG					

Fig.17

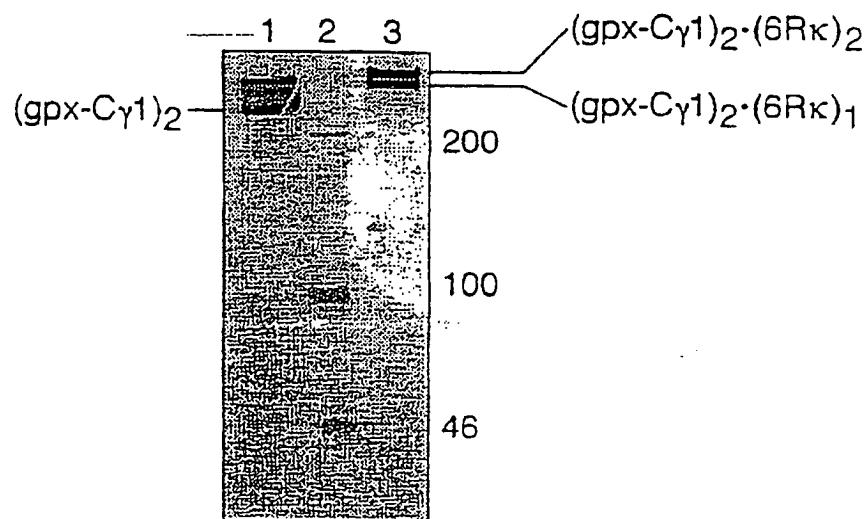


Fig.18

IL-6 dissoziiert langsam aus der Ligandenfalle

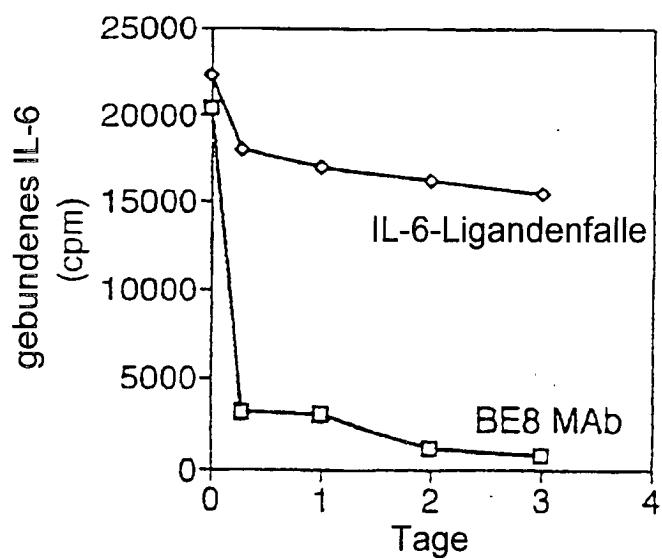


Fig. 19A

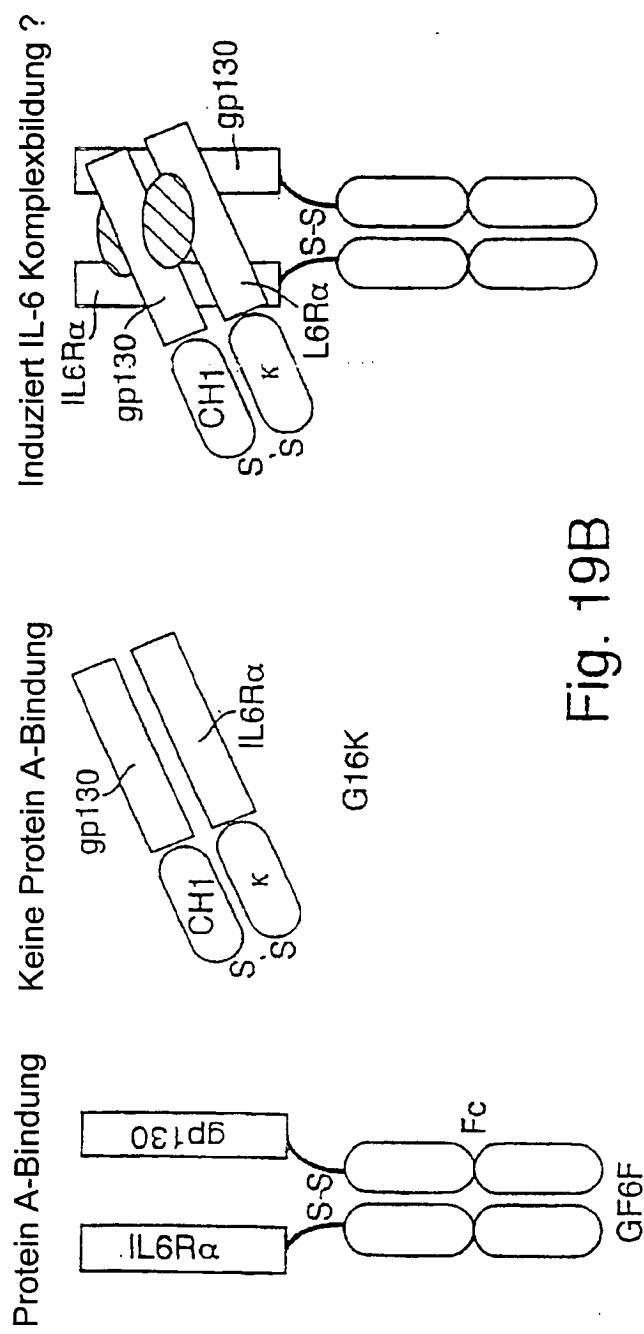


Fig. 19B

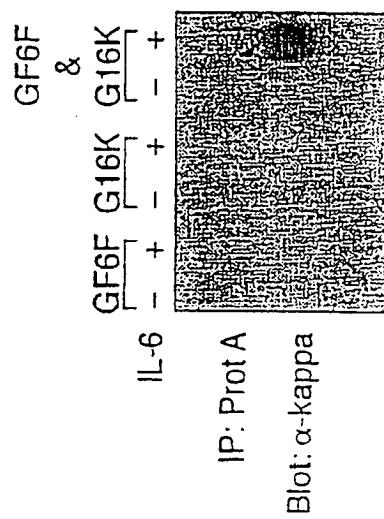


Fig.20.

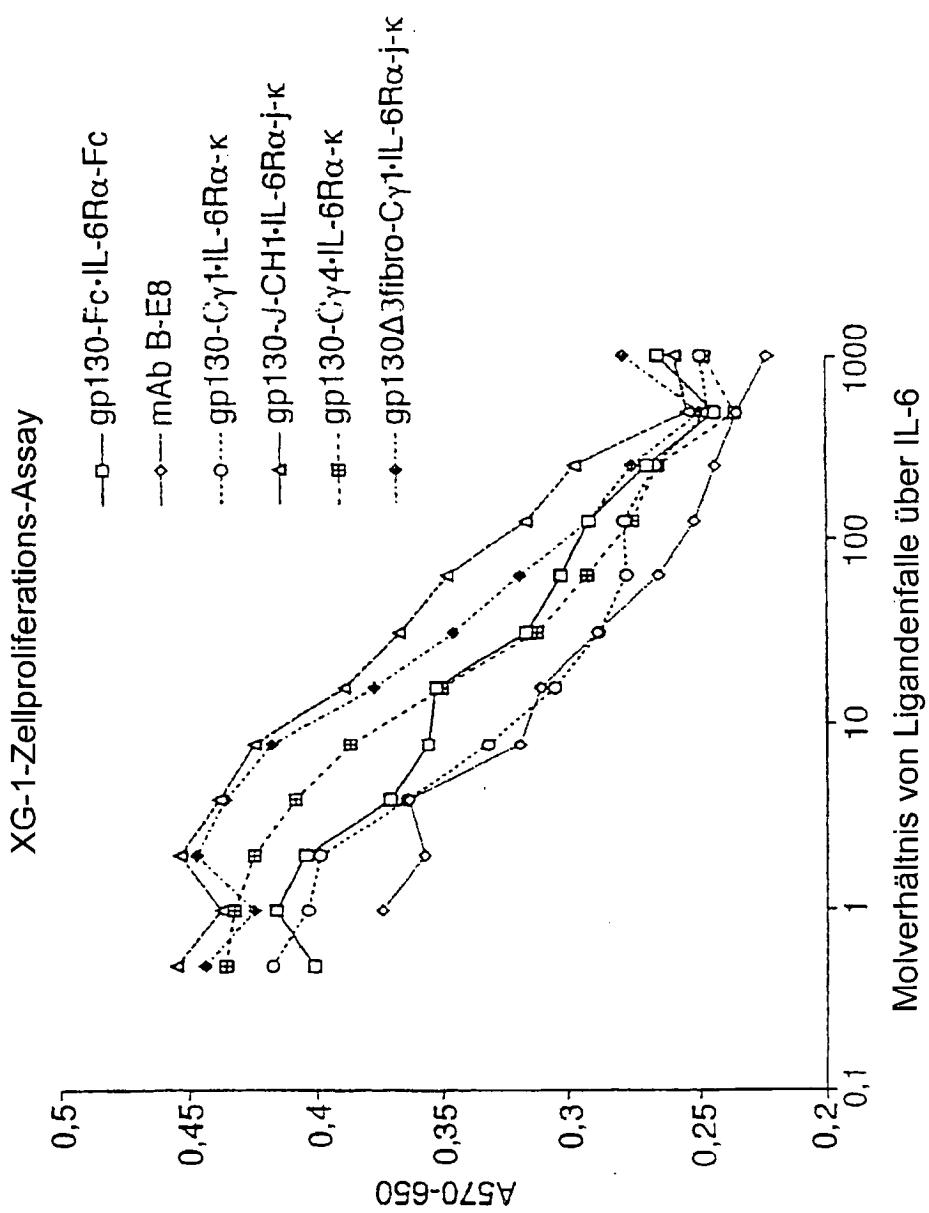


Fig.21A.

10	20	30	40	
ATG GTG AAG CCA TCA CCA T ^T C ACA TCC CTC TTA TTC CTG CAG CTG Met Val Lys Pro Ser Leu Pro Phe Thr Ser Leu Leu Phe Leu Gln Leu>				
50	60	70	80	90
CCC CTG CTG GGA GTG GGG CTG AAC ACG ACA ATT CTG ACG CCC AAT GGG Pro Leu Leu Gly Val Gly Leu Asn Thr Thr Ile Leu Thr Pro Asn Gly>				
100	110	120	130	140
AAT GAA GAC ACC ACA GCT GAT TTC TTC CTG ACC ACT ATG CCC ACT GAC Asn Glu Asp Thr Thr Ala Asp Phe Phe Leu Thr Thr Met Pro Thr Asp>				
150	160	170	180	190
TCC CTC AGT GTT TCC ACT CTG CCC CTC CCA GAG GTT CAG TGT TTT GTG Ser Leu Ser Val Ser Thr Leu Pro Leu Pro Glu Val Gln Cys Phe Val>				
200	210	220	230	240
TTC AAT GTC GAG TAC ATG AAT TGC ACT TGG AAC AGC AGC TCT GAG CCC Phe Asn Val Glu Tyr Met Asn Cys Thr Trp Asn Ser Ser Glu Pro>				
250	260	270	280	
CAG CCT ACC AAC CTC ACT CTG CAT TAT TGG TAC AAG AAC TCG GAT AAT Gln Pro Thr Asn Leu Thr Leu His Tyr Trp Tyr Lys Asn Ser Asp Asn>				
290	300	310	320	330
GAT AAA GTC CAG AAG TGC AGC CAC TAT CTA TTC TCT GAA GAA ATC ACT Asp Lys Val Gln Lys Cys Ser His Tyr Leu Phe Ser Glu Glu Ile Thr>				
340	350	360	370	380
TCT GGC TGT CAG TTG CAA AAA AAG GAG ATC CAC CTC TAC CAA ACA TTT Ser Gly Cys Gln Leu Gln Lys Lys Glu Ile His Leu Tyr Gln Thr Phe>				
390	400	410	420	430
GTT GTT CAG CTC CAG GAC CCA CGG GAA CCC AGG AGA CAG GCC ACA CAG Val Val Gln Leu Gln Asp Pro Arg Glu Pro Arg Arg Gln Ala Thr Gln>				
440	450	460	470	480
ATG CTA AAA CTG CAG AAT CTG GTG ATC CCC TGG GCT CCA GAG AAC CTA Met Leu Lys Leu Gln Asn Leu Val Ile Pro Trp Ala Pro Glu Asn Leu>				
490	500	510	520	
ACA CTT CAC AAA CTG AGT GAA TCC CAG CTA GAA CTG AAC TGG AAC AAC Thr Leu His Lys Leu Ser Glu Ser Gln Leu Glu Leu Asn Trp Asn Asn>				
530	540	550	560	570
AGA TTC TTG AAC CAC TGT TTG GAG CAC TTG GTG CAG TAC CGG ACT GAC Arg Phe Leu Asn His Cys Leu Glu His Leu Val Gln Tyr Arg Thr Asp>				

Fig.21B.

580 590 600 610 620
 TGG GAC CAC AGC TGG ACT GAA CAA TCA GTG GAT TAT AGA CAT AAG TTC
 Trp Asp His Ser Trp Thr Glu Gln Ser Val Asp Tyr Arg His Lys Phe>
 630 640 650 660 670
 TCC TTG CCT AGT GTG GAT GGG CAG AAA CGC TAC ACG TTT CGT GTT CGG
 Ser Leu Pro Ser Val Asp Gly Gln Lys Arg Tyr Thr Phe Arg Val Arg>
 680 690 700 710 720
 AGC CGC TTT AAC CCA CTC TGT GGA AGT GCT CAG CAT TGG AGT GAA TGG
 Ser Arg Phe Asn Pro Leu Cys Gly Ser Ala Gln His Trp Ser Glu Trp>
 730 740 750 760
 AGC CAC CCA ATC CAC TGG GGG AGC AAT ACT TCA AAA GAG AAC GCG TCG
 Ser His Pro Ile His Trp Gly Ser Asn Thr Ser Lys Glu Asn Ala Ser>
 770 780 790 800 810
 TCT GGG AAC ATG AAG GTC CTG CAG GAG CCC ACC TGC GTC TCC GAC TAC
 Ser Gly Asn Met Lys Val Leu Gln Glu Pro Thr Cys Val Ser Asp Tyr>
 820 830 840 850 860
 ATG AGC ATC TCT ACT TGC GAG TGG AAG ATG AAT GGT CCC ACC AAT TGC
 Met Ser Ile Ser Thr Cys Glu Trp Lys Met Asn Gly Pro Thr Asn Cys>
 870 880 890 900 910
 AGC ACC GAG CTC CGC CTG TTG TAC CAG CTG GTT TTT CTG CTC TCC GAA
 Ser Thr Glu Leu Arg Leu Leu Tyr Gln Leu Val Phe Leu Leu Ser Glu>
 920 930 940 950 960
 GCC CAC ACG TGT ATC CCT GAG AAC AAC GGA GGC GCG GGG TGC GTG TGC
 Ala His Thr Cys Ile Pro Glu Asn Asn Gly Gly Ala Gly Cys Val Cys>
 970 980 990 1000
 CAC CTG CTC ATG GAT GAC GTG GTC AGT GCG GAT AAC TAT ACA CTG GAC
 His Leu Leu Met Asp Asp Val Val Ser Ala Asp Asn Tyr Thr Leu Asp>
 1010 1020 1030 1040 1050
 CTG TGG GCT GGG CAG CAG CTG CTG TGG AAG GGC TCC TTC AAG CCC AGC
 Leu Trp Ala Gly Gln Gln Leu Leu Trp Lys Gly Ser Phe Lys Pro Ser>
 1060 1070 1080 1090 1100
 GAG CAT GTG AAA CCC AGG GCC CCA GGA AAC CTG ACA GTT CAC ACC AAT
 Glu His Val Lys Pro Arg Ala Pro Gly Asn Leu Thr Val His Thr Asn>
 1110 1120 1130 1140 1150
 GTC TCC GAC ACT CTG CTG CTG ACC TGG AGC AAC CCG TAT CCC CCT GAC
 Val Ser Asp Thr Leu Leu Leu Thr Trp Ser Asn Pro Tyr Pro Pro Asp>
 1160 1170 1180 1190 1200

Fig.21C.

AAT TAC CTG TAT AAT CAT CTC ACC TAT GCA GTC AAC ATT TCG AGT GAA
 Asn Tyr Leu Tyr Asn His Leu Thr Tyr Ala Val Asn Ile Trp Ser Glu>
 1210 1220 1230 1240
 * * * * * * * *
 AAC GAC CCG GCA GAT TTC AGA ATC TAT AAC GTG ACC TAC CTA GAA CCC
 Asn Asp Pro Ala Asp Phe Arg Ile Tyr Asn Val Thr Tyr Leu Glu Pro>
 1250 1260 1270 1280 1290
 * * * * * * * *
 TCC CTC CGC ATC GCA GCC AGC ACC CTG AAG TCT GGG ATT TCC TAC AGG
 Ser Leu Arg Ile Ala Ala Ser Thr Leu Lys Ser Gly Ile Ser Tyr Arg>
 1300 1310 1320 1330 1340
 * * * * * * * *
 GCA CGG GTG AGG GCC TGG CCT CAG TGC TAT AAC ACC ACC TGG ACT GAC
 Ala Arg Val Arg Ala Trp Ala Gln Cys Tyr Asn Thr Thr Trp Ser Glu>
 1350 1360 1370 1380 1390
 * * * * * * * *
 TGG AGC CCC AGC ACC AAG TGG CAC AAC TCC TAC AGG GAG CCC TTC GAG
 Trp Ser Pro Ser Thr Lys Trp His Asn Ser Tyr Arg Glu Pro Phe Glu>
 1400 1410 1420 1430 1440
 * * * * * * * *
 CAG TCC GGA GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA GCA CCT GAA
 Gln Ser Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu>
 1450 1460 1470 1480
 * * * * * * * *
 CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC TTC CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC
 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp>
 1490 1500 1510 1520 1530
 * * * * * * * *
 ACC CTC ATG ATC TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACA TGC GTG GTG GTG GAC
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp>
 1540 1550 1560 1570 1580
 * * * * * * * *
 GTG AGC CAC GAA GAC CCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly>
 1590 1600 1610 1620 1630
 * * * * * * * *
 GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG TAC AAC
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn>
 1640 1650 1660 1670 1680
 * * * * * * * *
 AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp>
 1690 1700 1710 1720
 * * * * * * * *
 CTG AAT GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GCC CTC CCA
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro>
 1730 1740 1750 1760 1770
 * * * * * * * *
 GCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAA
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu>

Fig.21D.

1780	1790	1800	1810	1820
*	*	*	*	*
CCA CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CGG GAG GAG ATG ACC AAG AAC				
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn>				
1830	1840	1850	1860	1870
*	*	*	*	*
CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC				
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile>				
1880	1890	1900	1910	1920
*	*	*	*	*
GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC				
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr>				
1930	1940	1950	1960	
*	*	*	*	
ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAT AGC AAG				
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys>				
1970	1980	1990	2000	2010
*	*	*	*	*
CTC ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC				
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys>				
2020	2030	2040	2050	2060
*	*	*	*	*
TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG AGC CTC				
Ser Val Met His Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu>				
2070	2080			
*	*	*		
TCC CTG TCT CCG GGT AAA TGA				
Ser Leu Ser Pro Gly Lys ***>				

Fig.22A.

10	20	30	40	
ATG GTG AAG CCA TCA TTA CCA TTC ACA TCC CTC TTA TTC CTG CAG CTG				
Met Val Lys Pro Ser Leu Pro Phe Thr Ser Leu Leu Phe Leu Gln Leu>				
50	60	70	80	90
CCC CTG CTG GGA GTG GGG CTG AAC ACG ACA ATT CTG ACG CCC AAT GGG				
Pro Leu Leu Gly Val Gly Leu Asn Thr Thr Ile Leu Thr Pro Asn Gly>				
100	110	120	130	140
AAT GAA GAC ACC ACA GCT GAT TTC TTC CTG ACC ACT ATG CCC ACT GAC				
Asn Glu Asp Thr Thr Ala Asp Phe Phe Leu Thr Thr Met Pro Thr Asp>				
150	160	170	180	190
TCC CTC AGT GTT TCC ACT CTG CCC CTC CCA GAG GTT CAG TGT TTT GTG				
Ser Leu Ser Val Ser Thr Leu Pro Leu Pro Glu Val Gln Cys Phe Val>				
200	210	220	230	240
TTC AAT GTC GAG TAC ATG AAT TGC ACT TGG AAC AGC AGC TCT GAG CCC				
Phe Asn Val Glu Tyr Met Asn Cys Thr Trp Asn Ser Ser Glu Pro>				
250	260	270	280	
CAG CCT ACC AAC CTC ACT CTG CAT TAT TGG TAC AAG AAC TCG GAT AAT				
Gln Pro Thr Asn Leu Thr Leu His Tyr Trp Tyr Lys Asn Ser Asp Asn>				
290	300	310	320	330
GAT AAA GTC CAG AAG TGC AGC CAC TAT CTA TTC TCT GAA GAA ATC ACT				
Asp Lys Val Gln Lys Cys Ser His Tyr Leu Phe Ser Glu Glu Ile Thr>				
340	350	360	370	380
TCT GGC TGT CAG TTG CAA AAA AAG GAG ATC CAC CTC TAC CAA ACA TTT				
Ser Gly Cys Gln Leu Gln Lys Glu Ile His Leu Tyr Gln Thr Phe>				
390	400	410	420	430
GTT GTT CAG CTC CAG GAC CCA CGG GAA CCC AGG AGA CAG GCC ACA CAG				
Val Val Gln Leu Gln Asp Pro Arg Glu Pro Arg Arg Gln Ala Thr Gln>				
440	450	460	470	480
ATG CTA AAA CTG CAG AAT CTG GTG ATC CCC TGG GCT CCA GAG AAC CTA				
Met Leu Lys Leu Gln Asn Leu Val Ile Pro Trp Ala Pro Glu Asn Leu>				
490	500	510	520	
ACA CTT CAC AAA CTG AGT GAA TCC CAG CTA GAA CTG AAC TGG AAC AAC				
Thr Leu His Lys Leu Ser Glu Ser Gln Leu Glu Leu Asn Trp Asn Asn>				
530	540	550	560	570
AGA TTC TTG AAC CAC TGT TTG GAG CAC TTG GTG CAG TAC CGG ACT GAC				
Arg Phe Leu Asn His Cys Leu Glu His Leu Val Gln Tyr Arg Thr Asp>				

Fig.22B.

580 590 600 610 620
 TGG GAC CAC AGC TGG ACT GAA CAA TCA GTG GAT TAT AGA CAT AAG TTC
 Trp Asp His Ser Trp Thr Glu Gln Ser Val Asp Tyr Arg His Lys Phe>
 * * * * *
 630 640 650 660 670
 TCC TTG CCT AGT GTG GAT GGG CAG AAA CGC TAC ACG TTT CGT GTT CGG
 Ser Leu Pro Ser Val Asp Gly Gln Lys Arg Tyr Thr Phe Arg Val Arg>
 * * * * *
 680 690 700 710 720
 AGC CGC TTT AAC CCA CTC TGT GGA AGT GCT CAG CAT TGG AGT GAA TGG
 Ser Arg Phe Asn Pro Leu Cys Gly Ser Ala Gln His Trp Ser Glu Trp>
 * * * * *
 730 740 750 760
 AGC CAC CCA ATC CAC TGG GGG AGC AAT ACT TCA AAA GAG AAC GGG AAC
 Ser His Pro Ile His Trp Gly Ser Asn Thr Ser Lys Glu Asn Gly Asn>
 * * * * *
 770 780 790 800 810
 ATG AAG GTC CTG CAG GAG CCC ACC TGC GTC TCC GAC TAC ATG AGC ATC
 Met Lys Val Leu Gln Glu Pro Thr Cys Val Ser Asp Tyr Met Ser Ile>
 * * * * *
 820 830 840 850 860
 TCT ACT TGC GAG TGG AAG ATG AAT GGT CCC ACC AAT TGC AGC ACC GAG
 Ser Thr Cys Glu Trp Lys Met Asn Gly Pro Thr Asn Cys Ser Thr Glu>
 * * * * *
 870 880 890 900 910
 CTC CGC CTG TTG TAC CAG CTG GTT TTT CTG CTC TCC GAA GCC CAC ACG
 Leu Arg Leu Leu Tyr Gln Leu Val Phe Leu Leu Ser Glu Ala His Thr>
 * * * * *
 920 930 940 950 960
 TGT ATC CCT GAG AAC AAC GGA GGC GCG GGG TGC GTG TGC CAC CTG CTC
 Cys Ile Pro Glu Asn Asn Gly Gly Ala Gly Cys Val Cys His Leu Leu>
 * * * * *
 970 980 990 1000
 ATG GAT GAC GTG GTC AGT GCG GAT AAC TAT ACA CTG GAC CTG TGG GCT
 Met Asp Asp Val Val Ser Ala Asp Asn Tyr Thr Leu Asp Leu Trp Ala>
 * * * * *
 1010 1020 1030 1040 1050
 GGG CAG CAG CTG CTG TGG AAG GGC TCC TTC AAG CCC AGC GAG CAT GTG
 Gly Gln Gln Leu Leu Trp Lys Gly Ser Phe Lys Pro Ser Glu His Val>
 * * * * *
 1060 1070 1080 1090 1100
 AAA CCC AGG GCC CCA GGA AAC CTG ACA GTT CAC ACC AAT GTC TCC GAC
 Lys Pro Arg Ala Pro Gly Asn Leu Thr Val His Thr Asn Val Ser Asp>
 * * * * *
 1110 1120 1130 1140 1150
 ACT CTG CTG CTG ACC TGG AGC AAC CCG TAT CCC CCT GAC AAT TAC CTG
 Thr Leu Leu Leu Thr Trp Ser Asn Pro Tyr Pro Pro Asp Asn Tyr Leu>
 * * * * *
 1160 1170 1180 1190 1200

Fig.22C.

TAT AAT CAT CTC ACC TAT GCA GTC AAC ATT TGG AGT GAA AAC GAC GAC CCG
 Tyr Asn His Leu Thr Tyr Ala Val Asn Ile Trp Ser Glu Asn Asp Pro>

1210	1220	1230	1240	
.	.	.	.	
GCA GAT TTC AGA ATC TAT AAC GTG ACC TAC CTA GAA CCC TCC CTC CGC Ala Asp Phe Arg Ile Tyr Asn Val Thr Tyr Leu Glu Pro Ser Leu Arg>				
1250	1260	1270	1280	1290
.
ATC GCA GCC AGC ACC CTG AAG TCT GGG ATT TCC TAC AGG GCA CGG GTG Ile Ala Ala Ser Thr Leu Lys Ser Gly Ile Ser Tyr Arg Ala Arg Val>				
1300	1310	1320	1330	1340
.
AGG GCC TGG GCT CAG AGC TAT AAC ACC ACC TGG AGT GAG TGG AGC CCC Arg Ala Trp Ala Gln Ser Tyr Asn Thr Thr Trp Ser Glu Trp Ser Pro>				
1350	1360	1370	1380	1390
.
AGC ACC AAG TGG CAC AAC TCC TAC AGG GAG CCC TTC GAG CAG TCC GGA Ser Thr Lys Trp His Asn Ser Tyr Arg Glu Pro Phe Glu Gln Ser Gly>				
1400	1410	1420	1430	1440
.
GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA GCA CCT GAA CTC CTG GGG Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly>				
1450	1460	1470	1480	
.
GGA CCG TCA GTC TTC CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACC CTC ATG Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met>				
1490	1500	1510	1520	1530
.
ATC TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACA TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAC Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His>				
1540	1550	1560	1570	1580
.
GAA GAC CCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC GTG GAG GTG Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val>				
1590	1600	1610	1620	1630
.
CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG TAC AAC AGC ACG TAC His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr>				
1640	1650	1660	1670	1680
.
CGT GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAT GGC Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly>				
1690	1700	1710	1720	
.
AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GCC CTC CCA GCC CCC ATC Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile>				
1730	1740	1750	1760	1770
.
GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAA CCA CAG GTG Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val>				

Fig.22D.

1780	1790	1800	1810	1820
*	*	*	*	*
TAC ACC CTG CCC CCA TCC CGG GAT GAG CTG ACC AAG AAC CAG GTC AGC				
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser>				
1830	1840	1850	1860	1870
*	*	*	*	*
CTG ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG				
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu>				
1880	1890	1900	1910	1920
*	*	*	*	*
TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC				
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro>				
1930	1940	1950	1960	
*	*	*	*	*
GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAT AGC AAG CTC ACC GTG				
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val>				
1970	1980	1990	2000	2010
*	*	*	*	*
GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG				
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met>				
2020	2030	2040	2050	2060
*	*	*	*	*
CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT				
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser>				
2070				
*	*	*		
CCG GGT AAA TGA				
Pro Gly Lys ***>				

Fig.23A.

10	20	30	40													
ATG	GTG	AAG	CCA	TCA	TTA	CCA	TTC	ACA	TCC	CTC	TTA	TTC	CTG	CAG	CTG	
Met	Val	Lys	Pro	Ser	Leu	Pro	Phe	Thr	Ser	Leu	Leu	Phe	Leu	Gln	Leu	>
50	60		70		80		90									
CCC	CTG	CTG	GGA	GTG	GGG	CTG	AAC	ACG	ACA	ATT	CTG	ACG	CCC	AAT	GGG	
Pro	Leu	Leu	Gly	Val	Gly	Leu	Asn	Thr	Thr	Ile	Leu	Thr	Pro	Asn	Gly	>
100	110		120		130		140									
AAT	GAA	GAC	ACC	ACA	GCT	GAT	TTC	TTC	CTG	ACC	ACT	ATG	CCC	ACT	GAC	
Asn	Glu	Asp	Thr	Thr	Ala	Asp	Phe	Phe	Leu	Thr	Thr	Met	Pro	Thr	Asp	>
150	160		170		180		190									
TCC	CTC	AGT	GTT	TCC	ACT	CTG	CCC	CTC	CCA	GAG	GTT	CAG	TGT	TTT	GTG	
Ser	Leu	Ser	Val	Ser	Thr	Leu	Pro	Leu	Pro	Glu	Val	Gln	Cys	Phe	Val	>
200	210		220		230		240									
TTC	AAT	GTC	GAG	TAC	ATG	AAT	TGC	ACT	TGG	AAC	AGC	AGC	TCT	GAG	CCC	
Phe	Asn	Val	Glu	Tyr	Met	Asn	Cys	Thr	Trp	Asn	Ser	Ser	Ser	Glu	Pro	>
250	260		270		280											
CAG	CCT	ACC	AAC	CTC	ACT	CTG	CAT	TAT	TGG	TAC	AAG	AAC	TCG	GAT	AAT	
Gln	Pro	Thr	Asn	Leu	Thr	Leu	His	Tyr	Trp	Tyr	Lys	Asn	Ser	Asp	Asn	>
290	300		310		320		330									
GAT	AAA	GTC	CAG	AAG	TGC	AGC	CAC	TAT	CTA	TTC	TCT	GAA	GAA	ATC	ACT	
Asp	Lys	Val	Gln	Lys	Cys	Ser	His	Tyr	Leu	Phe	Ser	Glu	Glu	Ile	Thr	>
340	350		360		370		380									
TCT	GGC	TGT	CAG	TTG	CAA	AAA	AAG	GAG	ATC	CAC	CTC	TAC	CAA	ACA	TTT	
Ser	Gly	Cys	Gln	Leu	Gln	Lys	Glu	Ile	His	Lys	Glu	Ile	Tyr	Gln	Thr	Phe
390	400		410		420		430									
GTT	GTT	CAG	CTC	CAG	GAC	CCA	CGG	GAA	CCC	AGG	AGA	CAG	GCC	ACA	CAG	
Val	Val	Gln	Leu	Gln	Asp	Pro	Arg	Glu	Pro	Arg	Arg	Gln	Ala	Thr	Gln	>
440	450		460		470		480									
ATG	CTA	AAA	CTG	CAG	AAT	CTG	GTG	ATC	CCC	TGG	GCT	CCA	GAG	AAC	CTA	
Met	Leu	Lys	Leu	Gln	Asn	Leu	Val	Ile	Pro	Trp	Ala	Pro	Glu	Asn	Leu	>
490	500		510		520											
ACA	CTT	CAC	AAA	CTG	AGT	GAA	TCC	CAG	CTA	GAA	CTG	AAC	TGG	AAC	AAC	
Thr	Leu	His	Lys	Leu	Ser	Glu	Ser	Gln	Leu	Glu	Leu	Asn	Trp	Asn	Asn	>
530	540		550		560		570									
AGA	TTC	TTG	AAC	CAC	TGT	TTG	GAG	CAC	TTG	GTG	CAG	TAC	CGG	ACT	GAC	
Arg	Phe	Leu	Asn	His	Cys	Leu	Glu	His	Leu	Val	Gln	Tyr	Arg	Thr	Asp	>

Fig.23B.

580 590 600 610 620
 TGG GAC CAC AGC TGG ACT GAA CAA TCA GTG GAT TAT AGA CAT AAG TTC
 Trp Asp His Ser Trp Thr Glu Gln Ser Val Asp Tyr Arg His Lys Phe>
 630 640 650 660 670
 TCC TTG CCT AGT GTG GAT GGG CAG AAA CGC TAC ACG TTT CGT GTT CGG
 Ser Leu Pro Ser Val Asp Gly Gln Lys Arg Tyr Thr Phe Arg Val Arg>
 680 690 700 710 720
 AGC CGC TTT AAC CCA CTC TGT GGA AGT CCT CAG CAT TGG AGT GAA TGG
 Ser Arg Phe Asn Pro Leu Cys Gly Ser Ala Gln His Trp Ser Glu Trp>
 730 740 750 760
 ACC CAC CCA ATC CAC TGG GGG AGC AAT ACT TCA AAA GAG AAC GCG TCG
 Ser His Pro Ile His Trp Gly Ser Asn Thr Ser Lys Glu Asn Ala Ser>
 770 780 790 800 810
 TCT GGG AAC ATG AAG GTC CTG CAG GAG CCC ACC TGC GTC TCC GAC TAC
 Ser Gly Asn Met Lys Val Leu Gln Glu Pro Thr Cys Val Ser Asp Tyr>
 820 830 840 850 860
 ATG AGC ATC TCT ACT TGC GAG TGG AAG ATG AAT GGT CCC ACC AAT TGC
 Met Ser Ile Ser Thr Cys Glu Trp Lys Met Asn Gly Pro Thr Asn Cys>
 870 880 890 900 910
 AGC ACC GAG CTC CGC CTG TTG TAC CAG CTG GTT TTT CTG CTC TCC GAA
 Ser Thr Glu Leu Arg Leu Tyr Gln Leu Val Phe Leu Leu Ser Glu>
 920 930 940 950 960
 GCC CAC ACG TGT ATC CCT GAG AAC AAC GGA GGC GCG GGG TGC GTG TGC
 Ala His Thr Cys Ile Pro Glu Asn Asn Gly Ala Gly Cys Val Cys>
 970 980 990 1000
 CAC CTG CTC ATG GAT GAC GTG GTC AGT GCG GAT AAC TAT ACA CTG GAC
 His Leu Leu Met Asp Asp Val Val Ser Ala Asp Asn Tyr Thr Leu Asp>
 1010 1020 1030 1040 1050
 CTG TGG GCT GGG CAG CAG CTG CTG TGG AAG GGC TCC TTC AAG CCC ACC
 Leu Trp Ala Gly Gln Gln Leu Leu Trp Lys Gly Ser Phe Lys Pro Ser>
 1060 1070 1080 1090 1100
 GAG CAT GTG AAA CCC AGG GCC CCA GGA AAC CTG ACA GTT CAC ACC AAT
 Glu His Val Lys Pro Arg Ala Pro Gly Asn Leu Thr Val His Thr Asn>
 1110 1120 1130 1140 1150
 GTC TCC GAC ACT CTG CTG ACC TGG AGC AAC CCG TAT CCC CCT GAC
 Val Ser Asp Thr Leu Leu Leu Thr Trp Ser Asn Pro Tyr Pro Pro Asp>
 1160 1170 1180 1190 1200

Fig.23C.

AAT TAC CTG TAT AAT CAT CTC ACC TAT GCA GTC AAC ATT TGG AGT GAA
 Asn Tyr Leu Tyr Asn His Leu Thr Tyr Ala Val Asn Ile Trp Ser Glu>
 1210 1220 1230 1240
 AAC GAC CCG GCA GAT TTC AGA ATC TAT AAC GTG ACC TAC CTA GAA CCC
 Asn Asp Pro Ala Asp Phe Arg Ile Tyr Asn Val Thr Tyr Leu Glu Pro>
 1250 1260 1270 1280 1290
 TCC CTC CGC ATC GCA GCC AGC ACC CTG AAG TCT GGG ATT TCC TAC AGG
 Ser Leu Arg Ile Ala Ala Ser Thr Leu Lys Ser Gly Ile Ser Tyr Arg>
 1300 1310 1320 1330 1340
 GCA CGG GTG AGG GCC TGG GCT CAG AGC TAT AAC ACC ACC TGG AGT GAG
 Ala Arg Val Arg Ala Trp Ala Cys Ser Tyr Asn Val Thr Tyr Trp Ser Glu>
 1350 1360 1370 1380 1390
 TGG AGC CCC AGC ACC AAG TGG CAC AAC TCC TAC AGG GAG CCC TTC GAG
 Trp Ser Pro Ser Thr Lys Trp His Asn Ser Tyr Arg Glu Pro Phe Glu>
 1400 1410 1420 1430 1440
 CAG TCC GGA GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA GCA CCT GAA
 Gln Ser Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu>
 1450 1460 1470 1480
 CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC TTC CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC
 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp>
 1490 1500 1510 1520 1530
 ACC CTC ATG ATC TCC CCG ACC CCT GAG GTC ACA TGC GTG GTG GTG GAC
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp>
 1540 1550 1560 1570 1580
 GTG AGC CAC GAA GAC CCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly>
 1590 1600 1610 1620 1630
 GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG TAC AAC
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn>
 1640 1650 1660 1670 1680
 AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp>
 1690 1700 1710 1720
 CTG AAT CGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GCC CTC CCA
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro>
 1730 1740 1750 1760 1770
 GCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAA
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu>

Fig.23D.

1780	1790	1800	1810	1820
*	*	*	*	*
CCA CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CGG GAT GAG CTG ACC AAG AAC				
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn>				
1830	1840	1850	1860	1870
*	*	*	*	*
CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC				
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile>				
1880	1890	1900	1910	1920
*	*	*	*	*
GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC				
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr>				
1930	1940	1950	1960	
*	*	*	*	
ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAT AGC AAG				
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys>				
1970	1980	1990	2000	2010
*	*	*	*	*
CTC ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC				
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys>				
2020	2030	2040	2050	2060
*	*	*	*	*
TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG AGC CTC				
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu>				
2070	2080			
*	*	*	*	
TCC CTG TCT CCG GGT AAA TGA				
Ser Leu Ser Pro Gly Lys ***>				

Fig.24A.

10 20 30 40

```

ATG GTG GCC GTC GGC TGC GCG CTG CTG GCT GCC CTG CTG GCC GCG CCG
Met Val Ala Val Gly Cys Ala Leu Leu Ala Ala Leu Leu Ala Ala Pro>

```

50 60 70 80 90

```

GGA GCG GCG CTG GCC CCA AGG CGC TGC CCT GCG CAG GAG GTG GCA AGA
Gly Ala Ala Leu Ala Pro Arg Arg Cys Pro Ala Gln Glu Val Ala Arg>

```

100 110 120 130 140

```

GGC GTG CTG ACC AGT CTG CCA GGA GAC AGC GTG ACT CTG ACC TGC CCG
Gly Val Leu Thr Ser Leu Pro Gly Asp Ser Val Thr Leu Thr Cys Pro>

```

150 160 170 180 190

```

GGG GTA GAG CCG GAA GAC AAT GCC ACT GTT CAC TGG GTG CTC AGG AAG
Gly Val Glu Pro Glu Asp Asn Ala Thr Val His Trp Val Leu Arg Lys>

```

200 210 220 230 240

```

CCG GCT GCA GGC TCC CAC CCC AGC AGA TGG GCT GGC ATG GGA AGG AGG
Pro Ala Ala Gly Ser His Pro Ser Arg Trp Ala Gly Met Gly Arg Arg>

```

250 260 270 280

```

CTG CTG CTG AGG TCG GTG CAG CTC CAC GAC TCT GGA AAC TAT TCA TGC
Leu Leu Leu Arg Ser Val Gln Leu His Asp Ser Gly Asn Tyr Ser Cys>

```

290 300 310 320 330

```

TAC CGG GCC GGC CGC CCA GCT GGG ACT GTG CAC TTG CTG GTG GAT GTT
Tyr Arg Ala Gly Arg Pro Ala Gly Thr Val His Leu Leu Val Asp Val>

```

340 350 360 370 380

```

CCC CCC GAG GAG CCC CAG CTC TCC TGC TTC CGG AAG AGC CCC CTC AGC
Pro Pro Glu Glu Pro Gln Leu Ser Cys Phe Arg Lys Ser Pro Leu Ser>

```

390 400 410 420 430

```

AAT GTT GTT TGT GAG TGG GGT CCT CGG AGC ACC CCA TCC CTG ACG ACA
Asn Val Val Cys Glu Trp Gly Pro Arg Ser Thr Pro Ser Leu Thr Thr>

```

440 450 460 470 480

```

AAG GCT GTG CTC TTC GTG AGG AAG TTT CAG AAC AGT CCG GCC GAA GAC
Lys Ala Val Leu Leu Val Arg Lys Phe Gln Asn Ser Pro Ala Glu Asp>

```

490 500 510 520

```

TTC CAG GAG CCG TGC CAG TAT TCC CAG GAG TCC CAG AAG TTC TCC TGC
Phe Gln Glu Pro Cys Gln Tyr Ser Gln Glu Ser Gln Lys Phe Ser Cys>

```

530 540 550 560 570

```

CAG TTA GCA GTC CCG GAG GGA GAC AGC TCT TTC TAC ATA GTG TCC ATG
Gln Leu Ala Val Pro Glu Gly Asp Ser Ser Phe Tyr Ile Val Ser Met>

```

Fig.24B.

580 590 600 610 620
 TGC GTC GCC AGT AGT GTC GGG AGC AAG TTC AGC AAA ACT CAA ACC TTT
 Cys Val Ala Ser...Ser Val Gly Ser Lys Phe Ser Lys Thr Gln Thr Phe>
 630 640 650 660 670
 CAG GGT TGT GGA ATC TTG CAG CCT GAT CCG CCT GCC AAC ATC ACA GTC
 Gln Gly Cys Gly Ile Leu Gln Pro Asp Pro Pro Ala Asn Ile Thr Val>
 680 690 700 710 720
 ACT GCC GTG GCC AGA AAC CCC CGC TGG CTC AGT GTC ACC TGG CAA GAC
 Thr Ala Val Ala Arg Asn Pro Arg Trp Leu Ser Val Thr Trp Gln Asp>
 730 740 750 760
 CCC CAC TCC TGG AAC TCA TCT TTC TAC AGA CTA CGG TTT GAG CTC AGA
 Pro His Ser Trp Asn Ser Ser Phe Tyr Arg Leu Arg Phe Glu Leu Arg>
 770 780 790 800 810
 TAT CGG GCT GAA CGG TCA AAG ACA TTC ACA ACA TGG ATG GTC AAG GAC
 Tyr Arg Ala Glu Arg Ser Lys Thr Phe Thr Thr Trp Met Val Lys Asp>
 820 830 840 850 860
 CTC CAG CAT CAC TGT GTC ATC CAC GAC GCC TGG AGC GGC CTG AGG CAC
 Leu Gln His His Cys Val Ile His Asp Ala Trp Ser Gly Leu Arg His>
 870 880 890 900 910
 GTG GTG CAG CTT CGT GCC CAG GAG GAG TTC GGG CAA GGC GAG TGG AGC
 Val Val Gln Leu Arg Ala Gln Glu Phe Gly Gln Gly Glu Trp Ser>
 920 930 940 950 960
 GAG TGG AGC CCG GAG GCC ATG CGC ACG CCT TGG ACA GAA TCC AGG AGT
 Glu Trp Ser Pro Glu Ala Met Gly Thr Pro Trp Thr Glu Ser Arg Ser>
 970 980 990 1000
 CCT CCA GCT GAG AAC GAG GTG TCC ACC CCC ATG ACC GGT GGC GCG CCT
 Pro Pro Ala Glu Asn Glu Val Ser Thr Pro Met Thr Gly Gly Ala Pro>
 1010 1020 1030 1040 1050
 TCA GGT GCT CAG CTG GAA CTT CTA GAC CCA TGT GGT TAT ATC AGT CCT
 Ser Gly Ala Gln Leu Glu Leu Asp Pro Cys Gly Tyr Ile Ser Pro>
 1060 1070 1080 1090 1100
 GAA TCT CCA GTT GTA CAA CTT CAT TCT AAT TTC ACT GCA GTT TGT GTG
 Glu Ser Pro Val Val Gln Leu His Ser Asn Phe Thr Ala Val Cys Val>
 1110 1120 1130 1140 1150
 CTA AAG GAA AAA TGT ATG GAT TAT TTT CAT GTA AAT GCT AAT TAC ATT
 Leu Lys Glu Lys Cys Met Asp Tyr Phe His Val Asn Ala Asn Tyr Ile>
 1160 1170 1180 1190 1200

Fig.24C.

GTC TGG AAA ACA AAC CAT TTT ACT ATT CCT AAG GAG CAA TAT ACT ATC
 Val Trp Lys Thr Asn His Phe Thr Ile Pro Lys Glu Gln Tyr Thr Ile>
 * * * * *
 1210 1220 1230 1240
 ATA AAC AGA ACA GCA TCC AGT GTC ACC TTT ACA GAT ATA GCT TCA TTA
 Ile Asn Arg Thr Ala Ser Ser Val Thr Phe Thr Asp Ile Ala Ser Leu>
 * * * * *
 1250 1260 1270 1280 1290
 AAT ATT CAG CTC ACT TGC AAC ATT CTT ACA TTC GGA CAG CTT GAA CAG
 Asn Ile Gln Leu Thr Cys Asn Ile Leu Thr Phe Gly Gln Leu Glu Gln>
 * * * * *
 1300 1310 1320 1330 1340
 AAT GTT TAT GGA ATC ACA ATA ATT TCA CGC TTG CCT CCA GAA AAA CCT
 Asn Val Tyr Gly Ile Thr Ile Ser Gly Leu <Pro>Glu <Pro>Lys <Pro>
 * * * * *
 1350 1360 1370 1380 1390
 AAA AAT TTG AGT TGC ATT GTG AAC GAG CGG AAG AAA ATG AGG TGT GAG
 Lys Asn Leu Ser Cys Ile Val Asn Glu Gly Lys Lys Met Arg Cys Glu>
 * * * * *
 1400 1410 1420 1430 1440
 TGG GAT GGT GGA AGG GAA ACA CAC TTG GAG ACA AAC TTC ACT TTA AAA
 Trp Asp Gly Gly Arg Glu Thr His Leu Glu Thr Asn Phe Thr Leu Lys>
 * * * * *
 1450 1460 1470 1480
 TCT GAA TGG GCA ACA CAC AAG TTT GCT GAT TGC AAA GCA AAA CGT GAC
 Ser Glu Trp Ala Thr His Lys Phe Ala Asp Cys Lys Ala Lys Arg Asp>
 * * * * *
 1490 1500 1510 1520 1530
 ACC CCC ACC TCA TGC ACT GTT GAT TAT TCT ACT GTG TAT TTT GTC AAC
 Thr Pro Thr Ser Cys Thr Val Asp Tyr Ser Thr Val Tyr Phe Val Asn>
 * * * * *
 1540 1550 1560 1570 1580
 ATT GAA GTC TGG GTA GAA GCA GAG AAT GCC CTT GGG AAG GTT ACA TCA
 Ile Glu Val Trp Val Glu Ala Glu Asn Ala Leu Gly Lys Val Thr Ser>
 * * * * *
 1590 1600 1610 1620 1630
 GAT CAT ATC AAT TTT GAT CCT GTA TAT AAA GTG AAG CCC AAT CCG CCA
 Asp His Ile Asn Phe Asp Pro Val Tyr Lys Val Lys Pro Asn Pro Pro>
 * * * * *
 1640 1650 1660 1670 1680
 CAT AAT TTA TCA GTG ATC AAC TCA GAG GAA CTG TCT AGT ATC TTA AAA
 His Asn Leu Ser Val Ile Asn Ser Glu Glu Leu Ser Ser Ile Leu Lys>
 * * * * *
 1690 1700 1710 1720
 TTG ACA TGG ACC AAC CCA AGT ATT AAG AGT GTT ATA ATA CTA AAA TAT
 Leu Thr Trp Thr Asn Pro Ser Ile Lys Ser Val Ile Ile Leu Lys Tyr>
 * * * * *
 1730 1740 1750 1760 1770
 AAC ATT CAA TAT AGG ACC AAA GAT GCC TCA ACT TGG AGC CAG ATT CCT
 Asn Ile Gln Tyr Arg Thr Lys Asp Ala Ser Thr Trp Ser Gln Ile Pro>

Fig.24D.

1780 1790 1800 1810 1820
 CCT GAA GAC ACA GCA TCC ACC CGA TCT TCA TTC ACT GTC CAA GAC CTT
 Pro Glu Asp Thr Ala Ser Thr Arg Ser Ser Phe Thr Val Gln Asp Leu>

 1830 1840 1850 1860 1870
 AAA CCT TTT ACA GAA TAT GTG TTT AGG ATT CGC TGT ATG AAG GAA GAT
 Lys Pro Phe Thr Glu Tyr Val Phe Arg Ile Arg Cys Met Lys Glu Asp>

 1880 1890 1900 1910 1920
 GGT AAG GGA TAC TGG AGT GAC TGG AGT GAA GAA GCA AGT GGG ATC ACC
 Gly Lys Gly Tyr Trp Ser Asp Trp Ser Glu Glu Ala Ser Gly Ile Thr>

 1930 1940 1950 1960
 TAT GAA GAT AGA CCA TCT AAA GCA CCA AGT TTC TGG TAT AAA ATA GAT
 Tyr Glu Asp Arg Pro Ser Lys Ala Pro Ser Phe Trp Tyr Lys Ile Asp>

 1970 1980 1990 2000 2010
 CCA TCC CAT ACT CAA GGC TAC AGA ACT GTA CAA CTC GTG TGG AAG ACA
 Pro Ser His Thr Gln Gly Tyr Arg Thr Val Gln Leu Val Trp Lys Thr>

 2020 2030 2040 2050 2060
 TTG CCT CCT TTT GAA GCC AAT GGA AAA ATC TTG GAT TAT GAA GTG ACT
 Leu Pro Pro Phe Glu Ala Asn Gly Lys Ile Leu Asp Tyr Glu Val Thr>

 2070 2080 2090 2100 2110
 CTC ACA AGA TGG AAA TCA CAT TTA CAA AAT TAC ACA GTT AAT GCC ACA
 Leu Thr Arg Trp Lys Ser His Leu Gln Asn Tyr Thr Val Asn Ala Thr>

 2120 2130 2140 2150 2160
 AAA CTG ACA GTA AAT CTC ACA AAT GAT CGC TAT CTA GCA ACC CTA ACA
 Lys Leu Thr Val Asn Leu Thr Asn Asp Arg Tyr Leu Ala Thr Leu Thr>

 2170 2180 2190 2200
 GTA AGA AAT CTT GTT GGC AAA TCA GAT GCA GCT GTT TTA ACT ATC CCT
 Val Arg Asn Leu Val Gly Lys Ser Asp Ala Ala Val Leu Thr Ile Pro>

 2210 2220 2230 2240 2250
 GCC TGT GAC TTT CAA GCT ACT CAC CCT GTA ATG GAT CTT AAA GCA TTC
 Ala Cys Asp Phe Gln Ala Thr His Pro Val Met Asp Leu Lys Ala Phe>

 2260 2270 2280 2290 2300
 CCC AAA GAT AAC ATG CTT TGG GTG GAA TGG ACT ACT CCA AGG GAA TCT
 Pro Lys Asp Asn Met Leu Trp Val Glu Trp Thr Thr Pro Arg Glu Ser>

 2310 2320 2330 2340 2350
 GTA AAG AAA TAT ATA CTT GAG TGG TGT GTG TTA TCA GAT AAA GCA CCC
 Val Lys Lys Tyr Ile Leu Glu Trp Cys Val Leu Ser Asp Lys Ala Pro>

 2360 2370 2380 2390 2400

Fig.24E.

TGT ATC ACA GAC TGG CAA CAA GAA GAT GGT ACC GTG CAT CGC ACC TAT
 Cys Ile Thr Asp Trp Gln Gln Glu Asp Gly Thr Val His Arg Thr Tyr>
 2410 2420 2430 2440
 TTA AGA GGG AAC TTA GCA GAG AGC AAA TGC TAT TTG ATA ACA GTT ACT
 Leu Arg Gly Asn Leu Ala Glu Ser Lys Cys Tyr Leu Thr Val Thr>
 2450 2460 2470 2480 2490
 CCA GTA TAT GCT GAT GGA CCA GGA AGC CCT GAA TCC ATA AAG GCA TAC
 Pro Val Tyr Ala Asp Gly Pro Gly Ser Pro Glu Ser Ile Lys Ala Tyr>
 2500 2510 2520 2530 2540
 CTT AAA GCA GCT CCT TCC AAA GCA CCT CCT TTT GCG AAC GAA AAA
 Leu Lys Gln Ala Pro Pro Ser Lys Gly Pro Thr Val Arg Thr Lys Lys>
 2550 2560 2570 2580 2590
 GTA GGG AAA AAC GAA GCT GTC TTA GAG TGG GAC CAA CTT CCT GTT GAT
 Val Gly Lys Asn Glu Ala Val Leu Glu Trp Asp Gln Leu Pro Val Asp>
 2600 2610 2620 2630 2640
 GTT CAG AAT GGA TTT ATC AGA AAT TAT ACT ATA TTT TAT AGA ACC ATC
 Val Gln Asn Gly Phe Ile Arg Asn Tyr Thr Ile Phe Tyr Arg Thr Ile>
 2650 2660 2670 2680
 ATT GGA AAT GAA ACT GCT GTG AAT GTG GAT TCT TCC CAC ACA GAA TAT
 Ile Gly Asn Glu Thr Ala Val Asn Val Asp Ser Ser His Thr Glu Tyr>
 2690 2700 2710 2720 2730
 ACA TTG TCC TCT TTG ACT AGT GAC ACA TTG TAC ATG GTA CGA ATG GCA
 Thr Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Thr Leu Tyr Met Val Arg Met Ala>
 2740 2750 2760 2770 2780
 GCA TAC ACA GAT GAA GGT GGG AAG GAT GGT CCA GAA TTC ACT TTT ACT
 Ala Tyr Thr Asp Glu Gly Gly Lys Asp Gly Pro Glu Phe Thr Phe Thr>
 2790 2800 2810 2820 2830
 ACC CCA AAG TTT GCT CAA GGA GAA ATT GAA TCC GGG GGC GAC AAA ACT
 Thr Pro Lys Phe Ala Gln Gly Glu Ile Glu Ser Gly Gly Asp Lys Thr>
 2840 2850 2860 2870 2880
 CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCG TCA
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser>
 2890 2900 2910 2920
 GTC TTC CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACC CTC ATG ATC TCC CGG
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg>
 2930 2940 2950 2960 2970
 ACC CCT GAG GTC ACA TGC GTG GTG GAC GTG AGC CAC GAA GAC CCT

Fig.24F.

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro>
 2980 2990 3000 3010 3020
 * * * * *
 GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC GTG GAG GTG CAT AAT GCC
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala>
 3030 3040 3050 3060 3070
 * * * * *
 AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG TAC AAC AGC ACG TAC CGT GTG GTC
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val>
 3080 3090 3100 3110 3120
 * * * * *
 AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAT GGC AAG GAG TAC
 Ser Val Leu Thr Val Leu His. Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr>
 3130 3140 3150 3160 3170
 * * * * *
 AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GCC CTC CCA GCC CCC ATC GAG AAA ACC
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr>
 3170 3180 3190 3200 3210
 * * * * *
 ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAA CCA CAG GTG TAC ACC CTG
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu>
 3220 3230 3240 3250 3260
 * * * * *
 CCC CCA TCC CGG GAT GAG CTG ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC
 Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys>
 3270 3280 3290 3300 3310
 * * * * *
 CTG GTC AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser>
 3320 3330 3340 3350 3360
 * * * * *
 AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp>
 3370 3380 3390 3400 3410
 * * * * *
 TCC GAC GGC TCC TTC CTC TAC AGC AAG CTC ACC GTG GAC AAG AGC
 Ser Asp Gly Ser Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser>
 3410 3420 3430 3440 3450
 * * * * *
 AGG TGG CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala>
 3460 3470 3480 3490 3500
 * * * * *
 CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CCG GGT AAA
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys>
 *
 TGA
 ***>

Fig.25A.

ATG	GTG	GCC	GTC	GGC	TGC	GCG	CTG	CTG	GCT	GCC	CTG	CTG	GCC	GCG	CCG
Met	Val	Ala	Val	Gly	Cys	Ala	Leu	Leu	Ala	Ala	Leu	Leu	Ala	Ala	Pro
50	60	70	80	90											
GGA	GCG	GCG	CTG	GCC	CCA	AGG	CGC	TGC	CCT	GCG	CAG	GAG	GTG	GCA	AGA
Gly	Ala	Ala	Leu	Ala	Pro	Arg	Arg	Cys	Pro	Ala	Gln	Glu	Val	Ala	Arg
100	110	120	130	140											
GGC	GTG	CTG	ACC	AGT	CTG	CCA	GGA	GAC	AGC	GTG	ACT	CTG	ACC	TGC	CCG
Gly	Val	Leu	Thr	Ser	Leu	Pro	Gly	Asp	Ser	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Pro
150	160	170	180	190											
GGG	GTA	GAG	CCG	GAA	GAC	AAT	GCC	ACT	GTT	CAC	TGG	GTG	CTC	AGG	AAG
Gly	Val	Glu	Pro	Glu	Asp	Asn	Ala	Thr	Val	His	Trp	Val	Leu	Arg	Lys
200	210	220	230	240											
CCG	GCT	GCA	GGC	TCC	CAC	CCC	AGC	AGA	TGG	GCT	GGC	ATG	GGA	AGG	AGG
Pro	Ala	Ala	Gly	Ser	His	Pro	Ser	Arg	Trp	Ala	Gly	Met	Gly	Arg	Arg
250	260	270	280												
CTG	CTG	CTG	AGG	TCG	GTG	CAG	CTC	CAC	GAC	TCT	GGA	AAC	TAT	TCA	TGC
Leu	Leu	Leu	Arg	Ser	Val	Gln	Leu	His	Asp	Ser	Gly	Asn	Tyr	Ser	Cys
290	300	310	320	330											
TAC	CGG	GCC	GGC	CGC	CCA	GCT	GGG	ACT	GTG	CAC	TTG	CTG	GTG	GAT	GTT
Tyr	Arg	Ala	Gly	Arg	Pro	Ala	Gly	Thr	Val	His	Leu	Leu	Val	Asp	Val
340	350	360	370	380											
CCC	CCC	GAG	GAG	CCC	CAG	CTC	TCC	TTC	CGG	AAG	AGC	CCC	CTC	AGC	
Pro	Pro	Glu	Glu	Pro	Gln	Leu	Ser	Cys	Phe	Arg	Lys	Ser	Pro	Leu	Ser
390	400	410	420	430											
AAT	GTT	GTT	TGT	GAG	TGG	GGT	CCT	CGG	AGC	ACC	CCA	TCC	CTG	ACG	ACA
Asn	Val	Val	Cys	Glu	Trp	Gly	Pro	Arg	Ser	Thr	Pro	Ser	Leu	Thr	Thr
440	450	460	470	480											
AAG	GCT	GTG	CTC	TTG	GTG	AGG	AAG	TTT	CAG	AAC	AGT	CCG	GCC	GAA	GAC
Lys	Ala	Val	Leu	Leu	Val	Arg	Lys	Phe	Gln	Asn	Ser	Pro	Ala	Glu	Asp
490	500	510	520												
TTC	CAG	GAG	CCG	TGC	CAG	TAT	TCC	CAG	GAG	TCC	CAG	AAG	TTC	TCC	TGC
Phe	Gln	Glu	Pro	Cys	Gln	Tyr	Ser	Gln	Glu	Ser	Gln	Lys	Phe	Ser	Cys
530	540	550	560	570											
CAG	TTA	GCA	GTC	CCG	GAG	GGA	GAC	AGC	TCT	TTC	TAC	ATA	GTG	TCC	ATG
Gln	Leu	Ala	Val	Pro	Glu	Gly	Asp	Ser	Ser	Phe	Tyr	Ile	Val	Ser	Met

Fig.25A.

10 20 30 40

```

ATG GTG GCC GTC GGC TGC GCG CTG CTG GCT GCC CTG CTG GCC GCG CCC
Met Val Ala Val Gly Cys Ala Leu Leu Ala Ala Leu Leu Ala Ala Pro>

```

50 60 70 80 90

```

GGA GCG GCG CTG GCC CCA AGG CGC TGC CCT GCG CAG GAG GTG GCA AGA
Gly Ala Ala Leu Ala Pro Arg Arg Cys Pro Ala Gln Glu Val Ala Arg>

```

100 110 120 130 140

```

GGC GTG CTG ACC AGT CTG CCA GGA GAC AGC GTG ACT CTG ACC TGC CCC
Gly Val Leu Thr Ser Leu Pro Gly Asp Ser Val Thr Leu Thr Cys Pro>

```

150 160 170 180 190

```

GGG GTA GAG CCG GAA GAC AAT GCC ACT GTT CAC TGG GTG CTC AGG AAG
Gly Val Glu Pro Glu Asp Asn Ala Thr Val His Trp Val Leu Arg Lys>

```

200 210 220 230 240

```

CCG GCT GCA GGC TCC CAC CCC AGC AGA TGG GCT GGC ATG GGA AGG AGG
Pro Ala Ala Gly Ser His Pro Ser Arg Trp Ala Gly Met Gly Arg Arg>

```

250 260 270 280

```

CTG CTG CTG AGG TCG GTG CAG CTC CAC GAC TCT GGA AAC TAT TCA TGC
Leu Leu Leu Arg Ser Val Gln Leu His Asp Ser Gly Asn Tyr Ser Cys>

```

290 300 310 320 330

```

TAC CGG GCC CGC CCA GCT GGG ACT GTG CAC TTG CTG GTG GAT GTT
Tyr Arg Ala Gly Arg Pro Ala Gly Thr Val His Leu Leu Val Asp Val>

```

340 350 360 370 380

```

CCC CCC GAG GAG CCC CAG CTC TCC TGC TTC CGG AAG AGC CCC CTC AGC
Pro Pro Glu Glu Pro Gln Leu Ser Cys Phe Arg Lys Ser Pro Leu Ser>

```

390 400 410 420 430

```

AAT GTT GTT TGT GAG TGG GGT CCT CGG AGC ACC CCA TCC CTG ACG ACA
Asn Val Val Cys Glu Trp Gly Pro Arg Ser Thr Pro Ser Leu Thr Thr>

```

440 450 460 470 480

```

AAG GCT GTG CTC TTG GTG AGG TTT CAG AAC AGT CCG GCC GAA GAC
Lys Ala Val Leu Leu Val Arg Lys Phe Gln Asn Ser Pro Ala Glu Asp>

```

490 500 510 520

```

TTC CAG GAG CCG TGC CAG TAT TCC CAG GAG TCC CAG AAG TTC TCC TGC
Phe Gln Glu Pro Cys Gln Tyr Ser Gln Glu Ser Gln Lys Phe Ser Cys>

```

530 540 550 560 570

```

CAG TTA GCA GTC CCG GAG GGA GAC AGC TCT TTC TAC ATA GTG TCC ATG
Gln Leu Ala Val Pro Glu Gly Asp Ser Ser Phe Tyr Ile Val Ser Met>

```

Fig.25B.

580 590 600 610 620
 TGC GTC GCC AGT AGT GTC GGG AGC AAG TTC AGC AAA ACT CAA ACC ACC TTT
 Cys Val Ala Ser Ser Val Gly Ser Lys Phe Ser Lys Thr Gln Thr Phe>
 630 640 650 660 670
 CAG GGT TGT GGA ATC TTG CAG CCT GAT CCG CCT GCC AAC ATC ACA GTC
 Gln Gly Cys Gly Ile Leu Gln Pro Asp Pro Pro Ala Asn Ile Thr Val>
 680 690 700 710 720
 ACT GCC GTG GCC AGA AAC CCC CGC TGG CTC AGT GTC ACC TGG CAA GAC
 Thr Ala Val Ala Arg Asn Pro Arg Trp Leu Ser Val Thr Trp Gln Asp>
 730 740 750 760
 CCC CAC TCC TGG AAC TCA TCT TTC TAC AGA CTA CGG TTT GAG CTC AGA
 Pro His Ser Trp Asn Ser Ser Phe Tyr Arg Leu Arg Phe Glu Leu Arg>
 770 780 790 800 810
 TAT CGG GCT GAA CGG TCA AAG ACA TTC ACA ACA TGG ATG GTC AAG GAC
 Tyr Arg Ala Glu Arg Ser Lys Thr Phe Thr Thr Trp Met Val Lys Asp>
 820 830 840 850 860
 CTC CAG CAT CAC TGT GTC ATC CAC GAC GCC TGG AGC GGC CTG AGG CAC
 Leu Gln His His Cys Val Ile His Asp Ala Trp Ser Gly Leu Arg His>
 870 880 890 900 910
 GTG GTG CAG CTT CGT GCC CAG GAG GAG TTC GGG CAA GGC GAG TGG AGC
 Val Val Gln Leu Arg Ala Gln Glu Glu Phe Gly Gln Gly Glu Trp Ser>
 920 930 940 950 960
 GAG TGG AGC CCG GAG GCC ATG GGC ACG CCT TGG ACA GAA TCG CGA TCG
 Glu Trp Ser Pro Glu Ala Met Gly Thr Pro Trp Thr Glu Ser Arg Ser>
 970 980 990 1000
 CCT CCA GCT GAG AAC GAG GTG TCC ACC CCC ATG GAA CTT CTA GAC CCA
 Pro Pro Ala Glu Asn Glu Val Ser Thr Pro Met Glu Leu Leu Asp Pro>
 1010 1020 1030 1040 1050
 TGT GGT TAT ATC AGT CCT GAA TCT CCA GTT GTC CAA CTT CAT TCT AAT
 Cys Gly Tyr Ile Ser Pro Glu Ser Pro Val Val Gln Leu His Ser Asn>
 1060 1070 1080 1090 1100
 TTC ACT GCA GTT TGT GTG CTA AAG GAA AAA TGT ATG GAT TAT TTT CAT
 Phe Thr Ala Val Cys Val Leu Lys Glu Lys Cys Met Asp Tyr Phe His>
 1110 1120 1130 1140 1150
 GTC AAT GCT AAT TAC ATT GTC TGG AAA ACA AAC CAT TTT ACT ATT CCT
 Val Asn Ala Asn Tyr Ile Val Trp Lys Thr Asn His Phe Thr Ile Pro>
 1160 1170 1180 1190 1200

Fig.25C.

AAG GAG CAA TAT ACT ATC ATA AAC AGA ACA GCA TCC AGT GTC ACC TTT
 Lys Glu Gln Tyr Thr Ile Ile Asn Arg Thr Ala Ser Ser Val Thr Phe>
 1210 1220 1230 1240
 * * * *
 ACA GAT ATA GCT TCA TTA AAT ATT CAG CTC ACT TGC AAC ATT CTT ACA
 Thr Asp Ile Ala Ser Leu Asn Ile Gln Leu Thr Cys Asn Ile Leu Thr>
 1250 1260 1270 1280 1290
 * * * * *
 TTC GGA CAG CTT GAA CAG AAT GTT TAT GGA ATC ACA ATA ATT TCA CGC
 Phe Gly Gln Leu Glu Gln Asn Val Tyr Gly Ile Thr Ile Ile Ser Gly>
 1300 1310 1320 1330 1340
 * * * * *
 TTG CCT CCA GAA AAA CCT AAA AAT TTG AGT TGC ATT GTG AAC GAG GGG
 Lys Pro Pro Glu Lys Pro Lys Asn Leu Ser Cys Ile Val Asn Glu Gly>
 1350 1360 1370 1380 1390
 * * * * *
 AAG AAA ATG AGG TGT GAG TGG GAT GGT GGA AGG GAA ACA CAC TTG GAG
 Lys Lys Met Arg Cys Glu Trp Asp Gly Arg Glu Thr His Leu Glu>
 1400 1410 1420 1430 1440
 * * * * *
 ACA AAC TTC ACT TTA AAA TCT GAA TGG GCA ACA CAC AAG TTT GCT GAT
 Thr Asn Phe Thr Leu Lys Ser Glu Trp Ala Thr His Lys Phe Ala Asp>
 1450 1460 1470 1480
 * * * * *
 TGC AAA GCA AAA CGT GAC ACC CCC ACC TCA TGC ACT GTT GAT TAT TCT
 Cys Lys Ala Lys Arg Asp Thr Pro Thr Ser Cys Thr Val Asp Tyr Ser>
 1490 1500 1510 1520 1530
 * * * * *
 ACT GTG TAT TTT GTC AAC ATT GAA GTC TGG GTA GAA GCA GAG AAT GCC
 Thr Val Tyr Phe Val Asn Ile Glu Val Trp Val Glu Ala Glu Asn Ala>
 1540 1550 1560 1570 1580
 * * * * *
 CTT GGG AAG GTT ACA TCA GAT CAT ATC AAT TTT GAT CCT GTA TAT AAA
 Leu Gly Lys Val Thr Ser Asp His Ile Asn Phe Asp Pro Val Tyr Lys>
 1590 1600 1610 1620 1630
 * * * * *
 GTG AAG CCC AAT CCG CCA CAT AAT TTA TCA GTG ATC AAC TCA GAG GAA
 Val Lys Pro Asn Pro Pro His Asn Leu Ser Val Ile Asn Ser Glu Glu>
 1640 1650 1660 1670 1680
 * * * * *
 CTG TCT AGT ATC TTA AAA TTG ACA TGG ACC AAC CCA AGT ATT AAG AGT
 Leu Ser Ser Ile Leu Lys Leu Thr Trp Thr Asn Pro Ser Ile Lys Ser>
 1690 1700 1710 1720
 * * * * *
 GTT ATA ATA CTA AAA TAT AAC ATT CAA TAT AGG ACC AAA GAT GCC TCA
 Val Ile Ile Leu Lys Tyr Asn Ile Gln Tyr Arg Thr Lys Asp Ala Ser>
 1730 1740 1750 1760 1770
 * * * * *
 ACT TGG AGC CAG ATT CCT CCT GAA GAC ACA GCA TCC ACC CGA TCT TCA
 Thr Trp Ser Gln Ile Pro Pro Glu Asp Thr Ala Ser Thr Arg Ser Ser>

Fig.25D.

1780	1790	1800	1810	1820
TTC ACT GTC CAA GAC CTT AAA CCT TTT ACA GAA TAT GTG TTT AGG ATT Phe Thr Val Gln Asp Leu Lys Pro Phe Thr Glu Tyr Val Phe Arg Ile>				
1830	1840	1850	1860	1870
CGC TGT ATG AAG GAA GAT GGT AAG GGA TAC TGG AGT GAC TGG AGT GAA Arg Cys Met Lys Glu Asp Gly Lys Gly Tyr Trp Ser Asp Trp Ser Glu>				
1880	1890	1900	1910	1920
GAA GCA AGT GGG ATC ACC TAT GAA GAT AGA CCA TCT AAA GCA CCA AGT Glu Ala Ser Gly Ile Thr Tyr Glu Asp Arg Pro Ser Lys Ala Pro Ser>				
1930	1940	1950	1960	
TTC TGG TAT AAA ATA GAT CCA TCC CAT ACT CAA GGC TAC AGA ACT GTA Phe Trp Tyr Lys Ile Asp Pro Ser His Thr Gln Gly Tyr Arg Thr Val>				
1970	1980	1990	2000	2010
CAA CTC GTG TGG AAG ACA TTG CCT CCT TTT GAA GCC AAT GGA AAA ATC Gln Leu Val Trp Lys Thr Leu Pro Pro Phe Glu Ala Asn Gly Lys Ile>				
2020	2030	2040	2050	2060
TTG GAT TAT GAA GTG ACT CTC ACA AGA TGG AAA TCA CAT TTA CAA AAT Leu Asp Tyr Glu Val Thr Leu Thr Arg Trp Lys Ser His Leu Gln Asn>				
2070	2080	2090	2100	2110
TAC ACA GTT AAT GCC ACA AAA CTG ACA GTA AAT CTC ACA AAT GAT CGC Tyr Thr Val Asn Ala Thr Lys Leu Thr Val Asn Leu Thr Asn Asp Arg>				
2120	2130	2140	2150	2160
TAT CTA GCA ACC CTA ACA GTA AGA AAT CTT GTT GGC AAA TCA GAT GCA Tyr Leu Ala Thr Leu Thr Val Arg Asn Leu Val Gly Lys Ser Asp Ala>				
2170	2180	2190	2200	
GCT GTT TTA ACT ATC CCT GCC TGT GAC TTT CAA GCT ACT CAC CCT GTA Ala Val Leu Thr Ile Pro Ala Cys Asp Phe Gln Ala Thr His Pro Val>				
2210	2220	2230	2240	2250
ATG GAT CTT AAA GCA TTC CCC AAA GAT AAC ATG CTT TGG GTG GAA TGG Met Asp Leu Lys Ala Phe Pro Lys Asp Asn Met Leu Trp Val Glu Trp>				
2260	2270	2280	2290	2300
ACT ACT CCA AGG GAA TCT GTA AAG AAA TAT ATA CTT GAG TGG TGT GTG Thr Thr Pro Arg Glu Ser Val Lys Lys Tyr Ile Leu Glu Trp Cys Val>				
2310	2320	2330	2340	2350
TTA TCA GAT AAA GCA CCC TGT ATC ACA GAC TGG CAA CAA GAA GAT GGT Leu Ser Asp Lys Ala Pro Cys Ile Thr Asp Trp Gln Gln Glu Asp Gly>				
2360	2370	2380	2390	2400

Fig.25E.

ACC GTG CAT CGC ACC TAT TTA AGA GGG AAC TTA GCA GAG AGC AAA TGC
 Thr Val His Arg Thr Tyr Leu Arg Gly Asn Leu Ala Glu Ser Lys Cys>
 2410 2420 2430 2440
 TAT TTG ATA ACA GTC ACT CCA GTA TAT GCT GAT GGA CCA GGA AGC CCT
 Tyr Leu Ile Thr Val Thr Pro Val Tyr Ala Asp Gly Pro Gly Ser Pro>
 2450 2460 2470 2480 2490
 GAA TCC ATA AAG GCA TAC CTT AAA CAA GCT CCA CCT TCC AAA GGA CCT
 Glu Ser Ile Lys Ala Tyr Leu Lys Gln Ala Pro Pro Ser Lys Gly Pro>
 2500 2510 2520 2530 2540
 ACT GTT CGG ACA AAA AAA GTA GGG AAA AAC GAA GCT GTC TTA GAG TGG
 Thr Val Arg Thr Lys Lys Val Gly Lys Asn Glu Ala Val Leu Glu Trp>
 2550 2560 2570 2580 2590
 GAC CAA CTT CCT GTT GAT GTT CAG AAT GGA TTT ATC AGA AAT TAT ACT
 Asp Gln Leu Pro Val Asp Val Gln Asn Gly Phe Ile Arg Asn Tyr Thr>
 2600 2610 2620 2630 2640
 ATA TTT TAT AGA ACC ATC ATT GGA AAT GAA ACT GCT GTG AAT GTG GAT
 Ile Phe Tyr Arg Thr Ile Ile Gly Asn Glu Thr Ala Val Asn Val Asp>
 2650 2660 2670 2680
 TCT TCC CAC ACA GAA TAT ACA TTG TCC TCT TTG ACT AGT GAC ACA TTG
 Ser Ser His Thr Glu Tyr Thr Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Thr Leu>
 2690 2700 2710 2720 2730
 TAC ATG GTA CGA ATG GCA GCA TAC ACA GAT GAA GGT GGG AAG GAT GGT
 Tyr Met Val Arg Met Ala Ala Tyr Thr Asp Glu Gly Gly Lys Asp Gly>
 2740 2750 2760 2770 2780
 CCA GAA TTC ACT TTT ACT ACC CCA AAG TTT GCT CAA GGA GAA ATT GAA
 Pro Glu Phe Thr Phe Thr Pro Lys Phe Ala Gln Gly Glu Ile Glu>
 2790 2800 2810 2820 2830
 TCC GGG GGC GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA GCA CCT GAA
 Ser Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu>
 2840 2850 2860 2870 2880
 CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC TTC CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC
 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp>
 2890 2900 2910 2920
 ACC CTC ATG ATC TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACA TGC GTG GTG GTG GAC
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp>
 2930 2940 2950 2960 2970
 GTG AGC CAC GAA GAC CCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC

Fig.25F.

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly>
 2980 2990 3000 3010 3020
 GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG TAC AAC
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn>
 3030 3040 3050 3060 3070
 AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp>
 3080 3090 3100 3110 3120
 CTC IAT CGC IAC IAG TAC AAC TCC AAG GTT TCC AAC AAT GCC CTC CCA
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro>
 3130 3140 3150 3160
 GCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAA
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu>
 3170 3180 3190 3200 3210
 CCA CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CCG GAT GAG CTG ACC AAG AAC
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn>
 3220 3230 3240 3250 3260
 CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAT CCC ACC GAC ATC
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile>
 3270 3280 3290 3300 3310
 GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr>
 3320 3330 3340 3350 3360
 ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC AGC AAG
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys>
 3370 3380 3390 3400
 CTC ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC
 Leu Thr Val Asp Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys>
 3410 3420 3430 3440 3450
 TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG AGC CTC
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu>
 3460 3470
 TCC CTG TCT CCG GGT AAA TGA
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys ***>

Fig.27.

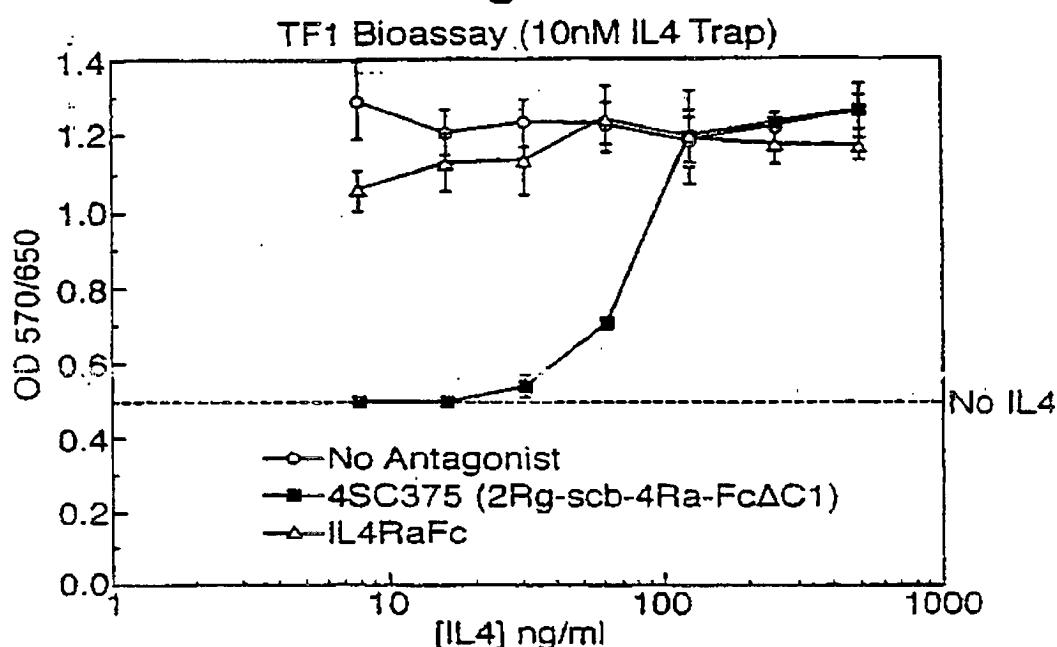


Fig.28.

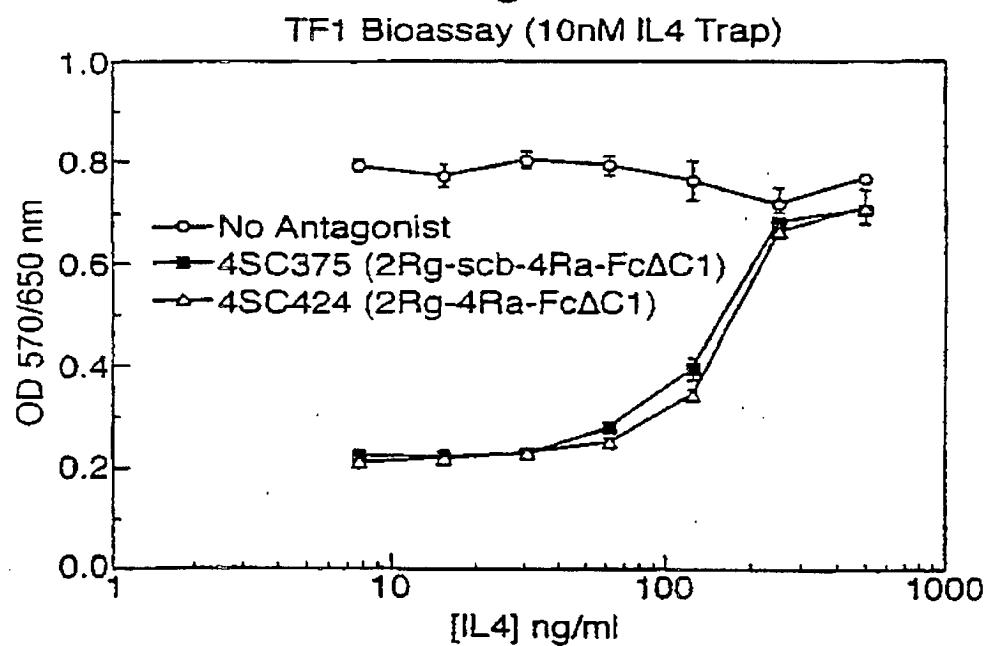


Fig.29.

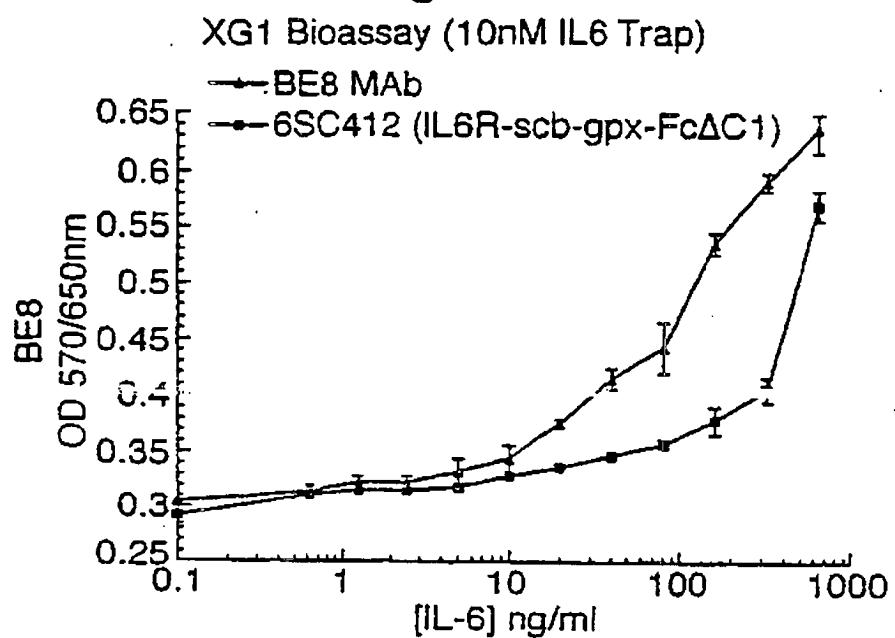


Fig.31A.

10	20	30	40	
*	*	*	*	*
ATG GTG TGG CTT TGC TCT GGG CTC CTG TTC CCT GTG AGC TGC CTG GTC	TAC CAC ACC GAA ACG AGA CCC GAG GAC AAG GGA CAC TCG ACG GAC CAG	Met Val Trp Leu Cys Ser Gly Leu Leu Phe Pro Val Ser Cys Leu Val>		
50	60	70	80	90
*	*	*	*	*
CTG CTG CAG GTG GCA AGC TCT GGG AAC ATG AAG GTC TTG CAG GAG CCC	GAC GAC GTC CAC CGT TCG AGA CCC TTG TAC TTC CAG AAC GTC CTC GGG	Leu Leu Gln Val Ala Ser Ser Gly Asn Met Lys Val Leu Gln Glu Pro>		
100	110	120	130	140
*	*	*	*	*
ACC TGC GTC TCC GAC TAC ATG AGC ATC TCT ACT TGC GAG TGG AAG ATG	TGG ACG CAG AGG CTG ATG TAC TCG TAG AGA TGA ACG CTC ACC TTC TAC	Thr Cys Val Ser Asp Tyr Met Ser Ile Ser Thr Cys Glu Trp Lys Met>		
150	160	170	180	190
*	*	*	*	*
AAT GGT CCC ACC AAT TGC AGC ACC GAG CTC CGC CTG TTG TAC CAG CTG	TTA CCA GGG TGG TTA ACG TCG TGG CTC GAG GCG GAC AAC ATG GTC GAC	Asn Gly Pro Thr Asn Cys Ser Thr Glu Leu Arg Leu Leu Tyr Gln Leu>		
200	210	220	230	240
*	*	*	*	*
GTT TTT CTG CTC TCC GAA GCC CAC ACG TGT ATC CCT GAG AAC AAC GGA	CAA AAA GAC GAG AGG CTT CGG GTG TGC ACA TAG GGA CTC TTG TTG CCT	Val Phe Leu Leu Ser Glu Ala His Thr Cys Ile Pro Glu Asn Asn Gly>		
250	260	270	280	
*	*	*	*	*
GGC GCG GGG TGC GTG TGC CAC CTG CTC ATG GAT GAC GTG GTC AGT GCG	CCG CGC CCC ACG CAC ACG GTG GAC GAG TAC CTA CTG CAC CAG TCA CGC	Gly Ala Gly Cys Val Cys His Leu Leu Met Asp Asp Val Val Ser Ala>		
290	300	310	320	330
*	*	*	*	*
GAT AAC TAT ACA CTG GAC CTG TGG GCT GGG CAG CAG CTG CTG TGG AAG	CTA TTG ATA TGT GAC CTG GAC ACC CGA CCC GTC GTC GAC GAC ACC TTC	Asp Asn Tyr Thr Leu Asp Leu Trp Ala Gly Gln Gln Leu Leu Trp Lys>		
340	350	360	370	380
*	*	*	*	*
GGC TCC TTC AAG CCC AGC GAG CAT GTG AAA CCC AGG GCC CCA GGA AAC	CCG AGG AAG TTC GGG TCG CTC GTA CAC TTT GGG TCC CGG GGT CCT TTG	Gly Ser Phe Lys Pro Ser Glu His Val Lys Pro Arg Ala Pro Gly Asn>		

Fig.31B.

390	400	410	420	430
*	*	*	*	*
CTG ACA GTT CAC ACC AAT GTC TCC GAC ACT CTG CTG CTG ACC TGG AGC GAC TGT CAA GTG TGG TTA CAG AGG CTG TGA GAC GAC TGG ACC TCG Leu Thr Val His Thr Asn Val Ser Asp Thr Leu Leu Thr Trp Ser>				
440	450	460	470	480
*	*	*	*	*
AAC CCG TAT CCC CCT GAC AAT TAC CTG TAT AAT CAT CTC ACC TAT GCA TTC GGC ATA GGG GGA CTG TTA ATG GAC ATA TTA GTA GAG TGG ATA CGT Asn Pro Tyr Pro Pro Asp Asn Tyr Leu Tyr Asn His Leu Thr Tyr Ala>				
490	500	510	520	
*	*	*	*	*
GTC AAC ATT TGG AGT GAA AAC GAC CCG GCA GAT TTC AGA ATC TAT AAC CAG TTG TAA ACC TCA CTT TTG CTG GGC CGT CTA AAG TCT TAG ATA TTG Val Asn Ile Trp Ser Glu Asn Asp Pro Ala Asp Phe Arg Ile Tyr Asn>				
530	540	550	560	570
*	*	*	*	*
GTG ACC TAC CTA GAA CCC TCC CTC CGC ATC GCA GCC AGC ACC CTG AAG CAC TGG ATG GAT CTT GGG AGG GAG GCG TAG CGT CGG TCG TGG GAC TTC Val Thr Tyr Leu Glu Pro Ser Leu Arg Ile Ala Ala Ser Thr Leu Lys>				
580	590	600	610	620
*	*	*	*	*
TCT GGG ATT TCC TAC AGG GCA CGG GTG AGG GCC TGG GCT CAG AGC TAT AGA CCC TAA AGG ATG TCC CGT GCC CAC TCC CGG ACC CGA GTC TCG ATA Ser Gly Ile Ser Tyr Arg Ala Arg Val Arg Ala Trp Ala Gln Ser Tyr>				
630	640	650	660	670
*	*	*	*	*
AAC ACC ACC TGG AGT GAG TGG AGC CCC AGC ACC AAG TGG CAC AAC TCC TTG TGG TGG ACC TCA CTC ACC TCG GGG TCG TGG TTC ACC GTG TTG AGG Asn Thr Thr Trp Ser Glu Trp Ser Pro Ser Thr Lys Trp His Asn Ser>				
680	690	700	710	720
*	*	*	*	*
TAC AGG GAG CCC TTC GAG CAG TCC GGT GGG GGC GGG GGC GCC GCG CCT ATG TCC CTC GGG AAG CTC GTC AGG CCA CCC CCG CCC CCG CGG CGC GGA Tyr Arg Glu Pro Phe Glu Gln Ser Gly Gly Gly Gly Ala Ala Pro>				
730	740	750	760	
*	*	*	*	*
ACG GAA ACT CAG CCA CCT GTG ACA AAT TTG AGT GTC TCT GTT GAA AAC TGC CTT TGA GTC GGT GGA CAC TGT TTA AAC TCA CAG AGA CAA CTT TTG Thr Glu Thr Gln Pro Pro Val Thr Asn Leu Ser Val Ser Val Glu Asn>				

Fig.31C.

770	780	790	800	810											
*	*	*	*	*											
CTC	TGC	ACA	GTA	ATA	TGG	ACA	TGG	AAT	CCA	CCC	GAG	GGA	GCC	AGC	TCA
GAG	ACG	TGT	CAT	TAT	ACC	TGT	ACC	TTA	GGT	GGG	CTC	CCT	CGG	TCG	AGT
Leu	Cys	Thr	Val	Ile	Trp	Thr	Trp	Asn	Pro	Pro	Glu	Gly	Ala	Ser	Ser>
820	830	840	850	860	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
AAT	TGT	AGT	CTA	TGG	TAT	TTT	AGT	CAT	TTT	GGC	GAC	AAA	CAA	GAT	AAG
TTA	ACA	TCA	GAT	ACC	ATA	AAA	TCA	GTA	AAA	CCG	CTG	TTT	GTT	CTA	TTC
Asn	Cys	Ser	Leu	Trp	Tyr	Phe	Ser	His	Phe	Gly	Asp	Lys	Gln	Asp	Lys>
870	880	890	900	910	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
AAA	ATA	GCT	CCG	GAA	ACT	CGT	CGT	TCA	ATA	GAA	GTA	CCC	CTG	AAT	GAG
TTT	TAT	CGA	GGC	CTT	TGA	GCA	GCA	AGT	TAT	CTT	CAT	GGG	GAC	TTA	CTC
Lys	Ile	Ala	Pro	Glu	Thr	Arg	Arg	Ser	Ile	Glu	Val	Pro	Leu	Asn	Glu>
920	930	940	950	960	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
AGG	ATT	TGT	CTG	CAA	GTG	GGG	TCC	CAG	TGT	AGC	ACC	AAT	GAG	AGT	GAG
TCC	TAA	ACA	GAC	GTT	CAC	CCC	AGG	GTC	ACA	TCG	TGG	TTA	CTC	TCA	CTC
Arg	Ile	Cys	Leu	Gln	Val	Gly	Ser	Gln	Cys	Ser	Thr	Asn	Glu	Ser	Glu>
970	980	990	1000	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
AAG	CCT	AGC	ATT	TTG	GTT	GAA	AAA	TGC	ATC	TCA	CCC	CCA	GAA	GGT	GAT
TTC	GGA	TCG	TAA	AAC	CAA	CTT	TTT	ACG	TAG	AGT	GGG	GGT	CTT	CCA	CTA
Lys	Pro	Ser	Ile	Leu	Val	Glu	Lys	Cys	Ile	Ser	Pro	Pro	Glu	Gly	Asp>
1010	1020	1030	1040	1050	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CCT	GAG	TCT	GCT	G TG	ACT	GAG	CTT	CAA	TGC	ATT	TGG	CAC	AAC	CTG	AGC
GGA	CTC	AGA	CGA	CAC	TGA	CTC	GAA	GTT	ACG	TAA	ACC	GTG	TTG	GAC	TCG
Pro	Glu	Ser	Ala	Val	Thr	Glu	Leu	Gln	Cys	Ile	Trp	His	Asn	Leu	Ser>
1060	1070	1080	1090	1100	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
TAC	ATG	AAG	TGT	TCT	TGG	CTC	CCT	GGA	AGG	AAT	ACC	AGT	CCC	GAC	ACT
ATG	TAC	TTC	ACA	AGA	ACC	GAG	GGA	CCT	TCC	TTA	TGG	TCA	GGG	CTG	TGA
Tyr	Met	Lys	Cys	Ser	Trp	Leu	Pro	Gly	Arg	Asn	Thr	Ser	Pro	Asp	Thr>
1110	1120	1130	1140	1150	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
AAC	TAT	ACT	CTC	TAC	TAT	TGG	CAC	AGA	AGC	CTG	GAA	AAA	ATT	CAT	CAA
TTG	ATA	TGA	GAG	ATG	ATA	ACC	GTG	TCT	TCG	GAC	CTT	TTT	TAA	GTA	GTT
Asn	Tyr	Thr	Leu	Tyr	Tyr	Trp	His	Arg	Ser	Leu	Glu	Lys	Ile	His	Gln>

Fig.31D.

1160 1170 1180 1190 1200
 * * * * *
 TGT GAA AAC ATC TTT AGA GAA GGC CAA TAC TTT GGT TGT TCC TTT GAT
 ACA CTT TTG TAG AAA TCT CTT CCG GTT ATG AAA CCA ACA AGG AAA CTA
 Cys Glu Asn Ile Phe Arg Glu Gly Gln Tyr Phe Gly Cys Ser Phe Asp>

 1210 1220 1230 1240
 * * * * *
 CTG ACC AAA GTG AAG GAT TCC AGT TTT GAA CAA CAC AGT GTC CAA ATA
 GAC TGG TTT CAC TTC CTA AGG TCA AAA CTT GTT GTG TCA CAG GTT TAT
 Ceu Thr Lys Val Lys Asp Ser Ser Phe Glu Gln His Ser Val Gln Ile>

 1250 1260 1270 1280 1290
 * * * * *
 ATG GTC AAG GAT AAT GCA GGA AAA ATT AAA CCA TCC TTC AAT ATA GTG
 TAC CAG TTC CTA TTA CGT CCT TTT TAA TTT GGT AGG AAG TTA TAT CAC
 Met Val Lys Asp Asn Ala Gly Lys Ile Lys Pro Ser Phe Asn Ile Val>

 1300 1310 1320 1330 1340
 * * * * *
 CCT TTA ACT TCC CGT GTG AAA CCT GAT CCT CCA CAT ATT AAA AAC CTC
 GGA AAT TGA AGG GCA CAC TTT GGA CTA GGA GGT GTA TAA TTT TTG GAG
 Pro Leu Thr Ser Arg Val Lys Pro Asp Pro Pro His Ile Lys Asn Leu>

 1350 1360 1370 1380 1390
 * * * * *
 TCC TTC CAC AAT GAT GAC CTA TAT GTG CAA TGG GAG AAT CCA CAG AAT
 AGG AAG GTG TTA CTA CTG GAT ATA CAC GGT ACC CTC TTA GGT GTC TTA
 Ser Phe His Asn Asp Asp Leu Tyr Val Gln Trp Glu Asn Pro Gln Asn>

 1400 1410 1420 1430 1440
 * * * * *
 TTT ATT AGC AGA TGC CTA TTT TAT GAA GTA GAA GTC AAT AAC AGC CAA
 AAA TAA TCG TCT ACG GAT AAA ATA CTT CAT CTT CAG TTA TTG TCG GTT
 Phe Ile Ser Arg Cys Leu Phe Tyr Glu Val Glu Val Asn Asn Ser Gln>

 1450 1460 1470 1480
 * * * * *
 ACT GAG ACA CAT AAT GTT TTC TAC GTC CAA GAG GCT AAA TGT GAG AAT
 TGA CTC TGT GTA TTA CAA AAG ATG CAG GTT CTC CGA TTT ACA CTC TTA
 Thr Glu Thr His Asn Val Phe Tyr Val Gln Glu Ala Lys Cys Glu Asn>

 1490 1500 1510 1520 1530
 * * * * *
 CCA GAA TTT GAG AGA AAT GTG GAG AAT ACA TCT TGT TTC ATG GTC CCT
 GGT CTT AAA CTC TCT TTA CAC CTC TTA TGT AGA ACA AAG TAC CAG GGA
 Pro Glu Phe Glu Arg Asn Val Glu Asn Thr Ser Cys Phe Met Val Pro>

Fig.31E.

1540	1550	1560	1570	1580
*	*	*	*	*
GGT GTT CTT CCT GAT ACT TTG AAC ACA GTC AGA ATA AGA GTC AAA ACA CCA CAA GAA GGA CTA TGA AAC TTG TGT CAG TCT TAT TCT CAG TTT TGT Gly Val Leu Pro Asp Thr Leu Asn Thr Val Arg Ile Arg Val Lys Thr>				
1590	1600	1610	1620	1630
*	*	*	*	*
AAT AAG TTA TGC TAT GAG GAT GAC AAA CTC TGG AGT AAT TGG AGC CAA TTA TTC AAT ACG ATA CTC CTA CTG TTT GAG ACC TCA TTA ACC TCG GTT Asn Lys Leu Cys Tyr Glu Asp Asp Lys Leu Trp Ser Asn Trp Ser Gln>				
1640	1650	1660	1670	1680
*	*	*	*	*
GAA ATG AGT ATA GGT AAG AAG CGC AAT TCC ACA ACC GGA GAC AAA ACT CTT TAC TCA TAT CCA TTC TGC GCG TTA AGG TGT TGG CCT CTG TTT TGA Glu Met Ser Ile Gly Lys Lys Arg Asn Ser Thr Thr Gly Asp Lys Thr>				
1690	1700	1710	1720	
*	*	*	*	
CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTG TGT ACG GGT GGC ACG GGT CGT GGA CTT GAG GAC CCC CCT GGC AGT His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser>				
1730	1740	1750	1760	1770
*	*	*	*	*
GTC TTC CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACC CTC ATG ATC TCC CGG CAG AAG GAG AAG GGG GGT TTT GGG TTC CTG TGG GAG TAC TAG AGG GCC Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg>				
1780	1790	1800	1810	1820
*	*	*	*	*
ACC CCT GAG GTC ACA TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAC GAA GAC CCT TGG GGA CTC CAG TGT ACG CAC CAC CTG CAC TCG GTG CTT CTG GGA Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro>				
1830	1840	1850	1860	1870
*	*	*	*	*
GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC GTG GAG GTG CAT AAT GCC CTC CAG TTC AAG TTG ACC ATG CAC CTG CCG CAC CTC CAC GTA TTA CGG Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala>				
1880	1890	1900	1910	1920
*	*	*	*	*
AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG TAC AAC AGC ACG TAC CGT GTG GTC TTC TGT TTC GGC GCC CTC CTC GTC ATG TTG TCG TGC ATG GCA CAC CAG Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val>				

Fig.31F.

1930	1940	1950	1960	
AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAT GGC AAG GAG TAC TCG CAG GAG TGG CAG GAC GTG GTC CTG ACC GAC TTA CCG TTC CTC ATG Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr>				
1970	1980	1990	2000	2010
AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GCC CTC CCA GCC CCC ATC GAG AAA ACC TTC ACG TTC CAG AGG TTG TTT CGG GAG GGT CGG GGG TAG CTC TTT TGG Leu Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr>				
2020	2030	2040	2050	2060
ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAA CCA CAG GTG TAC ACC CTG TAG AGG TTT CGG TTT CCC GTC GGG GCT CTT GGT GTC CAC ATG TGG GAC Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu>				
2070	2080	2090	2100	2110
CCC CCA TCC CGG GAG GAG ATG ACC AAC AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC GGG GGT AGG GCC CTC CTC TAC TGG TTC TTG GTC CAG TCG GAC TGG ACG Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys>				
2120	2130	2140	2150	2160
CTG GTC AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC GAC CAG TTT CCG AAG ATA GGG TCG CTG TAG CGG CAC CTC ACC CTC TCG Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser>				
2170	2180	2190	2200	
AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC TTA CCC GTC GGC CTC TTG TTG ATG TTC TGG TGC GGA GGG CAC GAC CTG Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp>				
2210	2220	2230	2240	2250
TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAT AGC AAG CTC ACC GTG GAC AAG AGC AGG CTG CCG AGG AAG AAG GAG ATA TCG TTC GAG TGG CAC CTG TTC TCG Ser Asp Gly Ser Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser>				
2260	2270	2280	2290	2300
AGG TGG CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT TCC ACC GTC GTC CCC TTG CAG AAG AGT ACG AGG CAC TAC GTA CTC CGA Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala>				

Fig.31G.

2310	2320	2330	2340	2350
*	*	*	*	*
CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CCG GGT AAA	GAC GTG TTG GTG ATG TGC GTC TTC TCG GAG AGG GAC AGA GGC CCA TTT	Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys>		
TGA				
ACT				
***>				

Fig.32A.

10	20	30	40	
*	*	*	*	*
ATG GTG TGG CCG GCG CGG CTC TGC GGG CTG TGG GCG CTG CTG CTC TGC TAC CAC ACC GGC CGC GCC GAG ACG CCC GAC ACC CGC GAC GAC GAG ACG Met Val Trp Pro Ala Arg Leu Cys Gly Leu Trp Ala Leu Leu Leu Cys>				
50	60	70	80	90
*	*	*	*	*
GCC GGC GGC GGG GGC GGG GGC GCC GCG CCT ACG GAA ACT CAG CGG CCG CCG CCC CCG CCC CCG CGG CGC GGA TGC CTT TGA GTC Ala Gly Gly Gly Gly Gly Ala Ala Pro Thr Glu Thr Gln>				
100	110	120	130	140
*	*	*	*	*
CCA CCT GTG ACA AAT TTG AGT GTC TCT GTT GAA AAC CTC TGC ACA GTA GGT GGA CAC TGT TTA AAC TCA CAG AGA CAA CTT TTG GAG ACG TGT CAT Pro Pro Val Thr Asn Leu Ser Val Ser Val Glu Asn Leu Cys Thr Val>				
150	160	170	180	190
*	*	*	*	*
ATA TGG ACA TGG AAT CCA CCC GAG GGA GCC AGC TCA AAT TGT AGT CTA TAT ACC TGT ACC TTA GGT GGG CTC CCT CGG TCG AGT TTA ACA TCA GAT Ile Trp Thr Trp Asn Pro Pro Glu Gly Ala Ser Ser Asn Cys Ser Leu>				
200	210	220	230	240
*	*	*	*	*
TGG TAT TTT AGT CAT TTT GGC GAC AAA CAA GAT AAG AAA ATA GCT CCG ACC ATA AAA TCA GTA AAA CCG CTG TTT GTT CTA TTC TTT TAT CGA GGC Trp Tyr Phe Ser His Phe Gly Asp Lys Gln Asp Lys Lys Ile Ala Pro>				
250	260	270	280	
*	*	*	*	*
GAA ACT CGT CGT TCA ATA GAA GTA CCC CTG AAT GAG AGG ATT TGT CTG CTT TGA GCA GCA AGT TAT CTT CAT GCG GAC TTA CTC TCC TAA ACA GAC Glu Thr Arg Arg Ser Ile Glu Val Pro Leu Asn Glu Arg Ile Cys Leu>				
290	300	310	320	330
*	*	*	*	*
CAA GTG GGG TCC CAG TGT AGC ACC AAT GAG AGT GAG AAG CCT AGC ATT GTT CAC CCC AGG GTC ACA TCG TGG TTA CTC TCA CTC TTC GGA TCG TAA Gln Val Gly Ser Gln Cys Ser Thr Asn Glu Ser Glu Lys Pro Ser Ile>				
340	350	360	370	380
*	*	*	*	*
TTG GTT GAA AAA TGC ATC TCA CCC CCA GAA GGT GAT CCT GAG TCT GCT AAC CAA CTT TTT ACG TAG AGT GGG GGT CTT CCA CTA GGA CTC AGA CGA Leu Val Glu Lys Cys Ile Ser Pro Pro Glu Gly Asp Pro Glu Ser Ala>				

Fig.32B.

390 400 410 420 430
 * * * * *
 GTG ACT GAG CTT CAA TGC ATT TGG CAC AAC CTG AGC TAC ATG AAG TGT
 CAC TGA CTC GAA GTT ACG TAA ACC GTG TTG GAC TCG ATG TAC TTC ACA
 Val Thr Glu Leu Gln Cys Ile Trp His Asn Leu Ser Tyr Met Lys Cys>

 440 450 460 470 480
 * * * * *
 TCT TGG CTC CCT GGA AGG AAT ACC AGT CCC GAC ACT AAC TAT ACT CTC
 AGA ACC GAG GGA CCT TCC TTA TGG TCA GGG CTG TGA TTG ATA TGA GAG
 Ser Trp Leu Pro Gly Arg Asn Thr Ser Pro Asp Thr Asn Tyr Thr Leu>

 490 500 510 520
 * * * *
 TAC TAT TGG CAC AGA AGC CTG GAA AAA ATT CAT CAA TGT GAA AAC ATC
 ATG ATA ACC GTG TCT TCG GAC CTT TAA GTA GTT ACA CTT TTG TAG
 Tyr Tyr Trp His Arg Ser Leu Glu Lys Ile His Gln Cys Glu Asn Ile>

 530 540 550 560 570
 * * * * *
 TTT AGA GAA GGC CAA TAC TTT GGT TGT TCC TTT GAT CTG ACC AAA GTG
 AAA TCT CTT CCG GTT ATG AAA CCA ACA AGG AAA CTA GAC TGG TTT CAC
 Phe Arg Glu Gly Gln Tyr Phe Gly Cys Ser Phe Asp Leu Thr Lys Val>

 580 590 600 610 620
 * * * * *
 AAG GAT TCC AGT TTT GAA CAA CAC AGT GTC CAA ATA ATG GTC AAG GAT
 TTC CTA AGG TCA AAA CTT GTT GTG TCA CAG GTT TAT TAC CAG TTC CTA
 Lys Asp Ser Ser Phe Glu Gln His Ser Val Gln Ile Met Val Lys Asp>

 630 640 650 660 670
 * * * * *
 AAT GCA GGA AAA ATT AAA CCA TCC TTC AAT ATA GTG CCT TTA ACT TCC
 TTA CGT CCT TTT TAA TTT GGT AGG AAG TTA TAT CAC GGA AAT TGA AGG
 Asn Ala Gly Lys Ile Lys Pro Ser Phe Asn Ile Val Pro Leu Thr Ser>

 680 690 700 710 720
 * * * * *
 CGT GTG AAA CCT GAT CCT CCA CAT ATT AAA AAC CTC TCC TTC CAC AAT
 GCA CAC TTT GGA CTA GGA GGT GTA TAA TTT TTG GAG AGG AAG GTG TTA
 Arg Val Lys Pro Asp Pro His Ile Lys Asn Leu Ser Phe His Asn>

 730 740 750 760
 * * * * *
 GAT GAC CTA TAT GTG CAA TGG GAG AAT CCA CAG AAT TTT ATT AGC AGA
 CTA CTG GAT ATA CAC GTT ACC CTC TTA GGT GTC TTA AAA TAA TCG TCT
 Asp Asp Leu Tyr Val Gln Trp Glu Asn Pro Gln Asn Phe Ile Ser Arg>

Fig.32C.

770 780 790 800 810
 * * * * *
 TGC CTA TTT TAT GAA GTA GAA GTC AAT AAC AGC CAA ACT GAG ACA CAT
 ACG GAT AAA ATA CTT CAT CTT CAG TTA TTG TCG GTT TGA CTC TGT GTA
 Cys Leu Phe Tyr Glu Val Glu Val Asn Asn Ser Gln Thr Glu Thr His>

 820 830 840 850 860
 * * * * *
 AAT GTT TTC TAC GTC CAA GAG GCT AAA TGT GAG AAT CCA GAA TTT GAG
 TTA CAA AAG ATG CAG GTT CTC CGA TTT ACA CTC TTA GGT CTT AAA CTC
 Asn Val Phe Tyr Val Gln Glu Ala Lys Cys Glu Asn Pro Glu Phe Glu>

 870 880 890 900 910
 * * * * *
 AGA AAT GTG GAG AAT ACA TCT TGT TTC ATG GTC CCT GGT GTT CTT CCT
 TCT TTA CAC CTC TTA TGT AGA ACA AAG TAC CAG GGA CCA CAA GAA GGA
 Arg Asn Val Glu Asn Thr Ser Cys Phe Met Val Pro Gly Val Leu Pro>

 920 930 940 950 960
 * * * * *
 GAT ACT TTG AAC ACA GTC AGA ATA AGA GTC AAA ACA AAT AAG TTA TGC
 CTA TGA AAC TTG TGT CAG TCT TAT TCT CAG TTT TGT TTA TTC AAT ACG
 Asp Thr Leu Asn Thr Val Arg Ile Arg Val Lys Thr Asn Lys Leu Cys>

 970 980 990 1000
 * * * * *
 TAT GAG GAT GAC AAA CTC TGG AGT AAT TGG AGC CAA GAA ATG AGT ATA
 ATA CTC CTA CTG TTT GAG ACC TCA TTA ACC TCG GTT CTT TAC TCA TAT
 Tyr Glu Asp Asp Lys Leu Trp Ser Asn Trp Ser Gln Glu Met Ser Ile>

 1010 1020 1030 1040 1050
 * * * * *
 GGT AAG AAG CGC AAT TCC ACA GGC GCG CCT AGT GGT GGA GGT GGC CGG
 CCA TTC TTC GCG TTA AGG TGT CCG CGC GGA TCA CCA CCT CCA CCG GCC
 Gly Lys Lys Arg Asn Ser Thr Gly Ala Pro Ser Gly Gly Gly Arg>

 1060 1070 1080 1090 1100
 * * * * *
 CCC GCA AGC TCT GGG AAC ATG AAG GTC TTG CAG GAG CCC ACC TGC GTC
 GGG CGT TCG AGA CCC TTG TAC TTC CAG AAC GTC CTC GGG TGG ACG CAG
 Pro Ala Ser Ser Gly Asn Met Lys Val Leu Gln Glu Pro Thr Cys Val>

 1110 1120 1130 1140 1150
 * * * * *
 TCC GAC TAC ATG AGC ATC TCT ACT TGC GAG TGG AAG ATG AAT GGT CCC
 AGG CTG ATG TAC TCG TAG AGA TGA ACC CTC ACC TTC TAC TTA CCA GGG
 Ser Asp Tyr Met Ser Ile Ser Thr Cys Glu Trp Lys Met Asn Gly Pro>

Fig.32D.

1160 1170 1180 1190 1200
 * * * * *
 ACC AAT TGC AGC ACC GAG CTC CGC CTG TTG TAC CAG CTG GTT TTT CTG
 TGG TTA ACG TCG TGG CTC GAG GCG GAC AAC ATG GTC GAC CAA AAA GAC
 Thr Asn Cys Ser Thr Glu Leu Arg Leu Leu Tyr Gln Leu Val Phe Leu>

 1210 1220 1230 1240
 * * * * *
 CTC TCC GAA GCC CAC ACG TGT ATC CCT GAG AAC AAC GGA GGC GCG GGG
 GAG AGG CTT CGG GTG TGC ACA TAG GGA CTC TTG CCT CCG CGC CCC
 Leu Ser Glu Ala His Thr Cys Ile Pro Glu Asn Asn Gly Gly Ala Gly>

 1250 1260 1270 1280 1290
 * * * * *
 TGC GTG TGC CAC CTG CTC ATG GAT GAC GTG GTC AGT GCG GAT AAC TAT
 ACG CAC ACG GTG GAC GAG TAC CTA CTG CAC CAG TCA CGC CTA TTG ATA
 Cys Val Cys His Leu Leu Met Asp Asp Val Val Ser Ala Asp Asn Tyr>

 1300 1310 1320 1330 1340
 * * * * *
 ACA CTG GAC CTG TGG GCT GGG CAG CAG CTG CTG TGG AAG GGC TCC TTC
 TGT GAC CTG GAC ACC CGA CCC GTC GTC GAC GAC ACC TTC CCG AGG AAG
 Thr Leu Asp Leu Trp Ala Gly Gln Gln Leu Leu Trp Lys Gly Ser Phe>

 1350 1360 1370 1380 1390
 * * * * *
 AAG CCC AGC GAG CAT GTG AAA CCC AGG GCC CCA GGA AAC CTG ACA GTT
 TTC GGG TCG CTC GTA CAC TTT GGG TCC CGG GGT CCT TTG GAC TGT CAA
 Lys Pro Ser Glu His Val Lys Pro Arg Ala Pro Gly Asn Leu Thr Val>

 1400 1410 1420 1430 1440
 * * * * *
 CAC ACC AAT GTC TCC GAC ACT CTG CTG CTG ACC TGG AGC AAC CCG TAT
 GTG TGG TTA CAG AGG CTG TGA GAC GAC TGG ACC TCG TTG GGC ATA
 His Thr Asn Val Ser Asp Thr Leu Leu Thr Trp Ser Asn Pro Tyr>

 1450 1460 1470 1480
 * * * * *
 CCC CCT GAC AAT TAC CTG TAT AAT CAT CTC ACC TAT GCA GTC AAC ATT
 GGG GGA CTG TTA ATG GAC ATA TTA GTA GAG TGG ATA CGT CAG TTG TAA
 Pro Pro Asp Asn Tyr Leu Tyr Asn His Leu Thr Tyr Ala Val Asn Ile>

 1490 1500 1510 1520 1530
 * * * * *
 TGG AGT GAA AAC GAC CCG GCA GAT TTC AGA ATC TAT AAC GTG ACC TAC
 ACC TCA CTT TTG CTG GGC CGT CTA AAG TCT TAG ATA TTG CAC TGG ATG
 Trp Ser Glu Asn Asp Pro Ala Asp Phe Arg Ile Tyr Asn Val Thr Tyr>

Fig.32E.

1540	1550	1560	1570	1580
*	*	*	*	*
CTA GAA CCC TCC CTC CGC ATC GCA GCC AGC ACC CTG AAG TCT GGG ATT				
GAT CTT GGG AGG GAG GCG TAG CGT CGG TCG TGG GAC TTC AGA CCC TAA				
Leu Glu Pro Ser Leu Arg Ile Ala Ala Ser Thr Leu Lys Ser Gly Ile>				
1590	1600	1610	1620	1630
*	*	*	*	*
TCC TAC AGG GCA CGG GTG AGG GCC TGG GCT CAG TGC TAT AAC ACC ACC				
AGG ATG TCC CGT GCC CAC TCC CGG ACC CGA GTC ACG ATA TTG TGG TGG				
Ser Tyr Arg Ala Arg Val Arg Ala Trp Ala Gln Cys Tyr Asn Thr Thr>				
1640	1650	1660	1670	1680
*	*	*	*	*
TGG AGT GAG TGG AGC CCC AGC ACC AAG TGG CAC AAC TCC TAC AGG GAG				
ACC TCA CTC ACC TCG GGG TCG TGG TTC ACC GTG TTG AGG ATG TCC CTC				
Trp Ser Glu Trp Ser Pro Ser Thr Lys Trp His Asn Ser Tyr Arg Glu>				
1690	1700	1710	1720	
*	*	*	*	
CCC TTC GAG CAG TCC GGA GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA				
GGG AAG CTC GTC AGG CCT CTG TTT TGA GTG TGT ACG GGT GGC ACG GGT				
Pro Phe Glu Gln Ser Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro>				
1730	1740	1750	1760	1770
*	*	*	*	*
GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC TTC CTC TTC CCC CCA AAA				
CGT GGA CTT GAG GAC CCC CCT GGC AGT CAG AAG GAG AAG GGG GGT TTT				
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys>				
1780	1790	1800	1810	1820
*	*	*	*	*
CCC AAG GAC ACC CTC ATG ATC TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACA TGC GTG				
GGG TTC CTG TGG GAG TAC TAG AGG GCC TGG GGA CTC CAG TGT ACG CAC				
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val>				
1830	1840	1850	1860	1870
*	*	*	*	*
GTG GTG GAC GTG AGC CAC GAA GAC CCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC				
CAC CAC CTG CAC TCG GTG CTT CTG GGA CTC CAG TTC AAG TTG ACC ATG				
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr>				
1880	1890	1900	1910	1920
*	*	*	*	*
G TG GAC GGC GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG				
CAC CTG CCG CAC CTC CAC GTA TTA CGG TTC TGT TTC GGC GGC CTC CTC				
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu>				

Fig.32F.

1930	1940	1950	1960	
* * * *				
CAG TAC AAC AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC GTC ATG TTG TCG TGC ATG GCA CAC CAG TCG CAG GAG TGG CAG GAC GTG Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His>				
1970	1980	1990	2000	
* * * *				
CAG GAC TGG CTG AAT GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GTC CTG ACC GAC TTA CCG TTC CTC ATG TTC ACG TTC CAG AGG TTG TTT Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys>				
2020	2030	2040	2050	2060
* * * *				
GCC CTC CCA GCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG CGG GAG GGT CGG GGG TAG CTC TTT TGG TAG AGG TTT CGG TTT CCC GTC Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln>				
2070	2080	2090	2100	2110
* * * *				
CCC CGA GAA CCA CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CCG GAG GAG ATG GGG GCT CTT GGT GTC CAC ATG TGG GAC GGG GGT AGG GCC CTC CTC TAC Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met>				
2120	2130	2140	2150	2160
* * * *				
ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAT CCC TGG TTC TTG GTC CAG TCG GAC TGG ACG GAC CAG TTT CCG AAG ATA GGG Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro>				
2170	2180	2190	2200	
* * * *				
AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC TCG CTG TAG CGG CAC CTC ACC CTC TCG TTA CCC GTC GGC CTC TTG TTG Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn>				
2210	2220	2230	2240	2250
* * * *				
TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC ATG TTC TGG TGC GGA GGG CAC GAC CTG AGG CTG CCG AGG AAG AAG GAG Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu>				
2260	2270	2280	2290	2300
* * * *				
TAT AGC AAG CTC ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG GGG AAC GTC ATA TCG TTC GAG TGG CAC CTG TTC TCG TCC ACC GTC GTC CCC TTG CAG Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val>				

Fig.32G.

2310 * * * * 2320 * * * * 2330 * * * * 2340 * * * * 2350 * * * *
 TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG
 AAG AGT ACG AGG CAC TAC GTA CTC CGA GAC GTG TTG GTG ATG TGC GTC
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln>

 2360 * * * * 2370 * * * * 2380 * * * *
 AAG AGC CTC TCC CTG TCT CCG GGT AAA TGA
 TTC TCG GAG AGG GAC AGA GGC CCA TTT ACT
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys . * * * *

Fig.33.

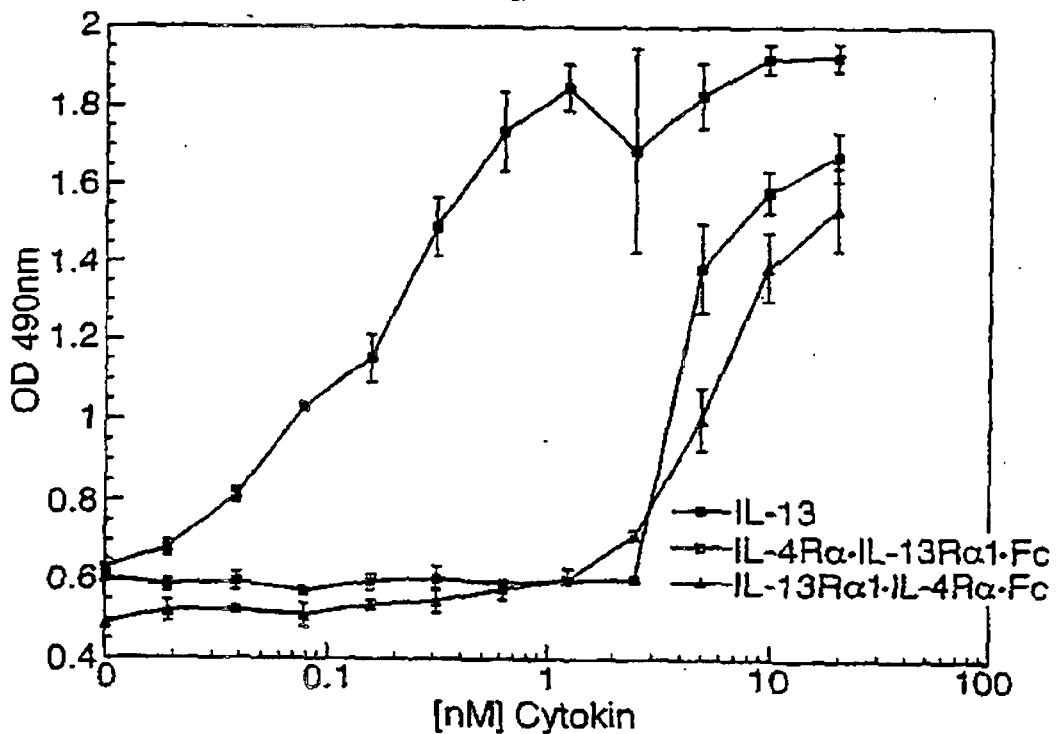


Fig.34

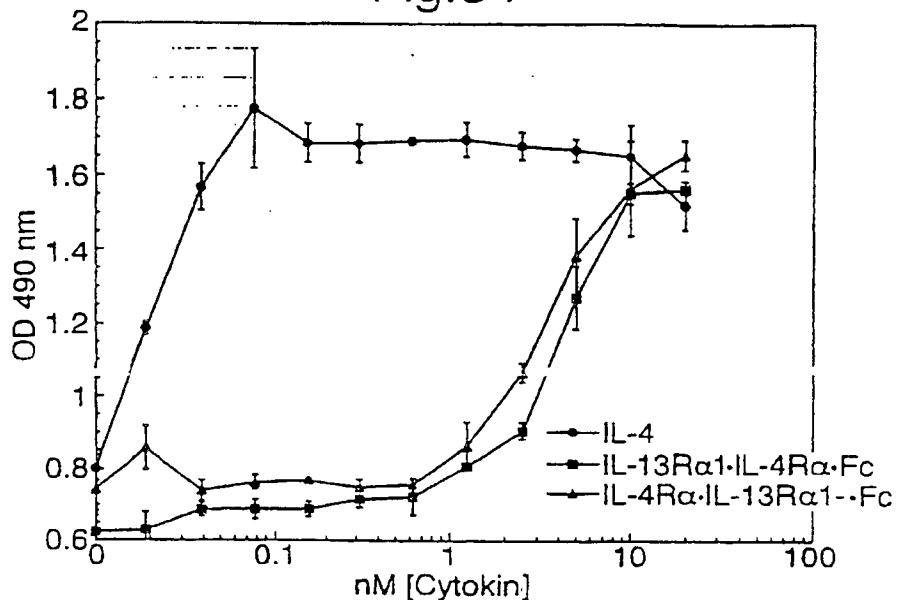


Fig.35

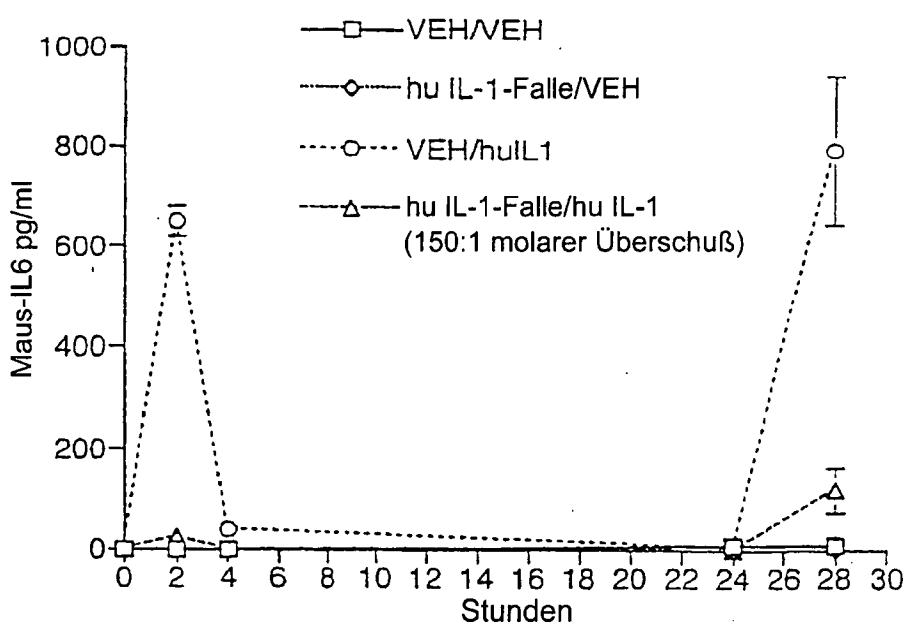


Fig.36A

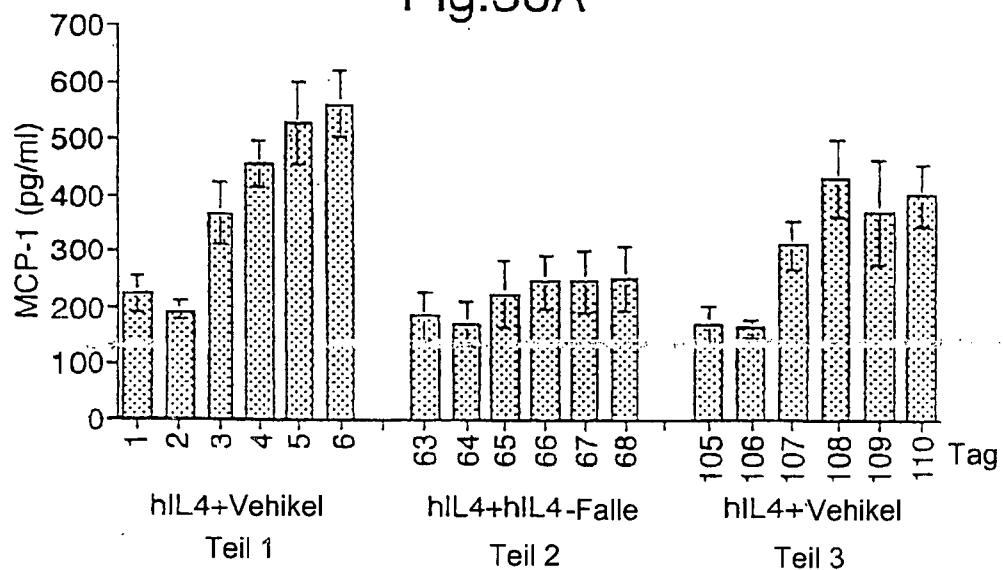


Fig.36B

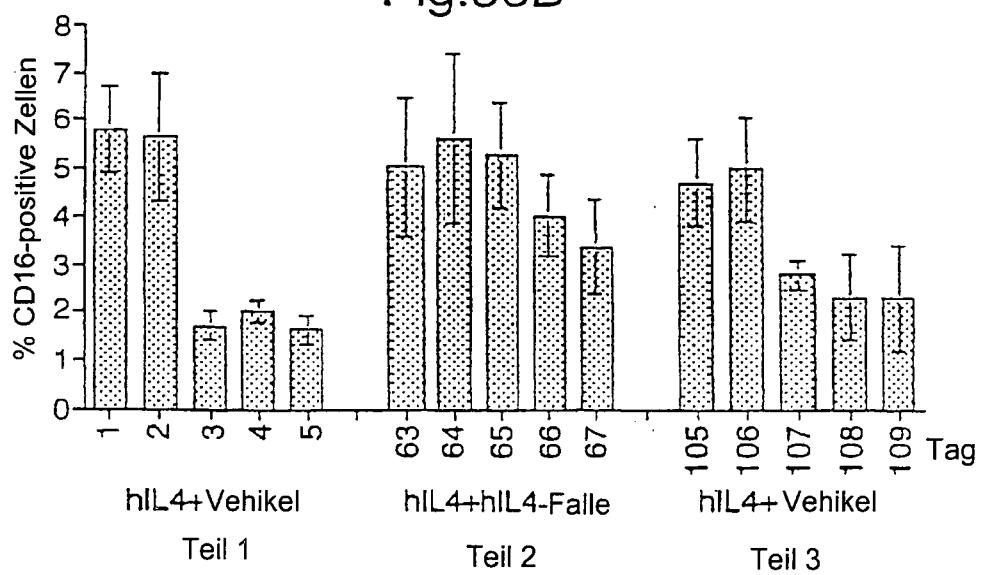


Fig.37

