



(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

(73) Patentinhaber:

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

(74) Vertreter:

**Rechts- und Patentanwälte Lorenz Seidler Gossel,
80538 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

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

(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 eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

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

Beschreibung

[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 variierender 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 LIFRβ 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 Spezifitätsbestimmende "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 LIFRβ auf antwortenden Zellen erfordern können, wohingegen CNTF CNTFRα erfordert [Stahl und Yancopoulos, Cell 74: 587–590 (1993)] und IL-6 IL-6Rα erfordert [Kishimoto et al., Science 258: 593–597 (1992)]. Sowohl CNTFRα (Davis et al., Science 259: 1736–1739 (1993)) als auch IL-6Rα [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 CNTFRα unter Bildung eines Komplexes, welcher dann an gp130 bindet, um ein Intermediat zu bilden (hierin bezeichnet als das αβ1-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-6R α 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 Rezeptorbasierenden 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 [Firmbach-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 offenbarten 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 Spezifitätsbestimmenden 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 Fusionspolypeptide 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 immunogelblottet. 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, iodiertem 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 IL6Rα-FC. Schlüssel: Die Aminosäuren 1 bis 358 sind aus humanem IL-6Rα (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-6Rα-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 Rα-Komponente unter Bildung eines obligatorischen Cytokin·Rα-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·Rα·β1-Komplexes (Kd beträgt etwa 10 pM). Im Falle von IL-6Rα 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-6Rα-Fc. Der gp130-Fc-IL-6Rα-Fc-Komplex (obere Tafel) ahmt nachgewiesenermaßen den Hochaffinitäts-Cytokin·Rα·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 un verfügbar 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-6Rα 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_H1-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 - κ . 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 - κ [(gp130-Cy1)₂·(IL-6R α - κ)₁], und des gp130-Cy1-Dimers, assoziiert mit zwei IL-6R α - κ [(gp130-Cy1)₂·(IL-6R α - κ)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 - κ) 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 Ligandenfallen 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_{H1}·IL-6R α - κ (G16K) nicht an Protein A bindet. (B) Anti-Kappa-Western-Blotting von Proteinen, präzipitiert mit Protein A-Sepharose aus Mischungen von GF6F \pm IL-6, G16K \pm IL-6 oder GF6F plus G16K \pm 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 \pm 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-2Ry-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-2Ry-IL4R α -Fc Δ C1 ist, bei welcher die IL-2Ry-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-Fallenkonstruktes wird dargestellt.

[0050] [Fig. 32A–Fig. 32G](#): Die Nukleotid- und codierte Aminosäuresequenz des IL-13R α 1.IL-4R α .Fc-Einzelketten-Fallenkonstruktes 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 huIL-1. BALB/c-Mäuse erhielten eine subkutane Injektion von huIL-1 (0,3 μ g/kg) zur Zeit 0. Vierundzwanzig Stunden vor der huIL-1-Injektion wurden die Tiere vorbehandelt mit entweder Vehikel oder einem 150-fachen molaren Überschuss von huIL-1-Falle. Zwei Stunden vor der Tötung (26 Stunden) wurden die Mäuse erneut mit einer zweiten Injektion von huIL-1 (0,3 μ g/kg, s.c.) herausgefordert. Blutproben wurden an verschiedenen Zeitpunkten gesammelt, und Seren wurden hinsichtlich IL-1-Spiegeln geassayt (ausgedrückt als Mittelwert \pm 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 μ g/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 \pm 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 μ g/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 \pm 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 μ l/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 \pm 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-Fälle 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 Kompo-</u> <u>nente</u>	<u>signaltransduzierende Komponente</u>
Interleukin-1 (IL-1)	Typ I IL-1R (Ref. 8) Typ II IL-1R (Ref. 8) IL-1RI (Ref. 11) IL-1RII (Ref. 11)	IL-1R AcP (Refs. 8, 11)
Interleukin-2 (IL-2)	α -Untereinheit (Ref. 2) α -Kette (Ref. 3) IL-2R α (Ref. 1)	β -Kette (Ref. 3) β -Untereinheit (Ref. 2) γ -Kette (Ref. 3) IL-2R β (Refs. 1, 10) IL-2R γ (Refs. 1, 10)
Interleukin-3 (IL-3)	IL-3R α (Ref. 1) α -Untereinheit (Ref. 2) α -Rezeptorkomponente (Ref. 5)	β_c (Ref. 1) β -Untereinheit (Ref. 2) 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) α -Untereinheit (Ref. 2) α -Rezeptorkomponente (Ref. 5)	β_c (Ref. 1) β -Untereinheit (Ref. 2) β -Kette (Ref. 3) β -Rezeptorkomponente (Ref. 5)

TABELLE 1 (Fortsetzung)

<u>Cytokin</u>	<u>Spezifität-bestimmende Komponente</u>	<u>signaltransduzierende Komponente</u>
Granulocyten-	α -Rezeptorkomponente (Ref. 5)	β -Rezeptorkomponente (Ref. 5)
Makrophagen-	α -Untereinheit (Ref. 2)	β -Untereinheit (Ref. 2)
Kolonie-	GMR α (Refs. 1, 2)	β -Kette (Ref. 3)
stimulierender Fak-		β_c (Ref. 1)
tor (GM-SCF)		GMR β (Refs. 1, 2)
Leukämie-inhibito-	LIFBP (Ref. 1)	gp130 (Refs. 1, 3)
rischer Faktor (LIF)	α -Rezeptorkomponente (Ref. 5)	β -Rezeptorkomponente (Ref. 5)
Interleukin-11 (IL-11)	α -Kette (Ref. 4)	gp130 (Ref. 4)
	NR1 (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)	AF-1 (Ref. 7)
	IFN- γ R1 (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-2Rgamma, 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 Nukleinsäuremolekülen 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 Nukleinsäuremoleküle 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 Säugerzelle, 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 -Spezifitätsbestimmungs-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 signaltransduzierenden 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); Narazaki 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 -Spezifitätskomponente 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 Expressionssystem. 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 Einschlusskörper 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 sR α : 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 sR α : β 1-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, Immunopräzipitation oder Aktivitätsdepletion/Blockierung in Bioassays getagget werden.

[0083] In einer anderen Ausführungsform, wie nachstehend beschrieben in Beispiel 3, wird das sR α : β 1-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. getagget 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 sR α : β 1-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. sIL6R α /Schleife/sgp130 oder sgp130/Schleife/sIL-6R α), 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 sR α : 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-6R α 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 Molekül 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 Molekül ergeben, welches an IL-6R α 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 Molekül ergeben (CNTF β 2 $^-$), welches CNTFR α 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 bindet, 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, potenzielle 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 sR α : β 1-Rezeptor-Heterodimere, welche oben beschrieben sind, unter Verwendung von Epitop-getaggten [Davis et al., Science 253: 59–63 (1991)] sR α : 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 sR α : β 1-Dimers sCNTFR α : β 1 binden. Für IL-6 wäre das sR α : β 1-Reagenz IL-6R α : 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 sR α : 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 jedweden 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 Phosphorylierungsmuster, 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 [Firmbach-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 LIFR β 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 Ovariectomie verschlimmert werden kann, scheint IL-6 ein kritischer Mediator der Osteoklastengengese 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 sterilem 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-6R α 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 serumfreien 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-6R α , gp130 und CNTFR α , aber nicht LIFR β exprimiert. Wie man vorhersagen würde, antworten diese Zellen auf IL-6, aber nicht auf CNTF (Fig. 2), weil LIFR β 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-6R α (sIL-6R α) 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-6R α bestehen bleibt, wird sie eliminiert, wenn die CNTF-Konzentration vierfach auf 8 nM erhöht wird. Somit ist, in IL-6-responsiven Zellen, welche CNTFR α aber kein LIFR β enthalten, CNTF ein ziemlich wirksamer Antagonist der IL-6-Wirkung.

BEISPIEL 2. BINDUNG VON CNTF AN DEN CNTFR α : 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 phosphatgepufferter 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 CNTFR α : β 1 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 K_d 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 sR α : 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 IL6R α -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 Zelllysis erfahren wurde. Die Zellsuspension wurde aseptisch in sterile Zentrifugenflaschen aliquotiert, 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 Niedrigschwer-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, IL6R α -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 IL6R α -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 gestiegen, 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 Bioreaktor-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-getaggtten 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 Sulfhydrylgruppe 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-Elektrophorese 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-Vereinigungsfractionen 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 IL6R α -Fc-Homodimer keine C-terminalen Histidinreste aufweist, besitzt es in klarer Weise die niedrigste Affinität. Das IL6R α -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-getaggtten Proteine zu der Metallaffinitätssäule gibt. Eine selektive Elution der drei Proteine mit steigenden Mengen von Imidazol im Elutionspuffer eluiert daher die Proteine in der folgenden Reihenfolge:

1. IL6R α -Fc-Homodimer
2. IL6R α -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 IL6R α -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 Bindungsereignissen ([Fig. 6](#)). Das Cytokin bindet anfänglich an seinen zugehörigen α mit geringer Affinität ($K_d = 3$ bis 10 nM); dies ist ein erforderlicher Schritt – Zellen, welche den zugehörigen α nicht exprimieren, antworten nicht auf das zugehörige Cytokin. Der Cytokin- α -Komplex assoziiert mit der ersten signaltransduzierenden Komponente, gp130, unter Bildung eines Hochaffinitätskomplexes (K_d in der Größenordnung von 10 pM für den Komplex CNTF-CNTF α -gp130). Dieser Komplex transduziert kein Signal, da es die Dimerisierung der signaltransduzierenden Komponenten ist, welche eine Signalisierung 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 heterotrimer Cytokin- α -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 Falle 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 α -Komponente, verknüpft an die extrazelluläre Domäne von gp130. Diese Moleküle ahmen gezeigtermaßen den Hochaffinitätskomplex Cytokin- α -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-6 α bzw. CNTF α , gepaart. Um den α mit der extrazellulären Domäne von gp130 zu verknüpfen, wurden die löslichen α -Komponenten und gp130 an den Fc-Bereich von humanem IgG1 fusioniert, um α -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 α -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 α).

[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-6 α), der konstanten Region der Schwereketten (C γ) von humanem IgG1 (C γ 1) (Lewis et al., *Journal of Immunology* 151: 2829–2838 (1993)) oder IgG4 (C γ 4) 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 C γ -Domäne, mit κ - oder λ -Leichtketten zu heterodimerisieren. Die Heterodimerisierung von C γ mit der leichten Kette findet zwischen der CH1-Domäne von C γ und der konstanten Region der leichten Kette (C κ) 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 C γ mit C κ 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-6 α 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 Vollängen-C γ -Region, sehr ähnlich wie Antikörper, Homodimere der C γ -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-6R α -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 C γ , welche lediglich aus der C γ 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-Affinierungszellen, 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 Wachstumsinhibitionsassays (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, IFN γ , TGF β 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-C γ 1 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 C γ 1 und ein Terminationscodon umfassen ([Fig. 9](#)).
- (ii) gp130-J-C γ 1 wurde in der gleichen Weise wie gp130-C γ 1 erzeugt, außer, dass ein J-Peptid (Aminosäuresequenz: GQGTLVTSS) zwischen der Ser-Gly-Brücke und der Sequenz von C γ 1 eingefügt wurde (siehe [Fig. 9](#)).
- (iii) gp130 Δ 3fibro-C γ 1 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-C γ 1.
- (iv) gp130-J-C γ 1 wurde auf eine identische Weise zu derjenigen erzeugt, die für gp130-C γ 1 beschrieben wurde, mit der Ausnahme, dass anstelle der C γ 1-Region nur der C γ 1-Teil von C γ 1 verwendet worden ist ([Fig. 11](#)). Die C-terminale Domäne dieses Konstrukts schließt den Teil des Gelenks ein, welcher den Cysteinsteinrest 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 C γ 1-Homodimerisierung beteiligt sind, ist zusammen mit den C γ 2- und C γ 3-Domänen deletiert worden.
- (v) gp130-C γ 4 wurde auf eine identische Weise zu derjenigen erzeugt, welche für gp130-C γ 1 beschrieben wurde, außer, dass C γ 4 anstelle von C γ 1 verwendet wurde ([Fig. 12](#)). Darüber hinaus wurde eine RsrII-DNA-Restriktionsstelle an der Gelenkregion der C γ 4-Domäne technisch erzeugt durch Einführung von zwei stillen Basenmutationen. Die RsrII-Stelle gestattet andere erwünschte gentechnische Manipulationen, wie die Konstruktion des C γ 1-Äquivalents von gp130-C γ 4.
- (vi) gp130- κ wurde in einer identischen Weise zu derjenigen erzeugt, welche für gp130-C γ 1 beschrieben wurde, außer, dass die konstante Region der κ -Leichtkette von humanem Ig anstelle von C γ 1 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-C γ 1, außer, dass die konstante Region der λ -Leichtkette (Cheung et al., Journal of Virology 66: 6714–6720 (1992)) von humanem Ig anstelle von C γ 1 verwendet wurde ([Fig. 14](#)).

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

- (i) IL6R α -C γ 1 wurde technisch erzeugt durch rastergerechtes Fusionieren der Aminosäuren 1 bis 358 von

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

(ii) IL-6R α - κ wurde erzeugt, wie beschrieben für IL6R α -Cy1, außer, dass die κ -Domäne ([Fig. 13](#)), welche für gp130- κ verwendet wurde, anstelle von Cy1 verwendet wurde.

(iii) IL6R α -j- κ wurde erzeugt, wie beschrieben für IL6R α - 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, IL6R α 313-Cy1, IL6R α 313- κ und IL6R α 313-j- κ wurden technisch erzeugt durch Verwendung einer trunkeierten Form von IL-6R α , bestehend aus den Aminosäuren 1 bis 313 ([Fig. 16](#)). Jedes dieser Konstrukte wurde hergestellt durch rastergerechtes Fusionieren von IL6R α 313 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-6R α herzustellen, wurden gp130-Ig-Chimärenproteine mit geeigneten IL-6R α -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-6R α - κ wurde in COS-Zellen durch Co-Transfizieren zweier verschiedener Vektoren, welche gp130-Cy1 bzw. IL-6R α - 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-6R α - 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-6R α - 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-IL6 aus der Ligandenfalle sehr langsam – nach drei Tagen waren ungefähr 75 % der anfänglichen Zählseinheiten noch an die Ligandenfalle gebunden. Im Gegensatz dazu blieben weniger als 5 % der Zählseinheiten 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-6R α -Fc mit gp130-C $_{H1}$ ·IL-6R α - κ wurde bestimmt durch Testen, ob gp130-C $_{H1}$ ·IL-6R α - κ , welches von sich selbst aus Protein A nicht bindet, durch Protein A-Sepharose in Gegenwart von gp130-Fc·IL-6R α -Fc in einer IL-6-abhängigen Weise präzipitiert werden konnte ([Fig. 9](#)). Die Präzipitation von gp130-C $_{H1}$ ·IL-6R α - κ durch Protein A-Sepharose wurde durch Western-Blot mit einem Anti-Kappa-spezifischen HRP-Konjugat bestimmt, welches gp130-Fc·IL-6R α -Fc nicht detektiert. gp130-C $_{H1}$ ·IL-6R α - 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 - κ 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 - κ 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 molaren 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 IL6R α -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 IL2R γ -Komponente, die Nukleotide 763–771 codieren eine Linkerregion, die Nukleotide 772–1395 codieren die IL4R α -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 IL2R γ -Komponente, die Nukleotide 763–1386 codieren die IL4R α -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 μ l konzentriertes HCl vereinigt. Es wird mit einer 0,45 μ m-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), Hämacytometer, Zentrifuge, ELISA-Platten-Lesegerät, Mehrkanal-Pipette für Volumen von 15, 25, 50 und 100 μ l, sterile Reagenz-Reservoirs, sterile Pipettenspitzen, Handschuhe.

Assay-Protokoll

A. Herstellung von Assay-Platten

1. Vorbereiten von sterilen 96-Vertiefungs-Gewebekulturplatten, um 50 μ l 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 μ l jeder Verdünnung zu einer Reihe quer über die Platte (d. h. Reihe A erhält die höchste Konzentration, Reihe G erhielt die niedrigste Konzentration). Zugeben von 25 μ l 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 μ l 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-2R γ -scb-IL4R α -Fc Δ C1 ist, als ein IL-4-Antagonist um mehrere Größenordnungen besser ist als IL4R α Fc Δ C1 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-2R γ -IL4R α -Fc Δ C1 ist, bei dem die IL-2R γ -Komponente mit der IL-4R α -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), Hämacytometer, 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 erhielt die niedrigste Konzentration). Zugeben von 25 µl Wachstumsmedium 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 8×10^5 /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. 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-4Rα.IL-13Rα1.Fc, zu erzeugen, wurden die extrazelluläre Domäne von humanem IL-4Rα (entsprechend den Nukleotiden #1-693 von [Fig. 31A–Fig. 31G](#)) und die extrazelluläre Domäne von humanem IL-13Rα1 (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-4Rα, IL-13Rα1 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-4Rα und dem IL-13Rα1 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-13Rα1 und dem Fc-Teil konstruiert. Alle Sequenzen wurden hinsichtlich der Sequenz mittels Standardtechniken bestätigt. Die IL-4Rα.IL-13Rα1.Fc 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-13R α 1.IL-4R α .Fc, zu erzeugen, wurden die extrazelluläre Domäne von IL-13R α 1 (entsprechend den Nukleotiden #1-1029 von [Fig. 32A–Fig. 32G](#)) und der humane IL-4R α (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-13R α 1, IL-4R α 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 GlyAlaProSerGlyGlyGlyGlyArgPro (entsprechend Nukleotid #1030-1059 von [Fig. 32A–Fig. 32G](#)) im Raster zwischen dem IL-13R α 1 und dem IL-4R α 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-4R α und dem Fc-Teil konstruiert. Alle Sequenzen wurden hinsichtlich der Sequenz unter Anwendung von Standardtechniken überprüft. Die codierende Sequenz von IL-13R α 1.IL-4R α .Fc wurde dann in den Expressionsvektor pCDNA3.1 (Stratagene) unter Anwendung von Molekularbiologie-Standardtechniken subkloniert.

BEISPIEL 10: EXPRESSION VON IL-4R α .IL-13R α 1.Fc UND IL-13R α 1.IL-4R α .Fc

[0134] In großem Maßstab (1 Liter) angesetzte Kulturen von dem pCAE801 (dem DNA-Vektorkonstrukt, welches IL-4R α .IL-13R α 1.Fc codiert) und pCAE802 (dem DNA-Plasmidkonstrukt, welches IL-13R α 1.IL-4R α .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 μ g 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 Zugabe 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 pelletieren. Der Überstand wurde in sterile 1-Liter-Flaschen dekantiert, und exprimiertes Protein wurde gereinigt, wie nachstehend beschrieben.

BEISPIEL 11: REINIGUNG VON IL-4R α .IL-13R α 1.Fc UND IL-13R α 1.IL-4R α .Fc-PROTEIN AUS KULTURMEDIEN

1. Reinigung von IL-4R α .IL-13R α 1.Fc.

[0137] Humanes IL-4R α .IL-13R α 1.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 μ m 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-4R α .IL-13R α 1.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-4R α .IL-13R α 1.Fc wurde ferner durch Größenausschluss-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. Proteinfractionen 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-4R α .IL-13R α 1.Fc wurde analysiert durch nicht-reduzierte bzw. nichtreduzierende und reduzierte SDS-PAGE (4–12 % Bis-Tris), analytische Größenausschluss-Chromatographie (Tosohaas TSKG4000SWXL), N-terminale Sequenzierung und Immunoblotting mit Ziege-Anti-hlgG-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-13R α 1.IL-4R α .Fc

[0138] Humanes IL-13R α 1.IL-4R α .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-hlgG (γ -Ketten-spezifisch; Sigma 1–3382)- und Ziege-AntihlgG(Fc-spezifisch)-FITC-Konjugat (Sigma F9512)-Einfang- bzw. Reporter-Antikörpern bestimmt. Die Ausbeute belief sich auf 8,8 mg pro Liter konditioniertem Medium. CompleteTM-Proteaseinhibitor-Tabletten (Roche Diagnostics Corp.) wurden in dem Medium gelöst (1 Tablette/Liter). Die konditionierten Medien wurden steriltfiltriert (0,22 μ m Porengröße) vor dem 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-13R α 1.IL-4R α .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-13R α 1.IL-4R α .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. Proteinfractionen 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-13R α 1.IL-4R α .Fc wurde analysiert durch nicht-reduzierte und reduzierte SDS-PAGE (4–12 % Bis-Tris), analytische Größenausschluss-Chromatographie (Tosohaas TSKG4000SWXL), N-terminale Sequenzierung und Immunoblotting mit Ziege-Anti-hlgG-HRP-Konjugat (Promega W403B) und auch monoklonalem Maus-Anti-hIL-4R α (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-4R α .IL-13R α .Fc UND IL-13R α 1.IL-4R α .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-4R α .IL-13R α 1.Fc- und IL-13R α 1.IL-4R α .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 Assaymedium 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-4R α .IL-13R α 1.Fc- und IL-13R α 1.IL-4R α .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-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 ([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 halbmaximalem 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 μ g/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 Lymphocyten 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-INDUZIERTER 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 μ l/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 beidseitig 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 Spezifitätsbestimmenden 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 Immunglobulin abgeleitete Domäne ist.
7. Isoliertes Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 6, wobei die vom Immunglobulin 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, welche 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 ein 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

Fig.1

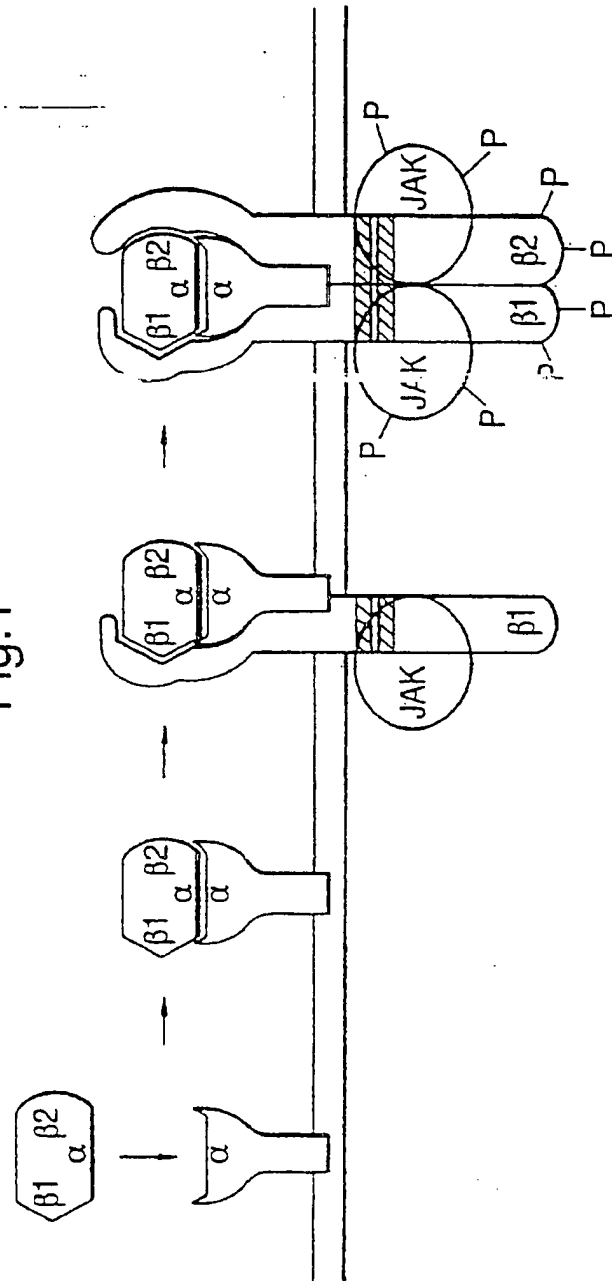


Fig.2

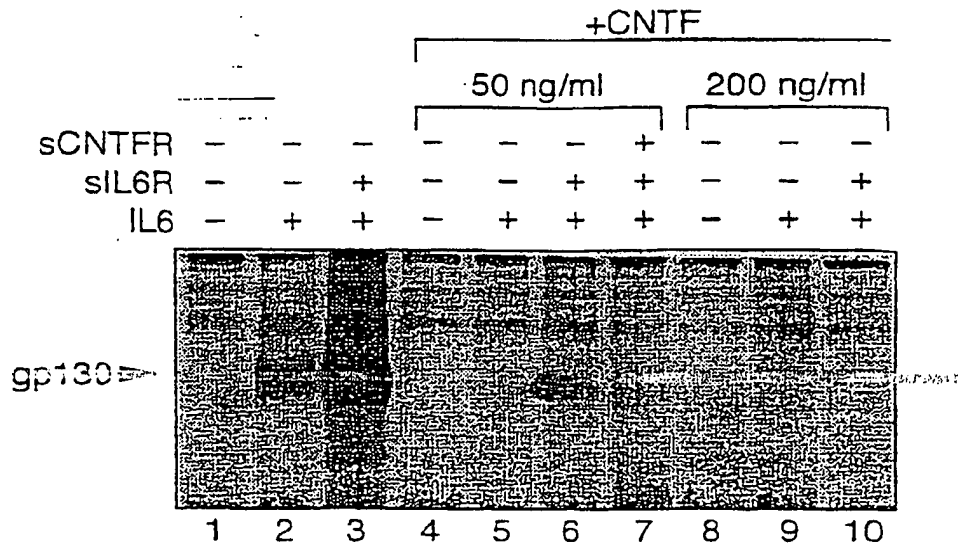


Fig.3

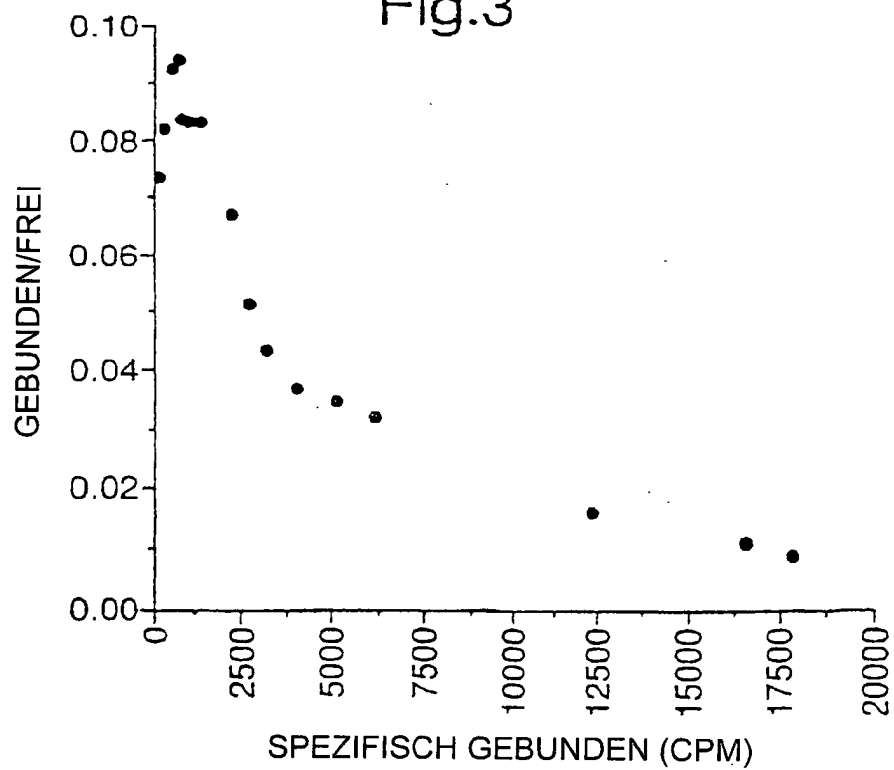


Fig.4

Aminosäuresequenz von humanem gp130-Fc-His6

Sequenzbereich: 1 bis 861

10 *	20 *	30 *	40 *	50 *	60 *
MVTLQTWVQALFIFLT	TES	TGELLDP	CGYISP	ESPVVOL	HSNFTAVCVLKEKCM
70 *	80 *	90 *	100 *	110 *	120 *
NANYIVWKT	NHFTIPKEQYT	IINRTASSVTFTD	IASLNIQ	LTCNILTFGQLEQN	VYGITI
130 *	140 *	150 *	160 *	170 *	180 *
ISGLPPEKPKNL	SCIVNEGK	KMRCEWDG	GRETHLETNFTL	KSEWATHKFADCK	AKRDTPT
190 *	200 *	210 *	220 *	230 *	240 *
SCTVDYSTVYFV	NIEVWVEA	ENALGKVTSDH	INFDPVYKV	KPNPPHNLSVIN	SEELSSIL
250 *	260 *	270 *	280 *	290 *	300 *
KLTWTNPSIKSV	IILKYNIQ	YRTKDASTWSQ	IPPEDTAST	RSSFTVQDLKPF	TEYVFRIR
310 *	320 *	330 *	340 *	350 *	360 *
CMKEDGKGYWSD	WSEEASGI	TYEDRPSKAPS	FWYKIDPSH	TQGYRTVQLVW	KTLPPFEAN
370 *	380 *	390 *	400 *	410 *	420 *
GKILDYEVTLTR	WKSHLQNY	TVNATKLTVN	LTNDRYLATL	TVRNLVGKS	DAAVLTIPACD
430 *	440 *	450 *	460 *	470 *	480 *
FQATHPVMDLKA	FPKONMLW	VEWTTTPRES	VKKYILEWCVL	SDKAPCITD	WQQEDGTVHRT
490 *	500 *	510 *	520 *	530 *	540 *
YLRGNLAESKCY	LITVTPVY	ADGPGSPESIK	AYLKQAPPS	KGPTVVRTK	KVGKNEAVLEWD
550 *	560 *	570 *	580 *	590 *	600 *
QLPVDVQNGFIR	NYTIFYRT	IIGNETAVNV	DSSHTEYTLS	SLTSDTLYM	VRMAAYTDEGG
610 *	620 *	630 *	640 *	650 *	660 *
KDGPEFTFTTPK	FQAQGEIES	<u>GERKSCDKTHT</u>	<u>CPPCPAPEL</u>	<u>LGGPSVFLFPR</u>	<u>KPKDTLMIS</u>
670 *	680 *	690 *	700 *	710 *	720 *
<u>RTREVT</u>	<u>CVVVDVSHED</u>	<u>REVK</u>	<u>FNWYVDGVEV</u>	<u>HNAKTKPREE</u>	<u>OYNSTYRVVSV</u>
730 *	740 *	750 *	760 *	770 *	780 *

Fig.4 (Fortsetzung)

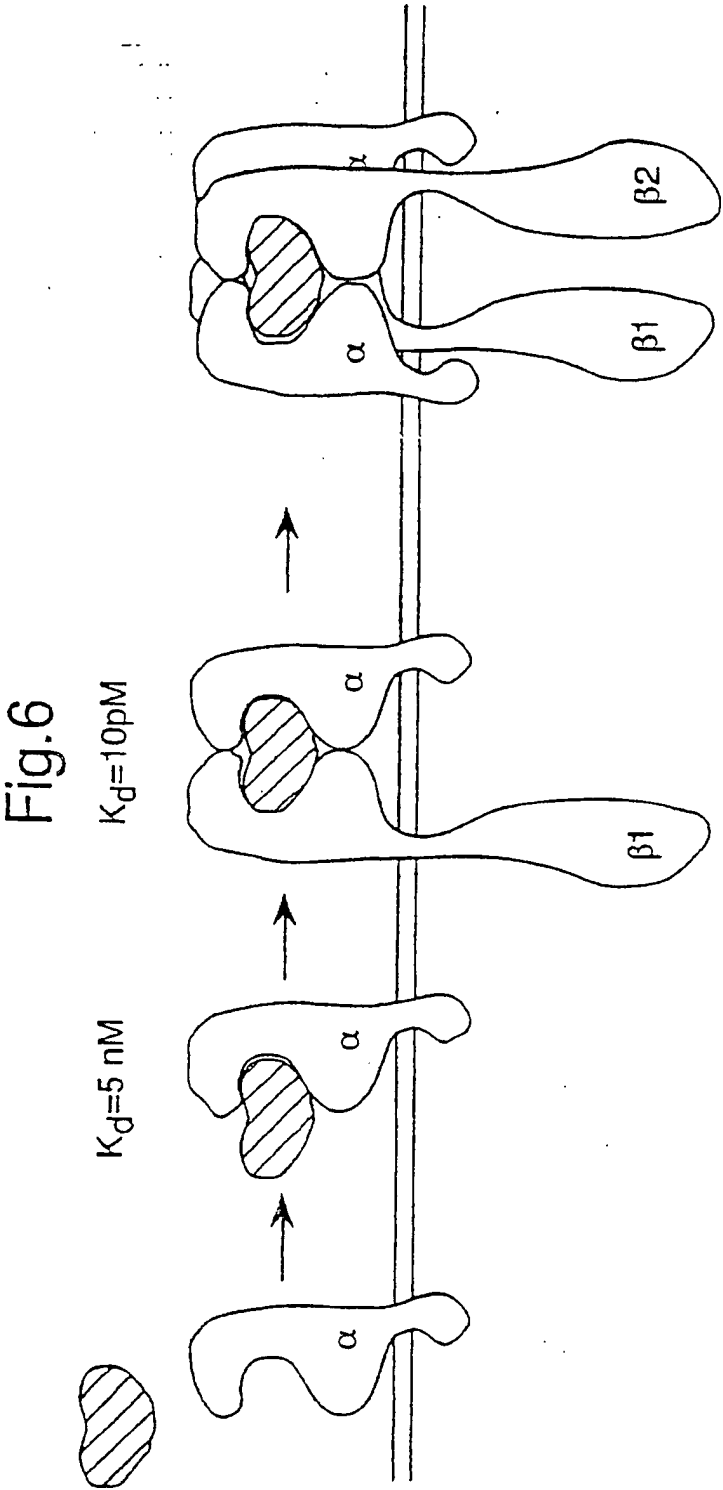
NGKEYCKVSNKALPAPIEK TISKAKGPREPOVYTLPPS RDELTKNOVSLTCLVKGFYP
 790 800 810 820 830 840
 * * * * * *
SDIAVEWESNGOPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWOOGNVFSCSVMHEALHN
 850 860
 * *
HYTOKSLSLSPGKHHHHH.

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 LLLRSVQLHDSGNYSYRAG RPAGTVHLLVDVPPEEPQLS
 130 140 150 160 170 180
 * * * * * *
CFRKSPLSNVVCEWGPRSTP SLTTKAVLLVRKFQNSPAED FQEPQYSQESQKFSCQLAV
 190 200 210 220 230 240
 * * * * * *
PEGDSSFYIVSMCVASSVGS KFSKTQTFQCGILQPDPPA NITVTAVARNPRWLSVTWQD
 250 260 270 280 290 300
 * * * * * *
PHSWNSSFYRLRFELRYRAE RSKTFTTMVKDLQHHCVIH DAWSGLRHVVLRAQEEFGQ
 310 320 330 340 350 360
 * * * * * *
GEWSEWSPEAMGTPWTESRS PPAENEVSTPMQALTTNKDD DNILFRDSANATSLPVQDAG
 370 380 390 400 410 420
 * * * * * *
EPKSCDKTHTCPRCRAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISR TREVTCVVVDVSHEDPEVKF
 430 440 450 460 470 480
 * * * * * *
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHODWLN GKEYCKVSNKALPAPIEKT
 490 500 510 520 530 540
 * * * * * *
ISKAKGPREPOVYTLPPSR DELTKNOVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGOPENNYKTTT
 550 560 570 580 590
 * * * * *
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWOOGNVFSCSVMHEALHNH YTOKSLSLSPGK.



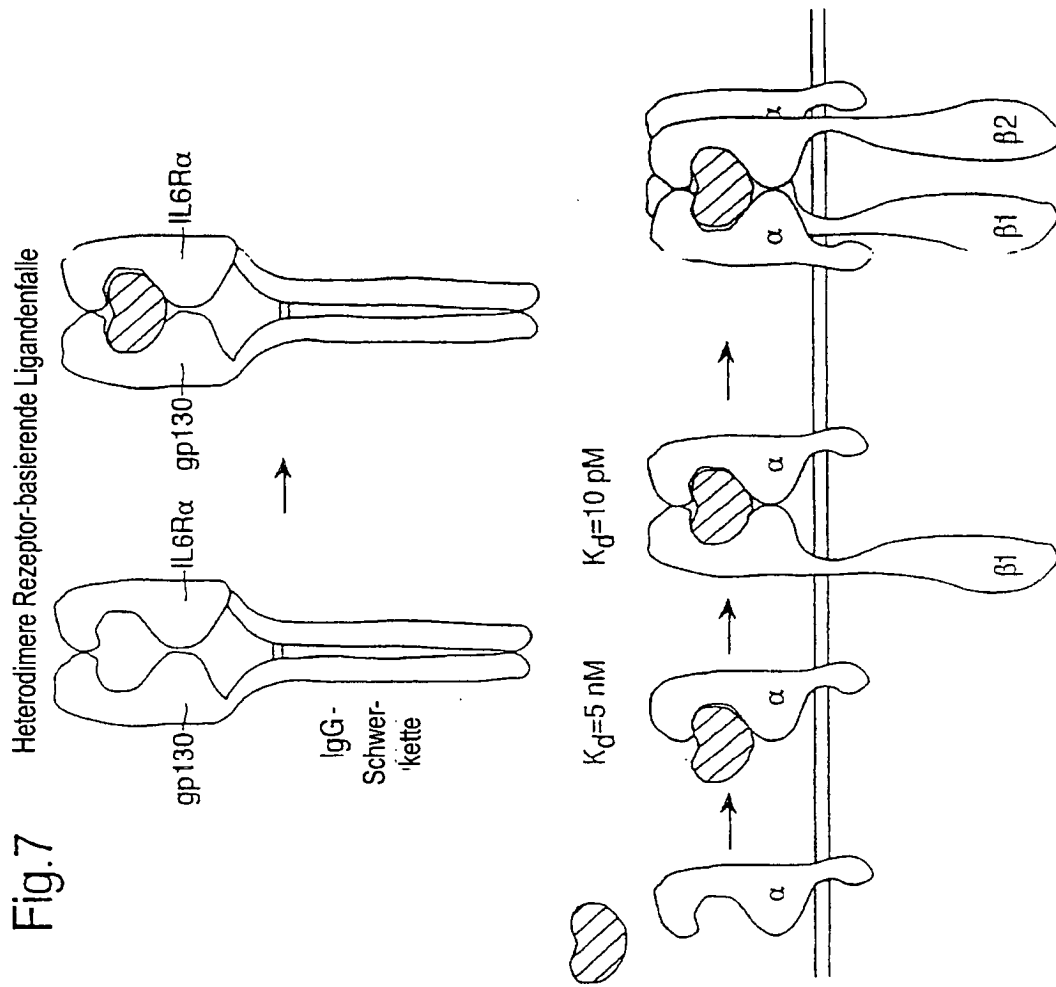


Fig.8.

Immunglobulin-Schwer/Leichtketten-Rezeptor-Fusionen

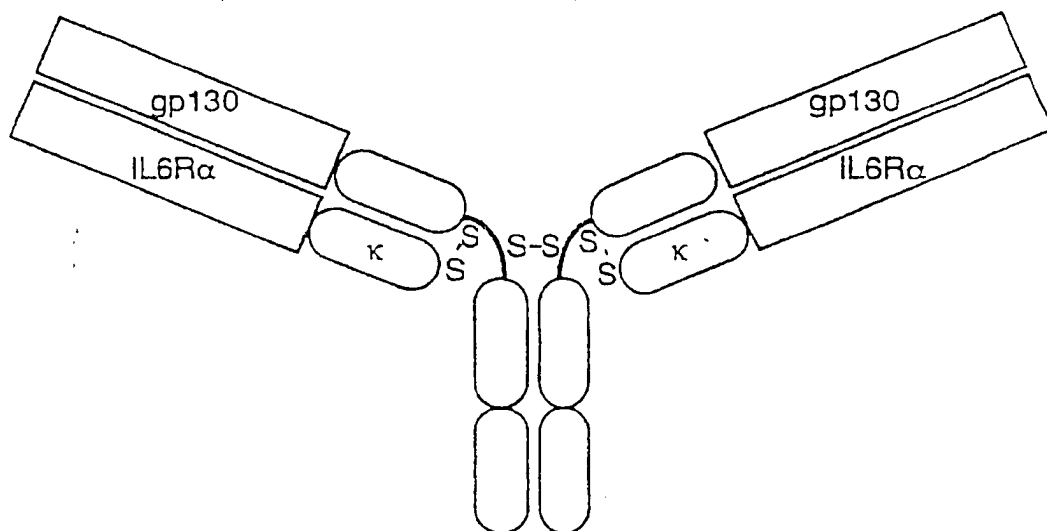


Fig.9.

Aminosäuresequenz von gp130-C_γ1

Sequenzbereich: 1 bis 952

10 *	20 *	30 *	40 *	50 *	60 *
MVTLQTWVWQALFIFLTTES	TGELLDPCGYISPESPVVQL	HSNFTAVCVLKEKCMDYFHV			
70 *	80 *	90 *	100 *	110 *	120 *
NANYIVWKTNHFTIPKEQYT	IINRTASSVTFTDIASLNIQ	LTCNILTFGQLEQNVYGITI			
130 *	140 *	150 *	160 *	170 *	180 *
ISGLPPEKPKNLSCIVNEGK	KMRCEWDGGRETHLETNFTL	KSEWATHKFADCKAKRDTFT			
190 *	200 *	210 *	220 *	230 *	240 *
SCTVDYSTVYFVNIEVWVEA	ENALGKVTSDHINFDPVYKV	KPNPPHNLSVINSEELSSIL			
250 *	260 *	270 *	280 *	290 *	300 *
KLTWTNPSIKSVIILKYNIQ	YRTKDASTWSQIPPEDTAST	RSSFTVQDLKPFTEYVFRIR			
310 *	320 *	330 *	340 *	350 *	360 *
CMKEDGKGYWSDWSEEASGI	TYEDRPSKAPSFWKIDPSH	TQGYRTVQLVWKTLPPEAN			
370 *	380 *	390 *	400 *	410 *	420 *
GKILDYEVTLTRWKSHLQNY	TVNATKLTVNLTNDRYLATL	TVRNLVGKSDAAVLTIPACD			
430 *	440 *	450 *	460 *	470 *	480 *
FQATHPVMDLKAFPKDNMLW	VEWTTTPRESVKKYILEWCVL	SDKAPCITDWQQEDGTVHRT			
490 *	500 *	510 *	520 *	530 *	540 *
YLRGNLAESKCYLITVTFVY	ADGPGSPESIKAYLKQAPPS	KGPTVVRTKKVGKNEAVLEWD			
550 *	560 *	570 *	580 *	590 *	600 *
QLPVDVQNGFIRNYTIFYRT	IIGNETAVNVDSSTHEYTLS	SLTSDTLYMVRMAAYTDEGG			
610 *	620 *	630 *	640 *	650 *	660 *
KDGPEFTFTTPKFAQGEIES	<u>GASTKGPSVFPLAPSSKSTS</u>	<u>GGTAALGCLVKDYFPEPVTV</u>			
670 *	680 *	690 *	700 *	710 *	720 *
<u>SWNSGALTSGVHTFPAVLOS</u>	<u>SGLYSLSVVTVPSSSLGTO</u>	<u>TYICNVNHKPSNTKVDKKVE</u>			
730 *	740 *	750 *	760 *	770 *	780 *
<u>PKSCDKTHTCPPCPAPELLG</u>	<u>GPSVFLFPPKPKDTLMISRT</u>	<u>PEVTCVVVDVSHEDPEVKFN</u>			

Fig.9 (Fortsetzung)

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

Fig.10

Aminosäuresequenz von gp130 Δ 3fibro

Sequenzbereich: 1 bis 332

10	20	30	40	50	60
*	*	*	*	*	*
MVTLQTWVVQALFIFLTES TGELLDPCGYISPESVQVL HSNFTAVCVLKEKCMDYFHV					
70	80	90	100	110	120
*	*	*	*	*	*
NANYIVWKTNHFTIPKEQYT IINRTASSVTFTDIASLNIQ LTCNILTFGQLEQNVYGITI					
130	140	150	160	170	180
*	*	*	*	*	*
ISGLPPEKPKNLSCIVNEGK KMRCEWDGGRETHLETNFTL KSEWATHKFADCKAKRDTPT					
190	200	210	220	230	240
*	*	*	*	*	*
SCTVDYSTVYFVNIEVWVEA ENALGKVTS DHINFDPVYKV KPNPPHNLSVINSEELSSIL					
250	260	270	280	290	300
*	*	*	*	*	*
KLTWTNPSIKSVIILKYNIQ YRTKDASTWSQIPPEDTAST RSSFTVQDLKPFTEYVFRIR					
310	320	330			
*	*	*			
CMKEDGKGYWSDWSEEASGI TYEDRPSKAPSG					

Fig.11

Aminosäuresequenz von J-CH1

Sequenzbereich: 1 bis 121

10	20	30	40	50	60
*	*	*	*	*	*
SGGQGT LVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTS					
70	80	90	100	110	120
*	*	*	*	*	*
GVHTFPAVLOSSGLYSLSSV VTPSSSLGTOTYICNVNHK 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
*	*	*	*	*	*
SSGLYSLSSVVTPSSSLGT KTYTCNV VDHK PSNTKVDKRV ESKYGPPCPSCPAPEFLGGP					
130	140	150	160	170	180
*	*	*	*	*	*
SVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSQEDPEVQFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQFNS					
190	200	210	220	230	240
*	*	*	*	*	*
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEM					
250	260	270	280	290	300
*	*	*	*	*	*
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVL 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		
*	*	*	*		
DSKDSTYLSSTLTLSKADY	EKKVYACEVTHQGLSSPVT	KSFNRGEC*			

Fig.14

Aminosäuresequenz der λ -Domäne

Sequenzbereich: 1 bis 107

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

Fig.15

Aminosäuresequenz 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
*	*	*	*	*	*
CFRKSPLSNVVCEWGPRSTP	SLTTKAVLLVRKFQNSPAED	FQEPQCQYSQESQKFSCQLAV			
190	200	210	220	230	240
*	*	*	*	*	*
PEGDSSFFIIVSMCVASSVGS	KFSKTQTFQCGILQPDPPA	NITVTAVARNPRWLSVTWQD			
250	260	270	280	290	300
*	*	*	*	*	*
PHSWNSSFYRLRFELRYRAE	RSKTFTTWMVKDLQHHCVIH	DAWSGLRHVVQLRAQEEFGQ			
310	320	330	340	350	360
*	*	*	*	*	*
GEWSEWSPEAMGTPWTESRS	PPAENEVSTPMQALTTNKDD	DNILFRDSANATSLPVQDAG			

Fig.16

Aminosäuresequenz 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
*	*	*	*	*	*
CFRKSPLSNVVCEWGPRSTP	SLTTKAVLLVRKFQNSPAED	FQEPQCQYSQESQKFSCQLAV			
190	200	210	220	230	240
*	*	*	*	*	*
PEGDSSFFIIVSMCVASSVGS	KFSKTQTFQCGILQPDPPA	NITVTAVARNPRWLSVTWQD			
250	260	270	280	290	300
*	*	*	*	*	*
PHSWNSSFYRLRFELRYRAE	RSKTFTTWMVKDLQHHCVIH	DAWSGLRHVVQLRAQEEFGQ			
310					
*					
GEWSEWSPEAMGTTG					

Fig.17

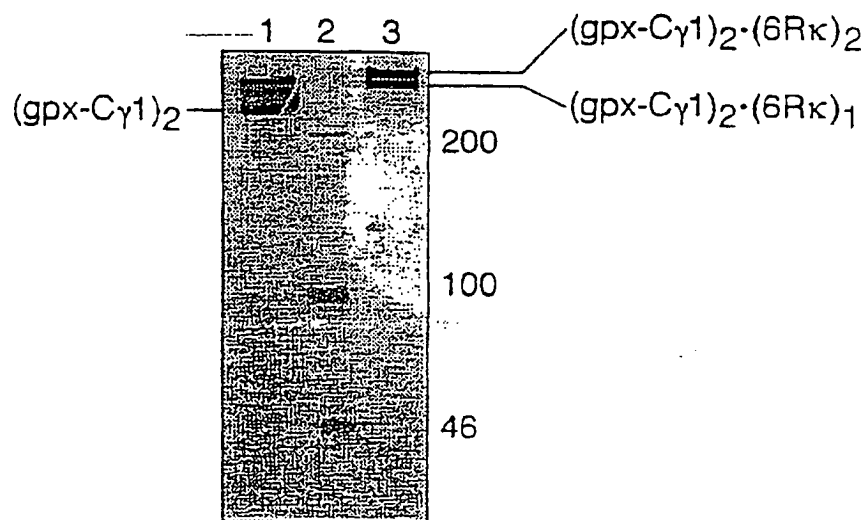
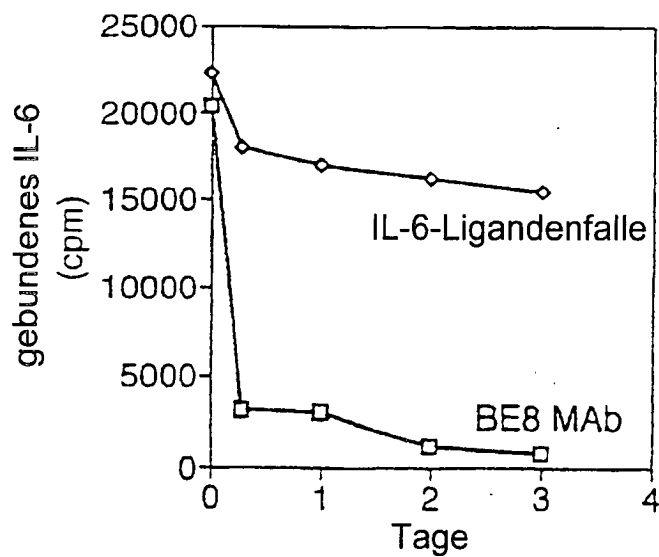


Fig.18

IL-6 dissoziiert langsam aus der Ligandenfalle



Induziert IL-6 Komplexbildung ?

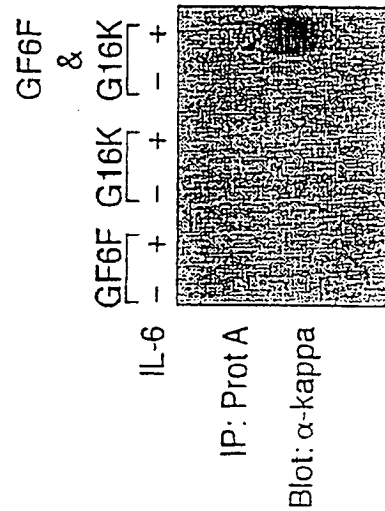
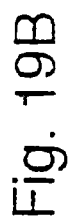


Fig.20.

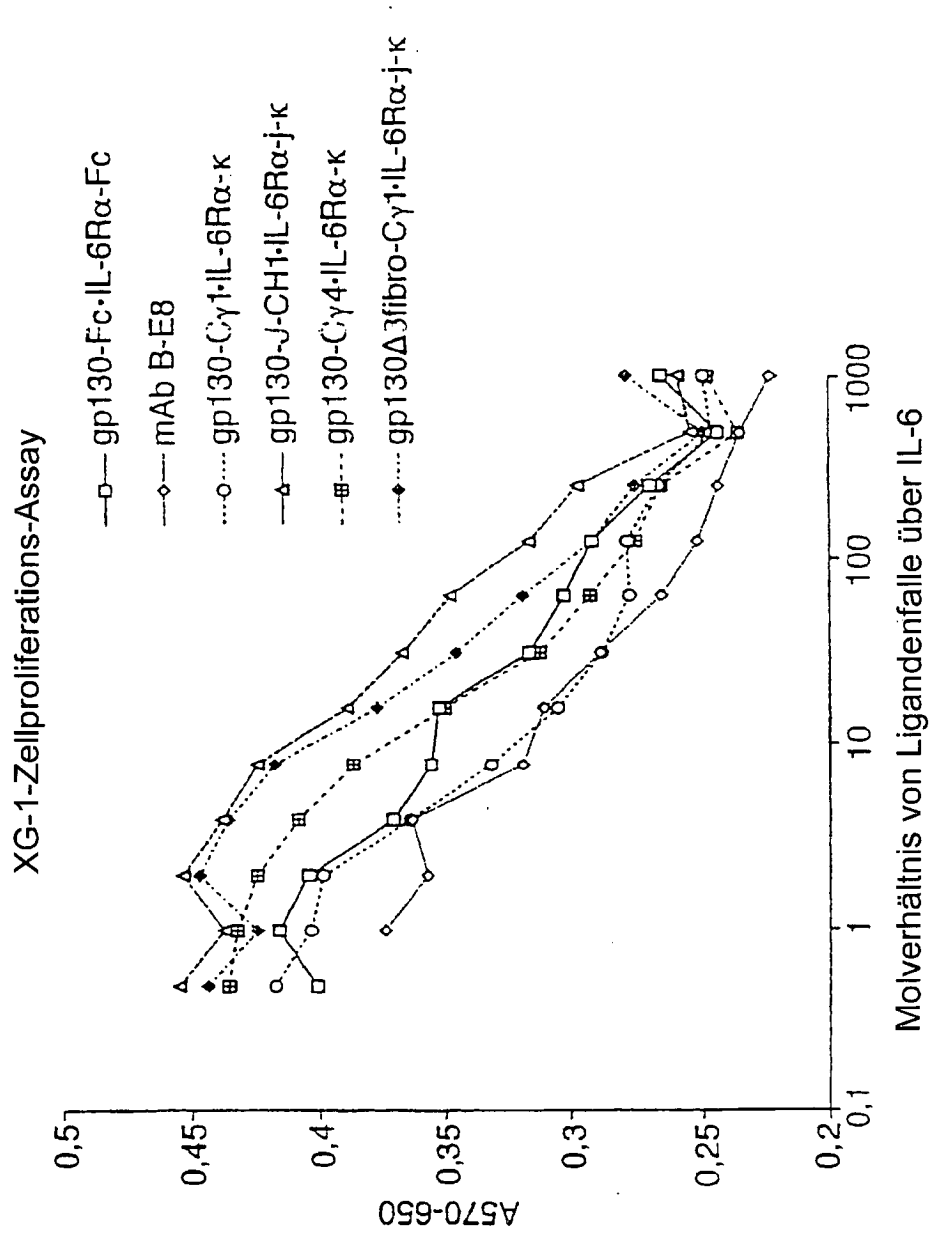


Fig.21A.

```

      10      20      30      40
      *      *      *      *
ATG GTG AAG CCA TCA TTA CCA TTT 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 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 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 CCG GTG AGG GCC TGG GCT CAG TGC TAT AAC ACC ACC TGG ACT GAG
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 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.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 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.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 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 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.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 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.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 Cln Ser 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.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 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.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 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 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 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 GGC TTG CCT CCA GAA AAA CCT
Asn Val Tyr Gly Ile Thr Ile Ile Ser Gly Leu Pro Pro Glu Lys Pro>

      1350      1360      1370      1380      1390
      *      *      *      *      *
AAA AAT TTG AGT TGC ATT GTG AAC GAG GGG 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 Ile 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 ATA GAA GCT CCA CCT TCC AAA GGA CCT ACT CTT CCC AGA AAA 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 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
*          *          *          *
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
*          *          *          *
TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC AGC AAG CTC ACC GTG GAC AAG AGC
Ser Asp Gly Ser Phe 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.

```

      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 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 TTC CAG AAG TTC TTC 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 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 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 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.25B.

```

      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 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 GTA 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
      *      *      *      *      *
GTA 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 GGC
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
Leu 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 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 GGT 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 GTT 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 GGT 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 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 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 ACC 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 CTC 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 AAT CGC AAC CAG TAC AAG TCC AAG GTT TCC AAC AAA 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 CGG 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 Lys 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.

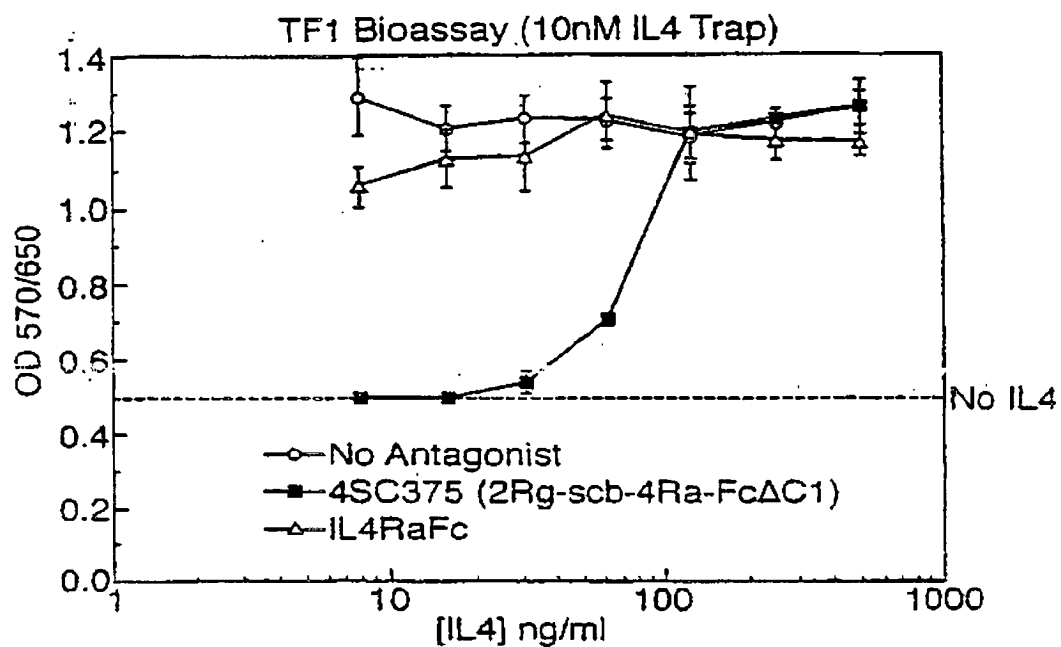


Fig.28.

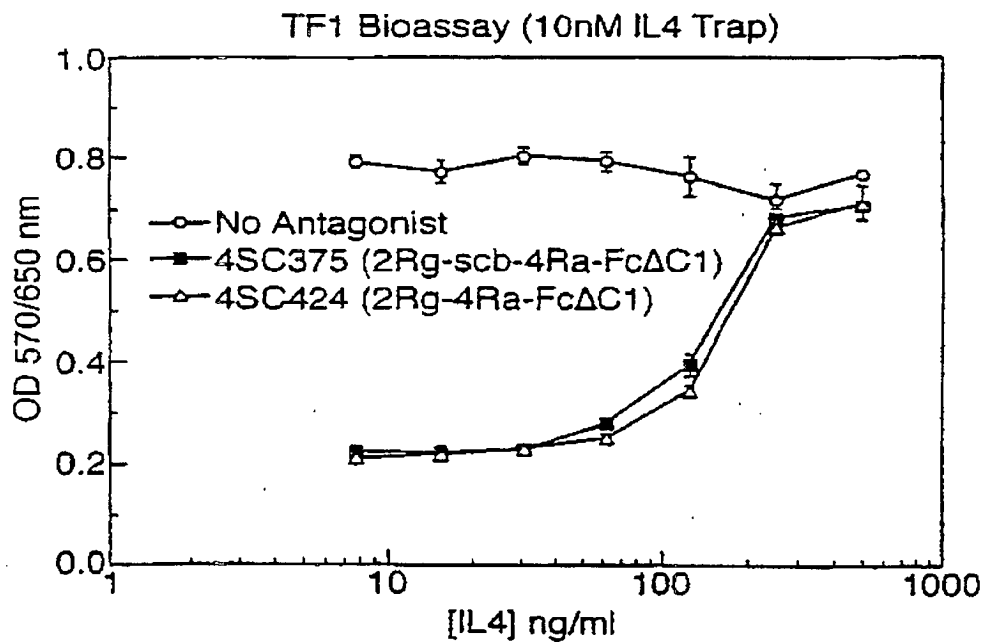


Fig.29.

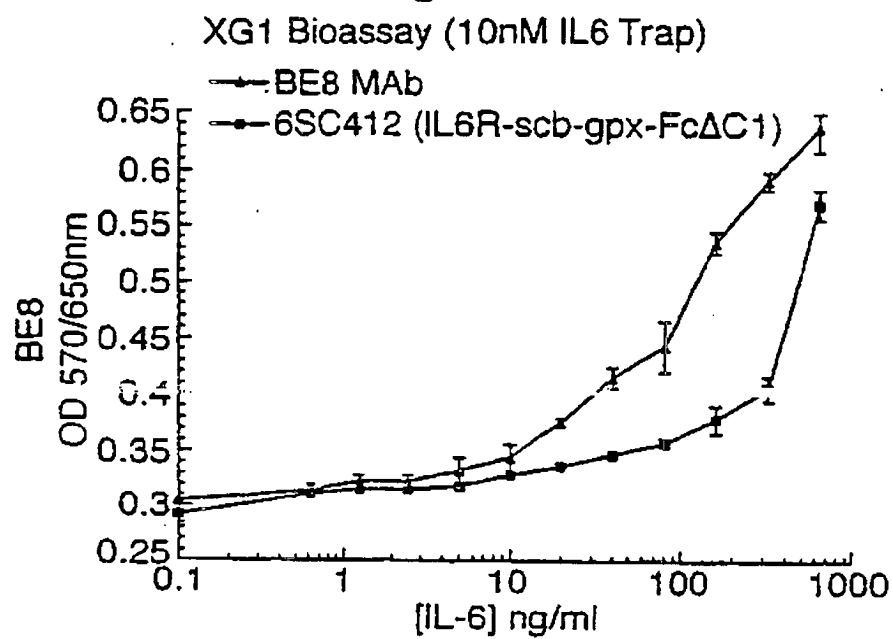


Fig.31A.

```

      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 GAC TGG ACC TCG
Leu Thr Val His Thr Asn Val Ser Asp Thr Leu 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
TTG 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 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 GTG 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
Leu 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 GTT 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 TTC 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 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.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 GGG GGC GCC GCG CCT ACG GAA ACT CAG
CGG CCG CCG CCC CCG CCC CCG CCC CCG CGG CGC GGA TGC CTT TGA GTC
Ala Gly Gly Gly Gly 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 GGG 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 TTT 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 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 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 ACG 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 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 GAC TGG ACC TCG TTG GGC ATA
His Thr Asn Val Ser Asp Thr Leu 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 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
*      *      *      *      *
GTG 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 GCC 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					2010				
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*						
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	CGG	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.

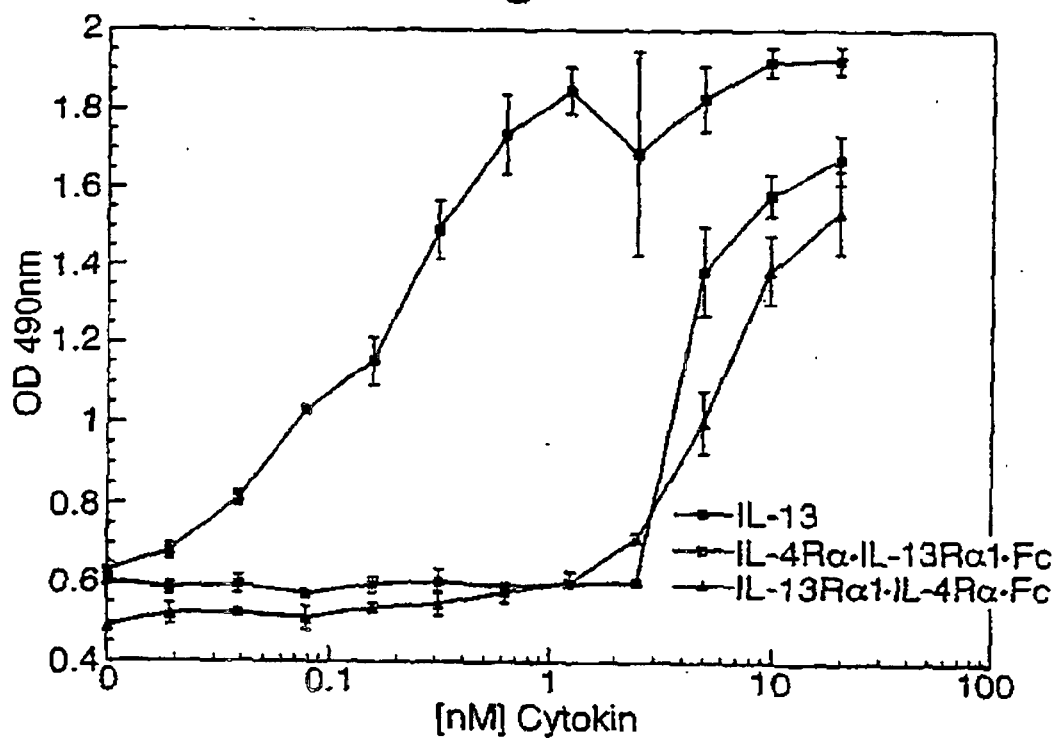


Fig.34

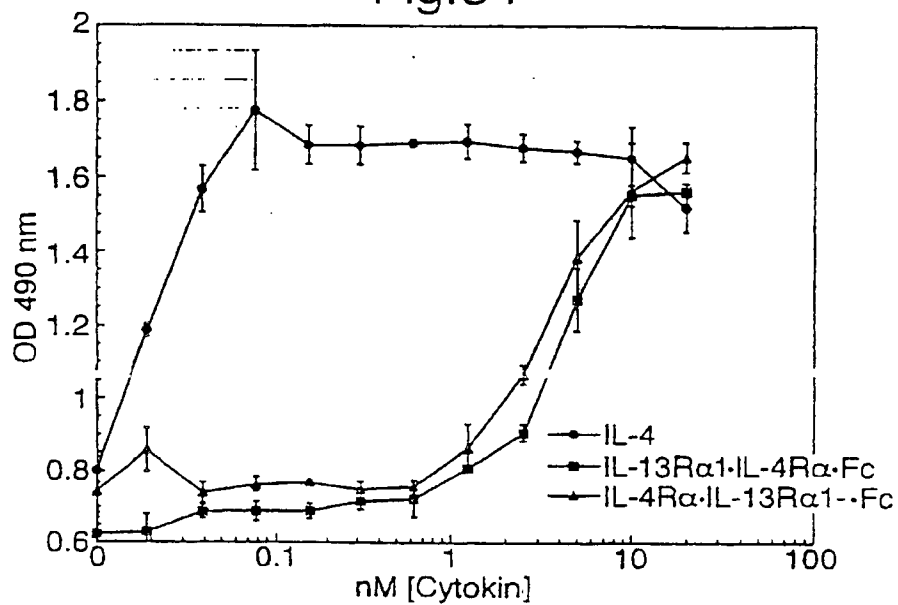


Fig.35

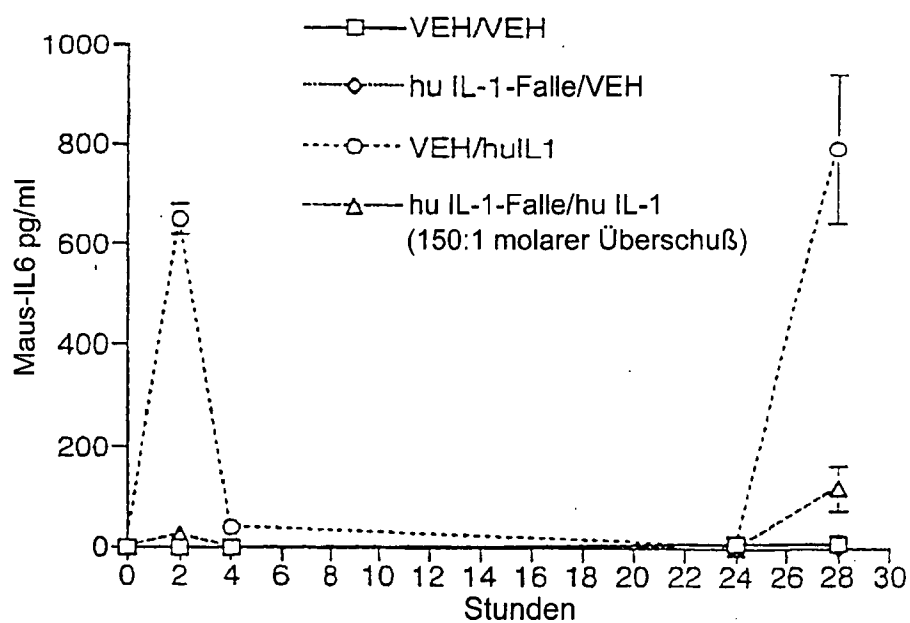


Fig.36A

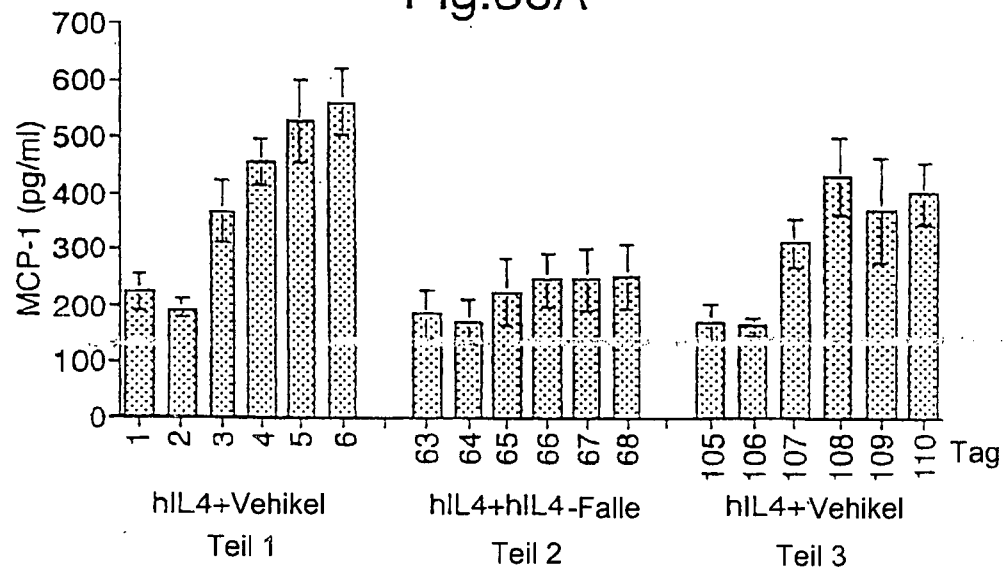


Fig.36B

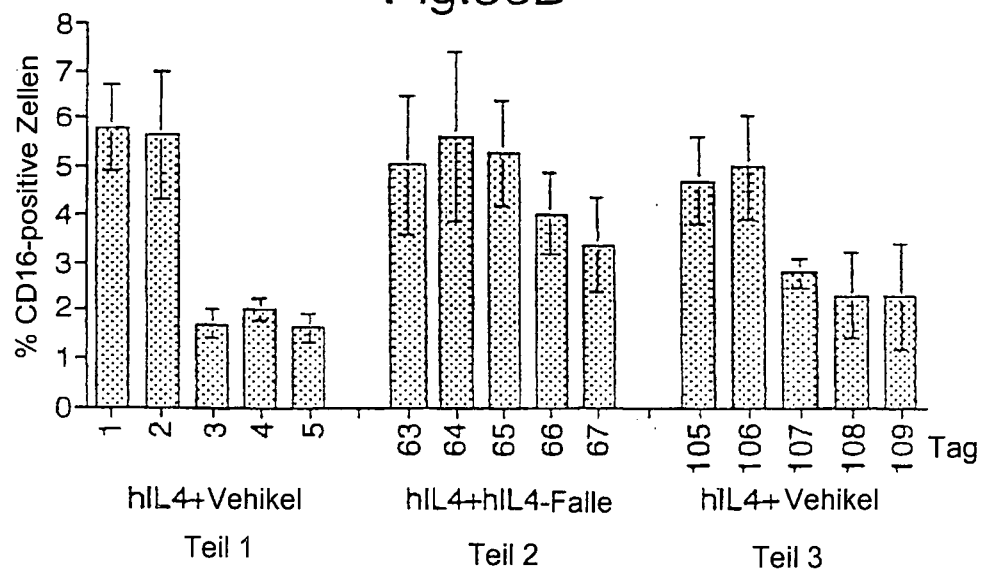


Fig.37

