



## (12) PATENTSKRIFT

Patent- og  
Varemærkestyrelsen

---

- (51) Int.Cl<sup>7</sup>: **A 61 K 38/02 C 07 K 14/00**
- (21) Patentansøgning nr: **PA 1989 02119**
- (22) Indleveringsdag: **1989-05-01**
- (24) Løbedag: **1988-08-30**
- (41) Alm. tilgængelig: **1989-06-28**
- (45) Patentets meddelelse bkg. den: **2004-12-13**
- (86) International ansøgning nr: **PCT/US88/02991**
- (86) International indleveringsdag: **1988-08-30**
- (85) Videreførelsesdag: **1989-05-01**
- (30) Prioritet: **1987-08-30 IL 83687**
- (73) Patenthaver: **Jonathan M. Gershoni, 28 Nasi Harishon Street, 76 100 Rehovot, Israel**
- (72) Opfinder: **Jonathan M. Gershoni, 28 Nasi Harishon Street, 76 100 Rehovot, Israel**
- (74) Fuldmægtig: **Internationalt Patent-Bureau A/S, Høje Taastrup Boulevard 23, 2630 Taastrup, Danmark**
- 

(54) Benævnelse: **Molekylfælde og anvendelse deraf**

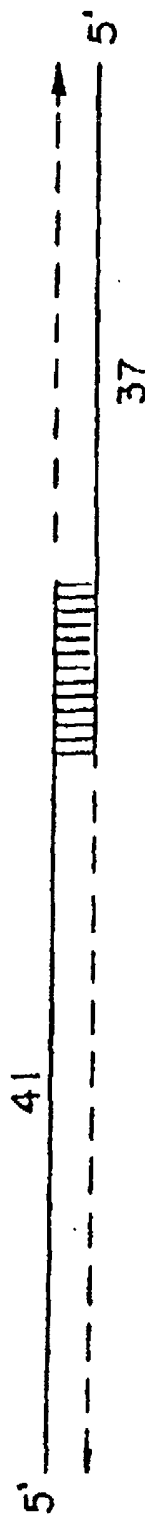
(57) Sammendrag:

Molekylære decoyanter er kemiske strukturer, der funktionelt ligner en endogen receptor. De kan anvendes til behandling af mennesker eller dyr, der har været udsat for en fremmed komponent, der kun udviser en uønsket virkning efter binding til den endogene receptor. En decoyant er en del af en endogen receptor, hvilken del stadig har de essentielle elementer af bindingsstedet af receptoren for den fremmede komponent, eller den er et syntetisk eller biosyntetisk derivat af en sådan del.  $\alpha$ -184-200-aminosyresekvensen af Torpedo californica-acetylcholinreceptoren er et eksempel på en decoyant, der beskytter mod curarimimetiske neurotoxiner. Et andet eksempel er den fraktion af CD4-receptoren, der stadig har de essentielle elementer af receptoren til beskyttelse mod HIV.

1) SYNTETISKE OLIGONUCLEOTIDER

41: 3'-GTCCACATCATTTGGGTCACAAGGTCGCCGGAGCTAGGG-5'  
 37: 3'-GATGTGGACGACGGGCTGTGAGGCATGGACCTGACT-5'

2) Klenow UDFYLDNING



3) INDFØJELSE I SMA-STED AF PATH2;

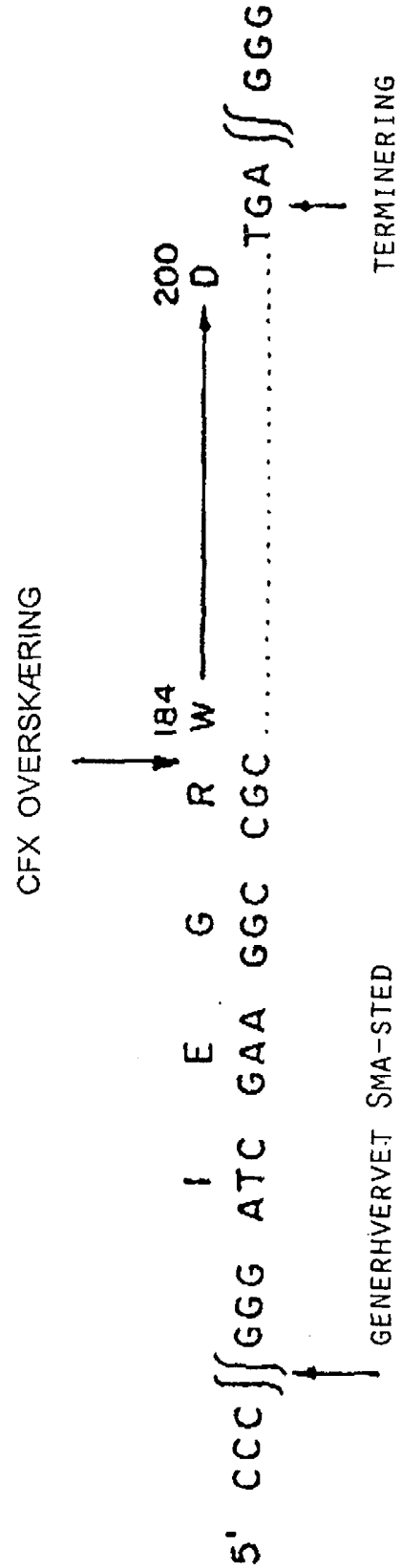


FIG. I

Den foreliggende opfindelse angår stoffer, der er nyttige til behandling af dyr eller mennesker, der har været udsat for en fremmed komponent, som kun har en uønsket virkning efter binding til en  
5 endogen receptor. Opfindelsen angår især sådanne stoffer, som opnås direkte eller indirekte udfra den naturlige endogene receptor, og deres anvendelse.

Til udøvelse af deres virkning i en levende organisme bindes mange patogene og toksiske komponenter,  
10 såsom virus, bakterier og desuden toxiner og giftstoffer, til specifikke bindingssteder, f.eks. til celleoverfladereceptorer. Sådanne bindingsfænomener kan være nødvendige som et første trin ved viral inficering, eller det kan være det afgørende trin ved toxininaktivering af en afgørende fysiologisk funktion. En receptor  
15 er en cellekomponent, der vekselvirker med en specifik ligand. Ligander, der klassificeres som agonister, aktiverer, når de bindes til deres receptorer, et effektorsystem og udløser en biologisk reaktion. Ligander,  
20 der klassificeres som antagonist undertrykker receptorer eller inhiberer agonistens virkning. Når f.eks. kobraslangegift eller curare bindes til en cholinerg receptor hindres bindingen af acetylcholin. Hindring af en sådan dannelse af visse ligand-receptor-komplekser  
25 skulle være gunstige til bekæmpelse af den patogene eller toksiske komponents skadelige virkninger.

Hindring af kompleksdannelse kan opnås via flere grundlæggende forskellige mekanismer. F.eks. har udviklingen af antitoxin-antisera vist sig at være en nyttig  
30 metode til behandling af slangebids. Immunologisk inaktivering af virus og bakterier er essensen af vaccination. I begge disse tilfælde fanges det infiltrerende stof af stærkt stereospecifikke immunglobuliner,

der igen hindrer stoffet i at nå dets mål for virkning.

Alternativt er en anden metode fornyligt foreslået, ifølge hvilken en analog af det fremmede materiale anvendes til i forvejen at optage værtsreceptorens bindingssted, hvorved virus eller bakterier hindres i binding til det væv, de normalt vil inficere.

Disse kendte metoder har imidlertid visse grundlæggende ulemper. Immunologisk inaktivering er "ligandspecifik". Endvidere har mange bakterier og virus evne til periodisk at modificere deres immunogene epitoper ved tilfældige mutationer og rekombinationsprocesser, hvorved de gør immunoglobulinet ineffektivt. Anvendelsen af ligandanaloge er "receptorspecifik". Sådanne analoge optager imidlertid pr. definition receptoren og hindrer dens funktionsdygtighed.

Ifølge den foreliggende opfindelse anvendes en hidtil ukendt fremgangsmåde til løsning af problemet med hindring af dannelse af sådanne ligand-receptor-komplekser, hvilken metode er "receptorspecifik", men dog ikke hindrer den naturlige receptors funktion.

Det tilsigtes med den foreliggende opfindelse at undgå ulemperne ved den kendte teknik.

Det tilsigtes endvidere med den foreliggende opfindelse af tilvejebringe en hidtil ukendt fremgangsmåde til hindring af dannelse af ligand-receptor-komplekser, hvilken fremgangsmåde er "receptorspecifik", men dog ikke hindrer receptorstedernes funktion.

Det tilsigtes yderligere med den foreliggende opfindelse af tilvejebringe molekulære opfangende midler ("molekulære decoyanter"), som ikke er væsentligt større end molekylstrukturen af ligandbindingsstedet i den naturlige receptor, og som kan anvendes til binding af

pathogene eller toksiske komponenter in vivo på en sådan måde, at de er specifikke overfor et specifikt mål ("målspecifik").

Det tilsigtes endvidere med den foreliggende  
5 opfindelse at tilvejebringe stoffer, der er små nok til at være i det væsentlige ikke-immunogene, og som virker som decoyanter in vivo til konkurrence med de naturlige bindingssteder og opfangning af de specifikke ligander og inaktivering af dem.

10 Disse og andre fordele ved den foreliggende opfindelse vil kunne forstås efter studium af den følgende, detaljerede beskrivelse af foretrukne udførelsesformer i forbindelse med tegningerne.

Den nye løsning på problemet med at hindre dan-  
15 nelse af ligand-receptorkomplekser, i tilfælde, hvor liganden er en fremmed komponent, der har en uønsket virkning efter specifik binding til en endogen receptor, indebærer identifikation af ligandbindingsstedets molekylstruktur i den naturlige receptor og dannelse af mi-  
20 metiske ligandbindingssteder. Disse steder kan anvendes in vivo til binding af toxiner eller vira eller en hvilken som helst anden, fremmed komponent på en "målspecifik måde". De mimetiske ligandbindingssteder ifølge den foreliggende opfindelse konkurrerer således i dy-  
25 rets krop eller menneskets legeme med naturlige bindingssteder og virker således molekyllopfangene. Sådanne stoffer betegnes som "molekylære decoyanter" igennem den nærværende beskrivelse.

Det formodes, at naturlige receptorer er for-  
30 holdt store strukturer, omfattende nogle hundrede aminosyrer, og at de kan være så store at de har en molekylvægt på ca. 250.000. Det specifikke bindingssted er imidlertid meget mindre, og dette åbner for mulighe-

den for fremstilling af kunstige, syntetiske bindingssteder, som er effektive til binding af specifikke vira, bakterier, toxiner, osv, men som indeholder et meget mindre antal aminosyrer, fortrinsvis mindre end 5 100, og derfor har en betydelig lavere molekylvægt og en tilsvarende lavere immunogenicitet. Det har vist sig muligt at fremstille sådanne bindingsstedsmimetiske molekylære decoyanter, som er tilpasset til binding af specifikke ligander og har en størrelse i området om- 10 kring 20 aminosyrer. Sådanne forholdsvis små peptidstrukturer kan fremstilles ved fysisk deling af den endogene receptor, eller de kan fremstilles syntetisk ved præparative peptidkemiske metoder, såsom Merrifield-syntese, eller ved genmanipulation. Dette 15 åbner for muligheden for stor-skalaproduktion af sådanne specifikke polypeptidstrukturer og for deres anvendelse som aktive materialer til behandling af dyr, der har været udsat for patogene eller toksiske stoffer.

Idet molekylære decoyanter bindes til liganden 20 netop ved det sted, der er nødvendigt for, at liganden kan binde til den endogene receptor, hvilket igen er nødvendigt for at det kan udøve dets uønskede virkning, kan liganden ikke ændre dette sted uden, at den deaktiveres. Decoyanter er således meget mere pålidelige end 25 immunoglobuliner og har langtidsvirkning.

Den foreliggende opfindelse har en meget bred anvendelighed, idet molekylære decoyanter, der er specifikke for mange forskellige ligander kan fremstilles. Opfindelsen omfatter både profylaktiske og terapeutiske 30 midler, der kan indeholde de aktive molekylære decoyantstrukturer i passende koncentration og mængde.

Kort beskrivelse af tegningerne

Fig.1 viser fremgangsmådetrinnene til opnåelse af den 17 aminosyrers sekvens WKHWVYYTCCPDTPYLD ved re-  
5 kombinant DNA-teknik.

Fig. 2 viser resultaterne af adskillelsen af forskellige prøver af en R4137 clon dyrket til opnåelse af trpE-fusionsproteinet, på polyacrylamidgeler. Cellerne solubileredes enten i prøvepuffer (T) eller  
10 lydbehandlede i en puffer med højt saltindhold (500 mM) og centrifugeredes. Supernatanten ( $S_1$ ) indeholdt 40-60% af fusionsproteinet ligesom pelleten ( $P_1$ ). Pelleten ekstraheredes yderligere med vand til dannelse af en supernatant ( $S_2$ ), som havde omtrent 15% af det  
15 oprindelige fusionsproteinindhold, og en pellet ( $P_2$ ). Efter polyacrylamidgelelektroforese (PAGE) farvedes prøverne enten med Coomassie brilliant blå (øverst), eller de blev underkastet blotting og overlagt med  $^{125}\text{I}$ -mærket  $\alpha$ -bungarotoxin (BTX) og dernæst underkastet  
20 autoradiografi (nederst). Pilhovederne viser fusionsproteinets position. Tallene viser relativ molekylmasse i kDa.

Fig. 3 er en graf, der viser koncentrationen af bundet toxin til specifikke tidspunkter ( $C_t$ ) divideret  
25 med den koncentration, der opnås ved ligevægt ( $C_{eq}$ ), efter inkubation af R4137 med  $^{125}\text{I}$ -mærket BTX i de forskellige, viste tidsrum. Koncentrationerne målttes efter anbringelse af delmængder på positivt ladede membranfiltreskiver. Tiden målttes i minutter i fig. A  
30 og sekunder i fig. B.

Fig. 4 er en graf, der viser Scatchard-analyse af toxinbinding til R4137. Efter at inkubationen med forskellige koncentrationer af  $^{125}\text{I}$ -mærket BTX indtil li-

gevægt var opnået (30 min), bestemtes den bundne nettomængde BTX ved tilsætning af et 1.000 ganges overskud af ikke-radioaktivt BTX, og den bundne mængde versus det frie toxin beregnedes for hvert punkt.

5 Fig. 5 er en graf, der viser konkurrencen ved BTX-binding. Det procentvise indhold af  $^{125}\text{I}$ -mærket BTX ( $2 \times 10^{-8}$  M) er afbildet efter blanding med stadig stigende koncentrationer af ikke-mærket BTX (O), kobratoxin NB ( $\Delta$ ), decamethonium ( $\diamond$ ), d-tubocurarine (O), NaCl ( $\square$ ), 10 carbamylcholin (x) eller glycin ( $\phi$ ). Blandingerne inkuberedes med lige store mængder R4137 i 30 minutter ved  $25^\circ\text{C}$ , og nettomængden af bundet, radioaktivt toxin bestemtes.

Fig. 6A er en graf med afbildning af mængden af 15 bundet  $^{125}\text{I}$ -mærket BTX som en funktion af den samlede mængde af  $^{125}\text{I}$ -mærket BTX overført til en concanavalin-A-kolonne, hvorpå AcChOR var immobiliseret.

Fig. 6B er en graf, der viser en afbildning af 20 mængden af bundet  $^{125}\text{I}$ -mærket BTX på en concanavalin-A-kolonne, hvorpå AcChOR er immobiliseret, som en funktion af mængden af R4137 overført til kolonnen, efter forskellige mængder af R4137 og konstante mængder af  $^{125}\text{I}$ -mærket BTX var overført dertil.

Fig. 7 er en graf, der viser virkningen af R4137 25 på overlevelseshraten for mus, der havde modtaget D-tubocurarininjektion. To grupper af Balb/C-mus (35 i hver) fik injiceret enten pATH2 eller R4137 (ca. 3 nmol BTX-bindingssteder/mus) intraperitonealt. Fem minutter senere modtog musene D-tubocurarin (ca. 15 nmol, 9 30  $\mu\text{g}/\text{mus}$ , subcutant). Antallet af overlevende som en funktion af tiden efter injektionen af toxin er vist (dataene er opnået ved forsøgene 2 og 3 jævnfør tabel 1).

Skønt den foreliggende opfindelse kan anvendes i forbindelse med molekulære decoyanter, som efterligner en vilkårlig endogen receptors bindingssted, vil den blive diskuteret i detaljer med hensyn til det cholinerge bindingssted. Det er kendt, at  $\alpha$ -bungarotoxin (BTX), der er et slangegift- $\alpha$ -neurotoxin, udøver dets toksiske virkning ved blokering af bindingen af cholinerge ligander til nikotin-acetylcholinreceptoren (AcChooR).

10 Det neuro-muskulære bindeled er det sted, hvor nerverne møder muskelfibre. Kontaktpunktet er synapsen, som er karakteriseret ved, at nerven og muskelen faktisk ikke er fysisk forbundne, men i stedet danner en form for kemisk bindeled. Når nerveimpulsen når spidsen  
15 af axonen, udskilles neurotransmitteren acetylcholin til mellemrummet mellem nerven og muskelen, dvs. "synapse spalten". Acetylcholin bindes til dets receptor, som er anbragt på muskelens extracellulære membran på den post-synaptiske side af bindeleddet. Bindingen  
20 af to molekyler af acetylcholin til deres receptor får en ion-kanal til at åbne, membranen til at depolarisere og fører tilsidst til muskelkontraktion.

BTX er en antagonist, som bindes til AcChooR, og derved hindrer acetylcholin i at nå dets receptor og  
25 hindrer muskelkontraktion. Til fremstilling af en molekylær decoyant til behandling af dyr udsat for BTX må man først identificere det særlige BTX-bindingssted. Den foretrukne fremgangsmåde til at gøre dette er belægning af proteinblots med ligand. Når først bindings-  
30 stedet er identificeret kan den minimale sekvens fremstilles. Ved administrering af en sådan sekvens vil den molekulære opfangene forbindelse efterligne bindingsstedet og binde til BTX, hvorved det blokerer toxinets uønskede virkning.

Det specifikke bindingssted for BTX på AcChoR er kendt som værende anbragt på dets  $\alpha$ -underenhed. De minimale, nødvendige elementer af bindingsstedet, som stadig vil give selektiv og specifik binding med rimelig affinitet til BTX, kan identificeres yderligere ved hjælp af proteinblotting. Proteinblottingsmetoden er diskuteret i detaljer i Gershoni, "Protein Blotting: A Manual" i Methods of Biochemical Analysis, redigeret af David Glick, John Wiley and Sons, vol. 33, side 1-55, 1988. Fremgangsmåden involverer overførsel af adskilte polypeptider fra chromatografiske geler til immobiliserende materialer.

BTX er et polypeptidtoxin (74 aminosyrerester), der kan ioderes og bindes til receptoren med en affinitet på  $K_D=10^{-11}$ M. Renset AcChoR underkastes polyacrylamidgelelektroforese (PAGE) under mild denaturering uden kogning af prøven og under anvendelse af lithiumdodecylsulfat istedet for natriumdodecylsulfat (SDS). Der fremstilles blots, som sonderes med  $^{125}$ I-mærket BTX. Sådanne forsøg viser, at  $\alpha$ -enheden af AcChoR mærkes (Gershoni et al., "Binding of  $\alpha$ -Bungarotoxin to Isolated  $\alpha$ -Subunit of the Acetylcholine Receptor of *Torpedo californica*: Quantitative Analysis with Protein Blots", Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 80: 493-4977 (1983)).  $\alpha$ -underenheden underkastes dernæst proteolyse, hvorefter protein blots opnået derved sonderes med alkalisk phosphatasehydrazid, concanavalin-A, BTX og sekvensspecifikke antistoffer, som sammen har muliggjort kortlægning af toxinbindingsstedet til regionen  $\alpha$ -160-330, nærmere betegnet  $\alpha$ -160-210 og mere specifikt regionen  $\alpha$ -180-200 (se Neumann et al, "Mapping of the  $\alpha$ -Bungarotoxin Binding Site with the  $\alpha$ -Subunit of the Acetylcholine Receptor", Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 83:3008-3011 (1986)).

Til bestemmelse af det cholinerge bindingssted mere nøjagtigt, fremstilledes en række forskellige syntetiske peptider, og deres evne til binding til cholinerge ligander bestemtes. Af de mange testede peptider 5 var kun de, der indeholdt  $\alpha$ -185-196-sekvensen i stand til at binde BTX. Peptidet viste sig, at have lav affinitet ( $10^{-5}$  M), men havde stadig stærk, specifik BTX-bindingsevne. Højere affinitet ( $10^{-7}$  M) fandtes for sekvensen  $\alpha$ -173-204.

10 BTX-bindingssekvenser kan også fremstilles ved rekombinant DNA-teknik. Subkloner af cDNA af  $\alpha$ -underenheder fra mus eller Torpedo californica fremstilledes under anvendelse af ekspressionsvektorer. trpE-fusionsvektoren pATH2 anvendtes. Restriktionsfragmenter 15 af plasmidet p42, en cDNA-klon af  $\alpha$ -underenheden af Torpedo californica AcChoR, oprensedes på 1% agarosegeler. Præparative mængder af plasmider opnåedes, og ligationer udførtes under transformationer af E.coli stamme HB101 ved fremgangsmåderne ifølge Maniatis et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1982. Ved sådanne metoder fremstilledes fusionsproteiner i E.coli-transformanter (Gershoni, "Expression of the  $\alpha$ -Bungarotoxin Binding Site of the 25 Nicotinic Acetylcholine Receptor by Escherichia coli Transformants", Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 84, 4318-4321 (1987)). Disse fusionsproteiner vist specifikt at binde BTX (affinitet:  $10^{-7M}$ ). Således binder bakterielt eksprimerede proteiner indeholdende 30  $\alpha$ -166-200 således toxin, mens eksprimerede proteiner indeholdende  $\alpha$ -201-315 ikke gør.

To oligonucleotider som vist i fig. 1(1) fremstilledes. De konstrueredes under anvendelse af

bakterielt foretrukne codoner til kodning for aminosyresekvensen: Gly-Ile-Glu-Gly-Arg-Trp-Lys-His-Trp-Val-Tyr-Tyr-Thr-Cys-Cys-Pro-Asp-Thr-Pro-Tyr-Leu-Asp, der omfatter  $\alpha$ -184-200 af Torpedo californica-AcChoR og et pentapeptid tilføjet N-terminalt til resten W184. Det første glycin er resultatet af trinucleotidet dGGG, der er nødvendigt til bevarelse af et funktionelt SmaI-sted. Den følgende sekvens IEGR er det specifikke overskæringssted for koagulationsfaktoren Xa (CFX). Det eksprimerede fusionsprotein kan således spaltes fra med dette enzym, hvilket muliggør den sluttelige frigivelse af stedet af interesse, dvs. den 17 aminosyrers sekvens: WKHWVYYTCCPDTPYLD. De to oligonucleotider blandedes i et forhold på 1:1, opvarmedes sammen og fik lov til at undergå annealing til dannelse af en duplex på 9 basepar. De komplementære strenge udfyldtes dernæst enzymatisk under anvendelse af Klenow polymerase (1  $\mu$ l; 5 enheder), som vist i fig. 1(2), hvorefter DNA'et phenolekstraheredes og fældedes i ethanol under anvendelse af glycogen som bærer. Det konstruerede molekyle ligeredes dernæst med en SmaI-overskåret, rensat pATH2-ekspressionsvektor. De ligerede vektorer anvendtes til transformations af E.coli stamme HB101 i overensstemmelse med metoderne beskrevet i Aronheim et al, "Characterization of the Binding of  $\alpha$ -Bungarotoxin to Bacterially-Expressed Cholinergic Binding Sites", J.Biol. Chem., 263, 20:9933-9937 (1988).

De transformerede bakterie kloner, der indholdt insertet i den rigtige orientering udvalgte ved  $^{125}$ I-mærket BTX-overlejring af koloni-blots. Disse transformanter viste sig at give et effektivt toxinbindende fusionsprotein (36 kDa betegnet R4137, fig. 2). R4137 kunne beriges i høj grad ved lydbehandling

af de transformerede celler i fosfatpuffer + 500 mM salt. Centrifugering resulterede i en pellet, der indeholdt 40-60% af det totale R4137 og lidt mere (fig. 2, P<sub>1</sub>). Denne pellet kunne ekstraheres med vand til opnåelse af en opløselig fraktion, der hovedsageligt var R4137 (fig. 2, S<sub>2</sub>).

R4137'et i S<sub>2</sub>-fraktionen karakteriseredes biochemisk ved måling af toxinbindingen dertil ifølge metoderne beskrevet i Gershoni et al, "Molecular Decoys: Ligand-Binding Recombinant Proteins Protect Mice from Curarimimetic Neurotoxins", Proc. Natl. Acad. Sci (USA), 85, 4087-4089 (1988). I hovedtræk inkuberedes delmængder af S<sub>2</sub> med <sup>125</sup>I-mærket BTX. Dernæst filtreredes blandingen gennem et ladningsmodificeret membranfilter til adskillelse af det bundne fra det frie toxin. Filterne talttes dernæst for radioaktivitet. Under anvendelse af denne metode viste det sig, at BTX-forenedes med R4137 efter en pseudo-første-ordens kinetik, der nåede en 50% fuldendt reaktion indenfor 40 sek og ca. 90% fuldendt reaktion efter 6 minutter (fig. 3). Målinger af toxinbinding ved ligevægt (30 minutters reaktion) viste, at toxin bandtes til R4138 med en  $K_D=1,2 \times 10^{-7}$  M (fig.4). Denne binding kunne konkurrere med andre cholinerge ligander i en effektivitets rækkefølge, der er lig den, der kendes for den intakte receptor (fig. 5).

Følgelig viser R4137, at den 17. aminosyrers sekvens:  $\alpha$ -184-Trp-Lys-His-Trp-Val-Tyr-Tyr-Thr-Cys-Cys-Pro-Asp-Thr-Pro-Tyr-Leu-Asp-200 er tilstrækkelig til BTX-binding. Skønt denne binding er bemærkelsesværdigt sværere end binding af den intakte receptor, ligner dens bindingsegenskaber, egenskaberne af den fuldstændige  $\alpha$ -underenhed (437 aminosyrer) af AcChoR.

Til fastslåelse af, om R4137 kan anvendes som et middel til behandling af dyr, der har været udsat for et neurotoxin, udførtes et forsøg til undersøgelse om R4137 kan konkurrere med intakt AcChoR om en fælles og begrænset mængde af BTX. For at gøre dette er det ikke alene nødvendigt at skille bundet BTX fra frit BTX, men man må også skelne mellem AcChoR-bundet og R4137-bundet toxin. Hertil bandtes AcChoR først til en concanavalin-A-kolonne. Dette viste sig at have lille eller ingen indflydelse på toxinbindingen (fig. 6A). Dernæst blandedes sådant immobiliseret AcChoR med forskellige koncentrationer af R4137 og konstante mængder af  $^{125}\text{I}$ -mærket BTX. Dernæst vaskedes kolonnerne ved gentagen centrifugering/resuspension, og mængden af radioaktivitet bundet til kolonnen bestemtes. Som det fremgår af fig 6B konkurrerer R4137 effektivt med AcChoR om BTX.

Endelig testede R4137 for kompetitiv binding med AcChorR in vivo. Han- og hunmus (ca. 5 uger, 20-25 g) både indavlede stammer (Balb/C) og udavlede stammer (CD1), blev først injiceret intraperitonealt med R4137 eller et placebo, en lignende fraktion opnået udfra bakterier transformeret med den umodificerede vektor PATH2 (disse celler havde ingen toxinbindende evne). Fem minutter senere fik alle musene indgivet forskellige mængder af d-tubocurarin eller  $\alpha$ -kobratoxin (CTX) til fremkaldelse af en reaktion. Dosen indstilledes til forårsagelse af 80% døde af de ubehandlede mus. Toxinerne administreredes ved subcutan injektion i nakken af dyrene. Dyrene observeredes, og antallet af døde i løbet af to timer efter toxininjektionen registreredes. Resultaterne er vist i Tabel 1. Som vist i fig. 7 var overlevelsesraten af de R4137-behandlede mus bemærkelsesværdig højere end for kontrollen, og det absolutte

13

antal af restituerede mus er mindst 300% bedre end antallet for musene der fik placebo.

Tabel 1

Forsøg	Bakterielt protein (i.p.)	Stamme	Køn	Toxin (s.c.)	Dosis	Antal mus	Antal overlevende mus	
5	1	PATH2	Balb/C	M	Tubo	0.40	10	0
		R4137					10	3
10	2	PATH2	Balb/C	M	Tubo	0.36	10	1
		R4137					10	7
15	3	PATH2	Balb/C	M	Tubo	0.36	25	5
		R4137					25	12
15	4	PATH2	CD1	M	Tubo	0.36	37	10
		R4137					38	21
20	5	PATH2	CD1	F	Tubo	0.29	20	6
		R4137					20	15
20	6	PATH2	CD1	M	CTX	0.15	10	1
		R4137					10	10
20	7	PATH2	CD1	M	CTX	0.15	21	6
		R4137					20	12

15

Yderligere et forsøg udførtes, ved hvilket mus først injiceredes med en lethal dosis af kobratoxin og en time senere fik enten placebo eller det cholinerge decoyant. Dyrene, der modtog placebo døde alle, mens de 5 decoyant-behandlede dyr beskyttedes i opsigtsvækkende grad (90% overlevende). Resultaterne er vist i tabel 2. Det må forstås, at det samme receptorsted er involveret ved BTX, CTX og d-tubocurarin samt ved decamethonium og rabiesvirus.

10

Tabel 2

Materiale injiceret	Tid efter toxin (minutter)	Overlevende
R4137 (decoyant)	30	6/10
	60	9/10
	90	6/7
pATH (placebo)	60	0/10

15

20

Det faktum, at R4137 har vist sig at være en decoyant mod toxin er kun et eksempel på den almene anvendelse af molekulære decoyante som terapeutiske midler. 25 I det særlige tilfælde med AcChoR, kan R4137 eller forbedrede versioner af denne molekulære decoyant tjene som en anti-dot mod kobralignende slangebid ved specifik opfangning af  $\alpha$ -toxinbestanddelen af disse slangegifte. Desuden anvendes d-tubocurarin rutinemæssigt inden for 30 kirurgien som et neuro-muskulært blokerende middel, og en decoyant baseret på R4137 kan være overordentligt nyttig som antidot for dette. Denne anvendelighed er særlig vigtig, idet anvendelsen af ligandanaloge som

beskrevet indenfor den kendte teknik ville være lige så skadelig som de blokerende midler selv. Endvidere er det fornyligt vist, at rabies-virus bindes specifikt til AcChoR, og dets binding er kompetitiv i forhold til d-tubocurarin eller BTX (Lentz et al., Science, 215, 182-184 (1982)). En decoyant baseret på R4137 vil således også give terapeutiske virkninger ved behandling af rabies.

Det må forstås, at R4137 blot er et intermediært værktøj, som ved genmanipulation eller kemisk behandling gør det muligt for fagfolk at konstruere endnu mere effektive, cholinerge decoyanter. Den foreliggende opfindelse omfatter således ikke kun den specifikke 17 aminosyrers sekvens af R4137, men også varianter og derivater deraf, som stadig har, men fortrinsvis er forbedrede med hensyn til deres funktionelle eller farmakologiske egenskaber. Modificerede peptidsekvenser kan f.eks. let fremstilles og testes ved rutinemetoder for foretrukner toxinbindingsegenskaber til opnåelse af mere effektiv kompetitiv virkning i forhold til den naturlige receptor. Sådanne modifikationer kan involvere substitution, deletion eller indføjelser af aminosyrer eller kemisk modifikation af disse. F.eks. kan decoyanter med længere levetid opnås på denne måde. Idet enzymatisk nedbrydning af decoyanter in vivo kan få nogle decoyanter til at blive relativt kortlivede, vil en metode til hindring af en sådan nedbrydning være fremstilling af syntetiske peptider indeholdende d-aminosyrer. På basis af fusionsproteinkopien kan organiske molekyler, dvs. ikke-proteinmaterialer, alternativt konstrueres til tilfredsstillelse af de fysiske-kemiske krav for en decoyant, som skal danne en funktionel grænseflade med toxinet.

Det må videre forstås, at decoyanterne ifølge opfindelsen kan modificeres ved forlængelse af polypeptidet eller ved addition af specifikke kemiske dele, der er bestemt til at lette medikamentudviklingen eller at muliggøre at decoyanterne kan udnyttes til andre formål. En sådan modification ville være at forlænge polypeptidet med dele beregnet til at fremkalde solubilitet, f.eks. ved addition af en hydrofil rest, såsom serin, eller en ladet rest, såsom glutaminsyre. Desuden kunne decoyanten forlænges med henblik på stabilisering og bevarelse af en ønsket conformation, f.eks. ved addition af cysteinrester til dannelse af disulfidbroer.

En anden grund til modifikation af decoyanterne ville være fremstilling af decoyanter, der er detekterbare selv efter administrering. Dette kan gøres ved radioiodering med en radioaktiv iodisotop, direkte eller ved addition af tyrosin til efterfølgende radioiodering. Sådanne detekterbare decoyanter vil kunne anvendes til påvisning af tilstedeværelsen og/eller lokalisering af specificerede patogene komponenter eller toxiner. F.eks. ville påvisning af en akkumulation af R4137 i området omkring et hundebid vise tilstedeværelsen af rabiesvirus. Sådanne detekterbare decoyanter kunne således anvendes til selektiv påvisning og kortlægning af givne fremmede komponenter eller til diagnosticering af invasionen af en sådan komponent.

Yderligere en årsag til modifikation af decoyanter kunne være et ønske om accelereret fjernelse af den konjugerede fremmede komponent fra legemet. En decoyant bundet til en asialoglyco-del må f.eks. forventes at blive udskilt fra leveren. En decoyant, der efterligner receptorstedet for et anti-cancer-kemoterapeutisk middel og indeholder en sådan asialoglyco-del eller en an-

den del, der ville fremme dets udskillelse, vil således f.eks. kunne anvendes til inaktivering og hurtig fjernelse af overskydende kemoterapeutisk middel efter afslutning af terapien til reduktion af dets bivirkninger.

Eftervisning af effektiviteten af R4137 som en decoyant mod toxin in vivo viser funktionsdygtigheden af den almene ide med den foreliggende opfindelse. Følgelig må det forstås, at den foreliggende opfindelse ikke kun omfatter decoyanter baseret på det cholinerge bindingssted, men decoyanter baseret på en vilkårlig, endogen receptor for en fremmed komponent, der kun har en uønsket virkning efter binding til den endogene receptor. Det første krav til en decoyant ifølge den foreliggende opfindelse er, at den virker mimetisk i forhold til den endogene receptor, dvs. den må funktionelt ligne bindingsstedet, skønt den fysisk kan være forskellig derfra. Udtrykket "funktionelt ligne" betyder, at decoyanten bindes til den pågældende fremmede komponent på en selektiv og specifik måde og med rimelig affinitet. I forbindelse med opfindelsen kan receptoren være et vilkårligt ligandbindende molekyle, som f.eks. ligandbindingsstedet af en traditionel celleoverfladereceptor, et enzymssubstratbindingssted, gangliosidersligandbindingssted, osv.

Det må imidlertid forstås, at en decoyant ifølge den foreliggende opfindelse ikke kan være et immunglobulin og heller ikke kan være afledt fra immunglobuliner. Skønt det er rigtigt, at immunglobulin rettet mod "bindingsdomænet" af et patogent i almindelighed vil kunne fungere som et opfangende middel, er et sådant ikke tiltænkt omfattet af den foreliggende opfindelse.

En decoyant ifølge den foreliggende opfindelse må ikke være væsentligt immunogent. Reduktion af størrelsen betyder en reduktion af stoffets immunogenicitet, men ikke alle store molekyler er så immunogene som 5 nogle små molekyler. Til klassifikation som en decoyant ifølge den foreliggende opfindelse må stoffet i det væsentlige være ikke-immunogent i værtssystemet, uanset dets størrelse, skønt den mindst mulige størrelse foretrækkes. Det er imidlertid meget vigtigt, at de- 10 coyanten ikke er tilstrækkelig immunogen til udløsning af en autoimmunreaktion mod den endogene receptor, når den administreres in vivo. For den cholinerge receptors vedkommende vil en sådan autoimmunreaktion kunne fremkalde et tilfælde af myasthenia gravis.

15 En decoyant ifølge den foreliggende opfindelse må omfatte de essentielle elementer af en receptors bindingssted og ikke væsentligt mere. I forbindelse med opfindelsen er de "essentielle elementer" af bindingsstedet defineret som de elementer, der er nødvendige 20 for decoyantaktiviteten, det vil sige ligandgenkendelse og -binding. En receptor består af mange rester, hvoraf kun nogle få er involveret i ligandgenkendelse og -binding. Som diskuteret ovenfor kan decoyanterne ifølge opfindelsen imidlertid modificeres yderligere med 25 henblik på udvikling af medikamenter. Hele  $\alpha$ -underenheden af AcChoR ville således ikke kunne anvendes som en decoyant, idet den er både immunogen og betydelig længere end nødvendigt.  $\alpha$ -Enheden indeholder imidlertid den potentielle information, der er nødven- 30 dig til udvikling og konstruktion af en decoyant, dvs. sekvensen  $\alpha$ -184-200. Det, at nogle yderligere peptidenheder også kan være tilstede, til forbedring af solubiliteten af den essentielle, nødvendige sekvens, vil ik-

ke udelukke strukturen fra decoyantkategorien sålænge den stadig i det væsentlige er ikke-immunogen, og den stadig er selektiv, specifik og har rimelig affinitet. Addition af suktermolekyler kunne være en modifikation  
5 med samme virkning. Additioner til molekylet med henblik på udvikling af medikamenter tages således ikke i betragtning ved bestemmelse af, om stoffet indeholder væsentligt mere end de elementer af den endogene receptor, der er nødvendige til binding af den pågældende  
10 fremmede komponent.

Som angivet tidligere må en decoyant være selektiv, specifik og have rimelig affinitet for komponenten, som den er udviklet til. Mannose, der er en simpel sukkerart, kan således f.eks. interferere med infektion  
15 af bakterier, der har type-I-mannose specifikke pili, men hverken mannoses selektivitet eller affinitet er imidlertid tilstrækkelig.

En decoyant er et medikament udviklet til opfangning af en indtrængende, fremmed komponent med en  
20 uønsket virkning. Sådanne fremmede komponenter kan omfatter toxiner, giftstoffer, bakterier, virus, herunder retrovirus, osv. Sålænge den fremmede komponent kun udøver dens patogene eller toksiske virkning (eller en hvilken som helst anden virkning, som det ønskes at  
25 eliminere) efter binding til et receptorsted et eller andet sted i værten, kan en decoyant konstrueres ifølge den foreliggende opfindelse til hindring af en sådan binding og dermed elimination af en sådan uønsket virkning. Når først fremgangsmåden ifølge den forelig-  
30 gende opfindelse og det faktum, at sådanne receptorfraktioner, der indeholder ligandbindingssteder, stadig bindes kompetitivt til liganderne in vivo, er kendt, vil fagfolk kunne forstå at decoyanter opnået udfra

andre receptorer og konstrueret til binding af andre patogene komponenter og toxiner kan opnås blot ved rutineforsøg.

Blandt de patogent-middel-receptorpar, for hvilke decoyanter let kan opnås i overensstemmelse med den foreliggende opfindelse, er T-celleoverfladeglycoproteinet CD4 (T4), som er den cellulære receptor for human immundeficiensvirus, type 1 (HIV-1), det første medlem af den familie af virus, der fremkalder erhvervet immundeficienssyndrom (AIDS). HIV-virusinfektionen starter via bindingen af virussens kapselprotein (gp120) til T4-receptoren (CD4), der findes på T4-lymfocytterne. Det er fornyligt bekræftet, at opløselige, udskilte former af CD4 kan anvendes kompetitivt til binding af HIV-1 og således neutralisation af infektionsevnen af HIV-1 (Smith et al., "Blocking of HIV-1 Infectivity by a Soluble, Secreted Form of the CD4 Antigen", Science, 238, 1704-1707 (1987)). Intakt CD4 ville i betragtning af dets størrelse ikke være en decoyant ifølge den foreliggende. Det indeholder imidlertid de nødvendige informationer for en decoyant. De minimale bindingsdomæner af CD4 kan identificeres blot ved anvendelse af rutineforsøg ved metoderne beskrevet heri til opnåelse af det minimale bindingsdomæne for den cholinerge receptor, f.eks. ved hjælp af proteolyse og proteinblotting efterfulgt af rekombinant DNA-procedurer.

Et andet ligand-receptorpar, der er særligt egnet til fremstilling af decoyanter ifølge den foreliggende opfindelse, er organophosphat-acetylcholin-esterase. Et sådant molekyllopfangende middel ville lette nogle af virkningerne af en nervegas. Andre eksempler er LSD og serotoninreceptoren og stryknin og glycinreceptoren.

I tabel 3 vises yderligere ligand-receptorpar, for hvilke decoyanter i overensstemmelse med den foreliggende opfindelse kan konstrueres blot ved anvendelse af rutineforsøg:

5

Tabel 3

Ligand	Receptor
10 Calcium	28 kDa af bovin cerebellum og nyre. Calmodulin
Heparin	apoE og apoB af human plasma
Pili af <u>Gonococcus</u>	14 og 16 kDa proteiner af
15 Virus	CHO-celler
Retrovirus type 3	67 kDa glycoprotein af rodente lymfoider og neuronale celler
20 Sendai virus	Human erythrocyt-glycophorin
"Potato spindle tuber"-viroid	Nukleære proteiner

Decoyanterne ifølge opfindelsen kan administreres til et dyr eller et menneske til lindring af de uønskede virkninger af den fremmede komponent, mod hvilken de er udviklet. Sådanne decoyanter kan ikke alene anvendes til behandling af mennesker, men også til behandling af dyr, herunder mammalier, fjerkræ, 30 fisk, osv. Desuden kan decoyanterne ifølge opfindelsen konstrueres til beskyttelse eller behandling af planter. Den specifikke, effektive dosis til behandling mod en vilkårlig given, fremmed komponent kan let bestemmes

empirisk af fagfolk uden urimeligt omfattende eksperimentering. Det vil imidlertid været klart for fagfolk, at dosen af decoyanten vil afhænge i nogen grad af mængden af den fremmede komponent i værtssystemet. Forholdet mellem decoyant og de fremmede molekyler er fortrinsvis i området fra 1:1 til 1:10. Dyreforsøg har vist, at et stort overskud af decoyant ikke er nødvendig for effektivitet. Fortrinsvis vil man måle mængden af den fremmede komponent i blodstrømmen af værten og indstille decoyantdosen efter denne under behandlingsforløbet.

Midler indenfor rammerne af den foreliggende opfindelse omfatter midler, hvori decoyanten er til stede i en mængde, der er effektiv til opfyldelse af det formål, den er beregnet til. Bestemmelse af de effektive mængder er fagmandsviden.

Foruden decoyanterne ifølge den foreliggende opfindelse kan lægemidlerne indeholde passende farmaceutisk acceptable bærere omfattende excipienter og hjælpestoffer, der letter oparbejdning af de aktive forbindelser til præparater, der kan anvendes farmaceutisk. Præparaterne, især præparaterne, der kan administreres ved injektion, indeholder fortrinsvis fra ca. 0,1 til 99%, især fra ca. 25 til 85 vægt% af den aktive bestanddel sammen med excipienten.

En vilkårlig, sædvanlig administreringsvej kan anvendes for decoyanterne ifølge opfindelsen. Skønt den foretrukne administreringsvej er injektion, f.eks. intramuskulær, intradermal, intraperitoneal, osv., kan de også administreres oralt, som suppositorier eller ad en vilkårlig anden vej.

Andre ukonventionelle administreringsmetoder, som kan forudses, er også tiltænkt omfattet af opfin-

delsens rammer. Skønt det foreliggende system til ekspression af den aktive bestanddel i bakterier omfatter den bakterielle ekspressionsvektor pATH2, findes der f.eks. andre bakterielle ekspressionssystemer, i hvilke  
5 det eksprimerede protein faktisk udskilles i mediet. Det kunne forventes, at et sådant udskillende ekspressionssystem kunne anvendes til udvikling af decoyanten inden i værten i stedet for at fremstille det ex vivo og administrere det til værten. Det er indlysende, at  
10 sekretionssystemet må være forligeligt med værten. Udtrykket "administrering" er, som det anvendes i den nærværende beskrivelse og i kravene, tiltænkt at omfatte in vivo-sekretionssystemer.

Lægemidlerne ifølge den foreliggende opfindelse  
15 fremstilles på en måde, der i sig selv er kendt, f.eks. ved hjælp af sædvanlige blande-, opløsnings- eller lyofiliseringsmetoder. Egnede formuleringer til parenteral administrering omfatter vandige opløsninger af de aktive forbindelser i vandopløselig form. Desuden kan sus-  
20 pensioner af de aktive forbindelser som passende olie-suspensionsinjektionspræparater administreres. Passende lipofile opløsningsmidler eller bærere omfatter fedtolier, såsom sesamolie, eller syntetiske fedtsyreester, såsom ethyloleat eller triglycerider. Vandige in-  
25 jektionssuspensionspræparater kan indeholde stoffer, der øger suspensionens viskositet, såsom natriumcarboxymethylcellulose, sorbitol og/eller dextran. Suspensionen kan eventuelt også indeholde stabiliseringsmidler. Decoyanterne ifølge den foreliggende opfindelse  
30 kan også administreres i form af liposomer, lægemidler, hvori den aktive bestanddele foreligger enten dispergeret eller alternativt foreligger i partikler bestående af vandige koncentriske lag hæftet til lipidlag. Den

aktive bestanddel kan være til stede både i det vandige lag og i lipidlaget eller i alle tilfælde i det ikke-homogene system, der i almindelighed kendes som en liposomsuspension.

## P A T E N T K R A V

1. Farmaceutisk præparat til behandling af et dyr eller et menneske, som har været udsat for en fremmed komponent, der kun udøver en uønsket virkning  
5 efter først at være bundet til en endogen receptor, hvilket farmaceutiske præparat omfatter

(A) en mængde, der er effektiv til at lindre de uønskede virkninger af nævnte komponent, af en molekylær decoyant omfattende et stof med en ke-  
10 misk struktur, der funktionelt ligner ligandbindingsstedet på den endogene receptor for den fremmede komponent, og hvor stoffet er valgt blandt:

(1) stoffer, der er en del af en naturlig  
15 receptor for den fremmede komponent, hvilken del er (a) tilstrækkelig lille til ikke at udløse en autoimmunreaktion mod den endogene receptor ved administrering in vivo eller på anden måde mangler væsentlig immu-  
20 genicitet, og (b) ikke er væsentlig større end den mindste størrelse, som er nødvendig for at bevare de elementer af den naturlige receptors bindingssted, som er essentielle  
25 for at bibeholde receptorens evne til selektivt og specifikt at genkende og binde til den fremmede komponent med en affinitet, der tillader konkurrence med binding af den fremmede komponent til den endogene receptor,

30 (2) kemiske sekvenser opnået ud fra (1) ved kemisk syntese eller kombinant DNA-metoder og med den nødvendige funktionelle lighed, og

(3) stoffer fra (1) eller (2), hvortil der er bundet en farmaceutisk acceptabel hjælpedel, der ikke påvirker den funktionelle lighed, og

5 (B) en farmaceutisk acceptabel excipient.

2. Farmaceutisk præparat ifølge krav 1, hvor den endogene receptor er en cholinerg receptor, og at den fremmede komponent er curarimimetisk neurotoxin.

3. Farmaceutisk præparat ifølge krav 1, hvor den  
10 endogene receptor er nikotinacetylcholin-receptoren, og at den fremmede komponent er  $\alpha$ -bungarotoxin, kobratoxin, d-tubocurarin, decamethonium eller rabies-virus.

4. Farmaceutisk præparat ifølge krav 1, hvor den  
15 endogene receptor er T4-celleantigenet af lymfocytter, og at den fremmede komponent er en HIV-virus.

5. Farmaceutisk præparat ifølge krav 1, hvor stoffet er opnået ud fra en naturlig, endogen receptor ved fysisk deling af den endogene receptor til  
20 opnåelse af en del, der er tilstrækkelig lille til ikke at udløse en autoimmunreaktion mod den endogene receptor ved administrering in vivo, eller som i øvrigt er uden væsentlig immunogenicitet, men stadig bevarer de essentielle elementer af receptorens bin-  
25 dingssted.

6. Farmaceutisk præparat ifølge krav 1, hvor stoffet er en peptidkæde, der eksprimeres af celler, der er genetisk manipulerede ved rekombinant DNA-metoder.

30 7. Farmaceutisk præparat ifølge krav 1, hvor stoffet er et syntetisk peptid.

8. Farmaceutisk præparat ifølge krav 2, indeholdende aminosyresekvensen:

Trp-Lys-His-Trp-Val-Tyr-Tyr-Thr-Cys-Cys-Pro-Asp-Thr-  
Pro-Tyr-Leu-Asp

eller en variant deraf, der bevarer egenskaberne til  
5 binding med et curarimimetisk neurotoxin og bindes  
mindst ligeså stærkt som nævnte sekvens til samme  
neurotoxin.

9. Anvendelse til fremstilling af et farmaceu-  
tisk præparat til behandling af et dyr eller menne-  
10 ske, som har været udsat for en fremmed komponent,  
der kun udøver en uønsket virkning efter først at væ-  
re bundet til en endogen receptor af en molekylær de-  
coyant omfattende et stof med en kemisk struktur, der  
funktionelt ligner ligandbindingsstedet på den endo-  
15 gene receptor for den fremmede komponent, hvor stof-  
fet er valgt blandt:

(1) stoffer, der er en del af en naturlig  
receptor for den fremmede komponent, hvil-  
ken del er (a) tilstrækkelig lille til ikke  
20 at udløse en autoimmunreaktion mod den en-  
dogene receptor ved administrering in vivo  
eller på anden måde mangler væsentlig immu-  
genicitet, og (b) ikke er væsentlig større  
end den mindste størrelse, som er nødvendig  
25 for at bevare de elementer af den naturlige  
receptors bindingssted, som er essentielle  
for at bibeholde receptorens evne til se-  
lektivt og specifikt at genkende og binde  
til den fremmede komponent med en affini-  
30 tet, der tillader konkurrence med binding  
af den fremmede komponent til den endogene  
receptor,

(2) kemiske sekvenser opnået ud fra (1) ved

kemisk syntese eller kombinant DNA-metoder og med den nødvendige funktionelle lighed, og

5 (3) stoffer fra (1) eller (2), hvortil der er bundet en farmaceutisk acceptabel hjælpedel, der ikke påvirker den funktionelle lighed.

10 8. 10. Anvendelse ifølge krav 9, hvor stoffet er som defineret i et hvilket som helst af kravene 5 til

11. Anvendelse ifølge krav 9, hvor receptoren er som defineret i et hvilket som helst af kravene 2 til 4.

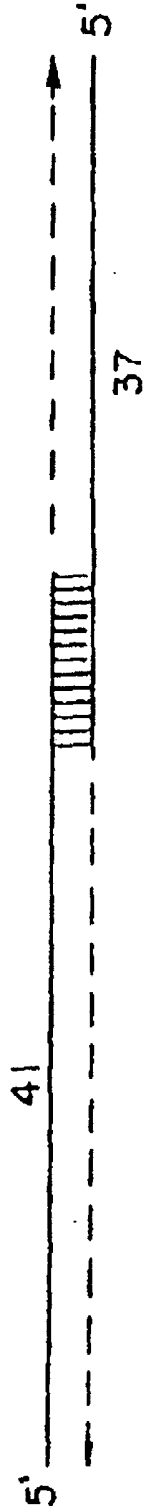
15 12. Anvendelse ifølge krav 9, hvor den fremmede komponent er rabies-virus.

13. Anvendelse ifølge krav 9, hvor den fremmede komponent er HIV-virus.

1) SYNTETISKE OLIGONUCLEOTIDER

41: 3'-GTCCACATCATTGGGTCACAAAGGTCGCCGGAAGCTAGGG-5'  
 37: 3'-GATGTGGACGACGGCCCTGTGAGGCA TGGACCCTGACT-5'

2) Klenow UDFYLDNING



3) INDFØJELSE I SMA-STED AF PATH2:

CFX OVERSKÆRING

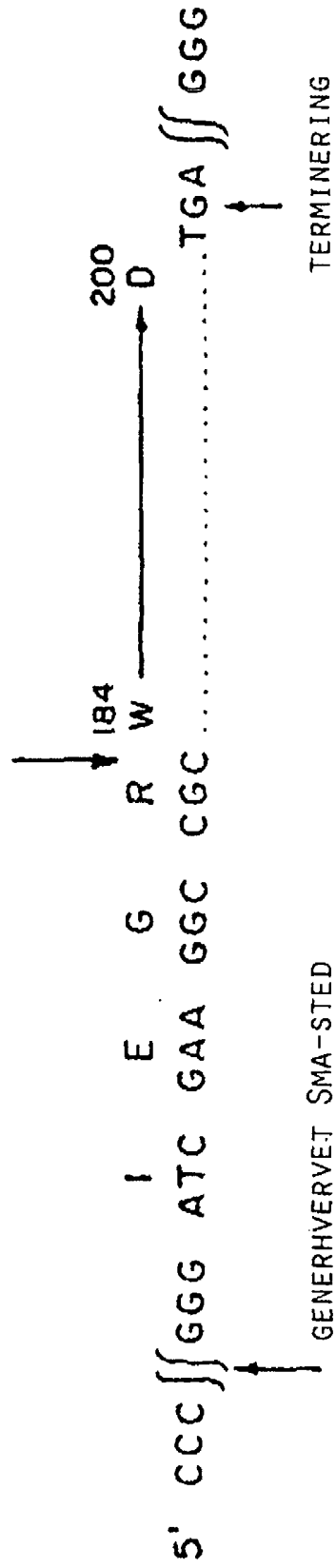


FIG. I

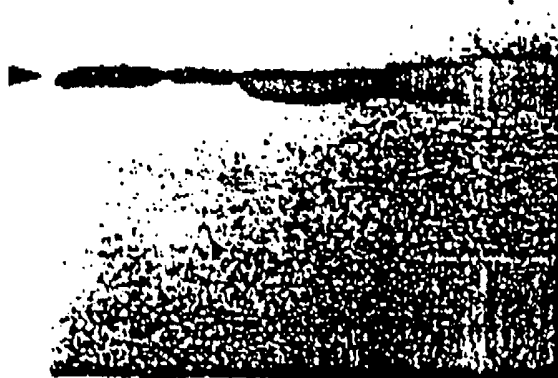
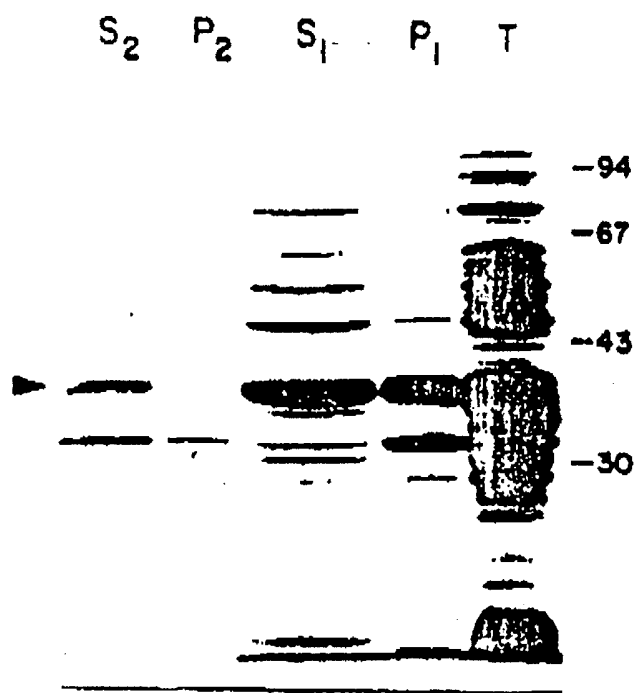


FIG.2

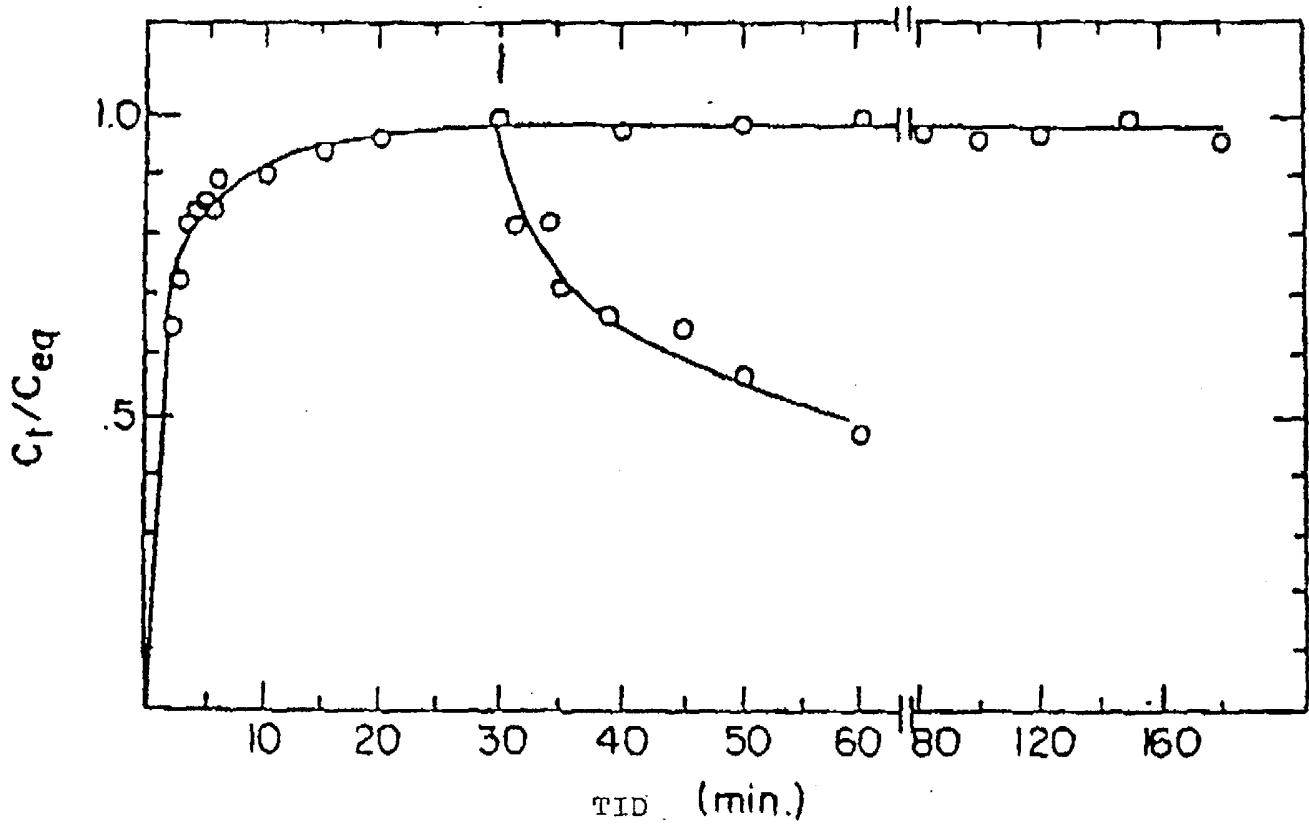


FIG. 3A

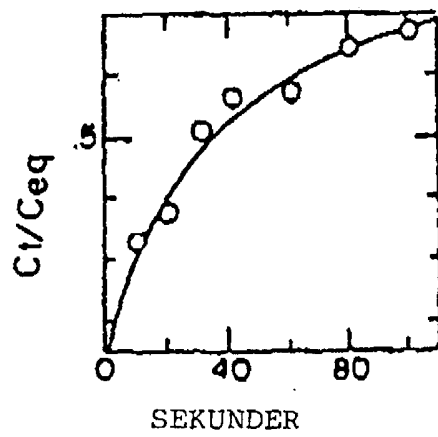


FIG. 3B

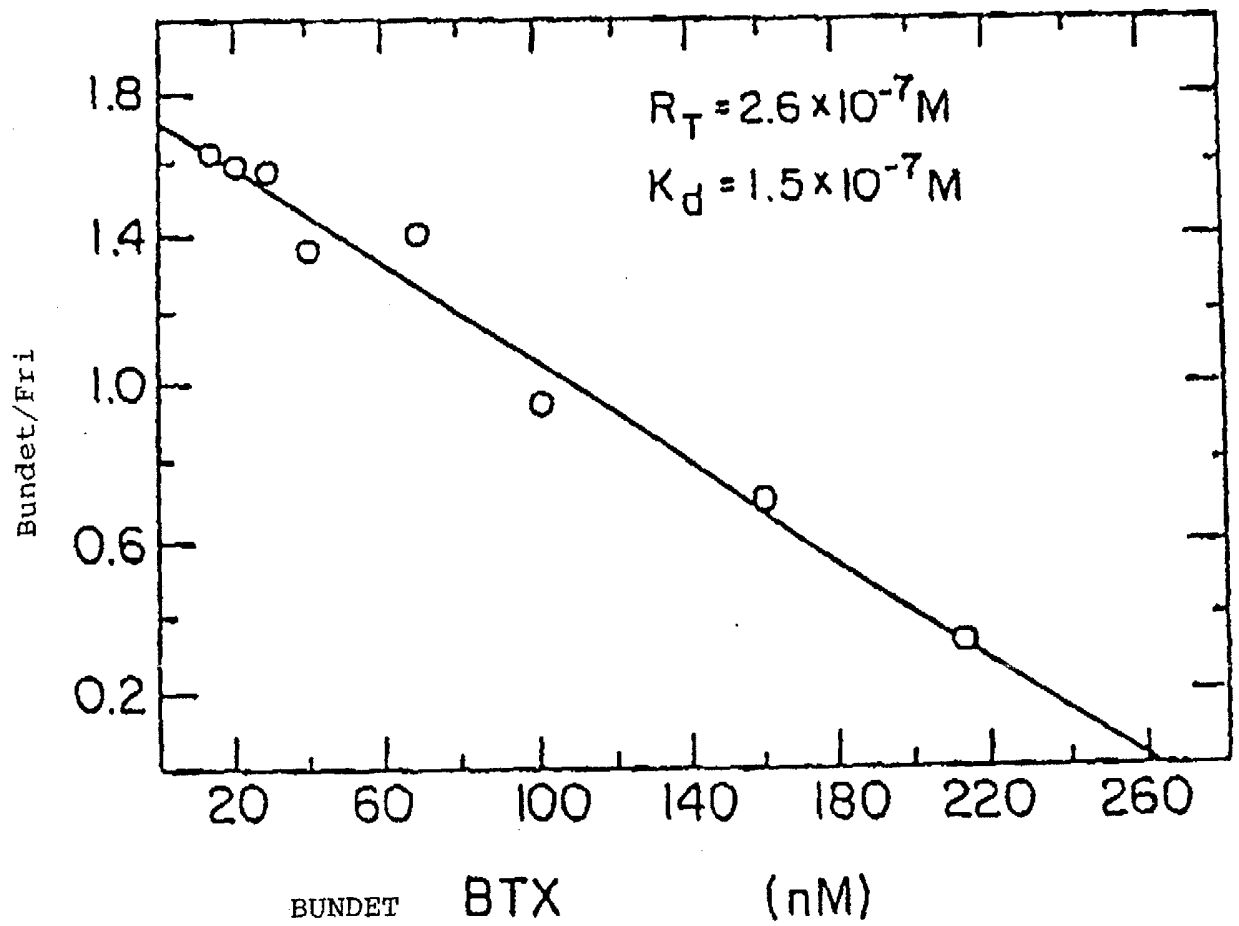


Fig. 4

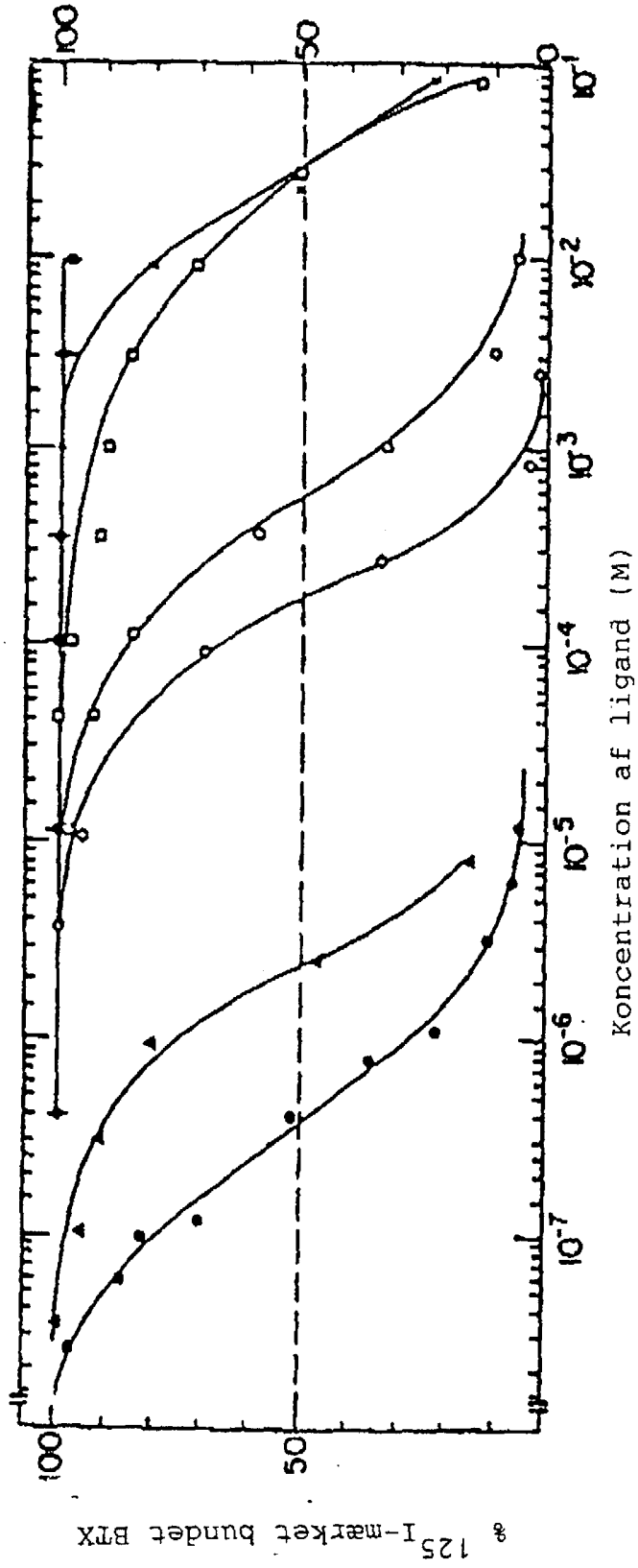


Fig. 5

FIG. 6A

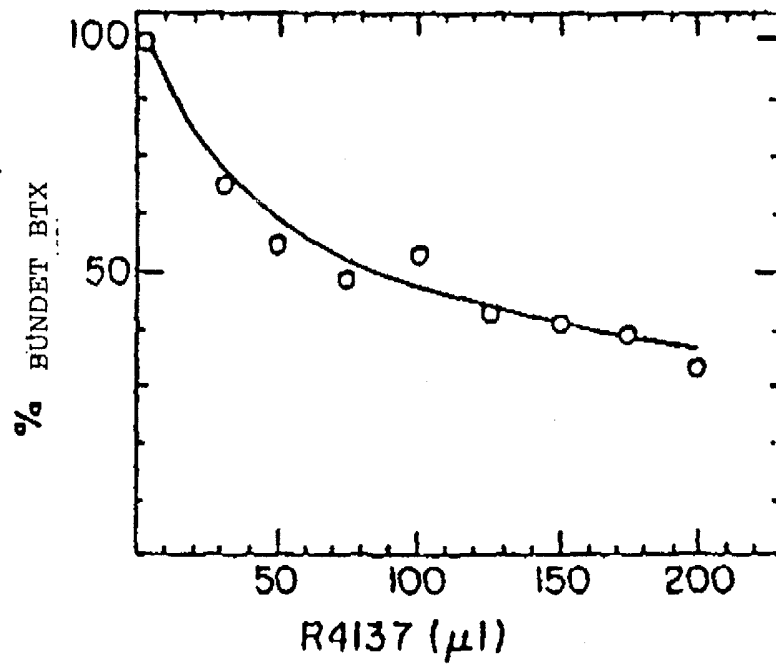
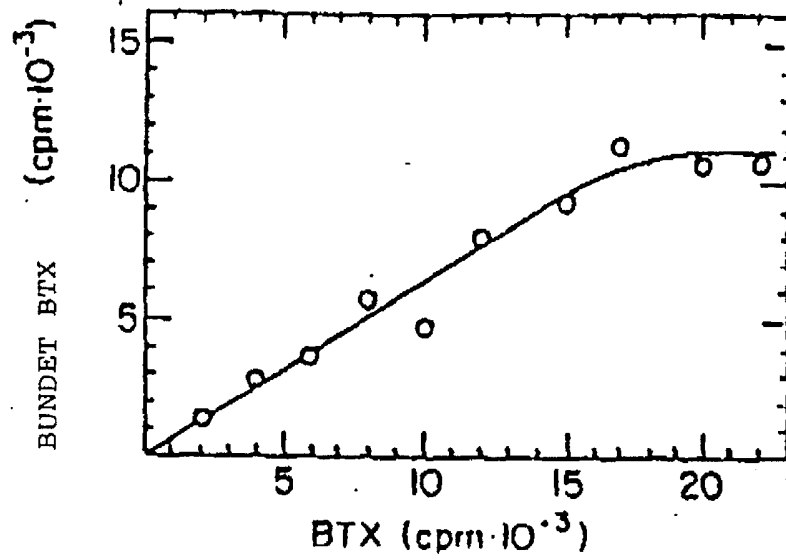


FIG. 6B

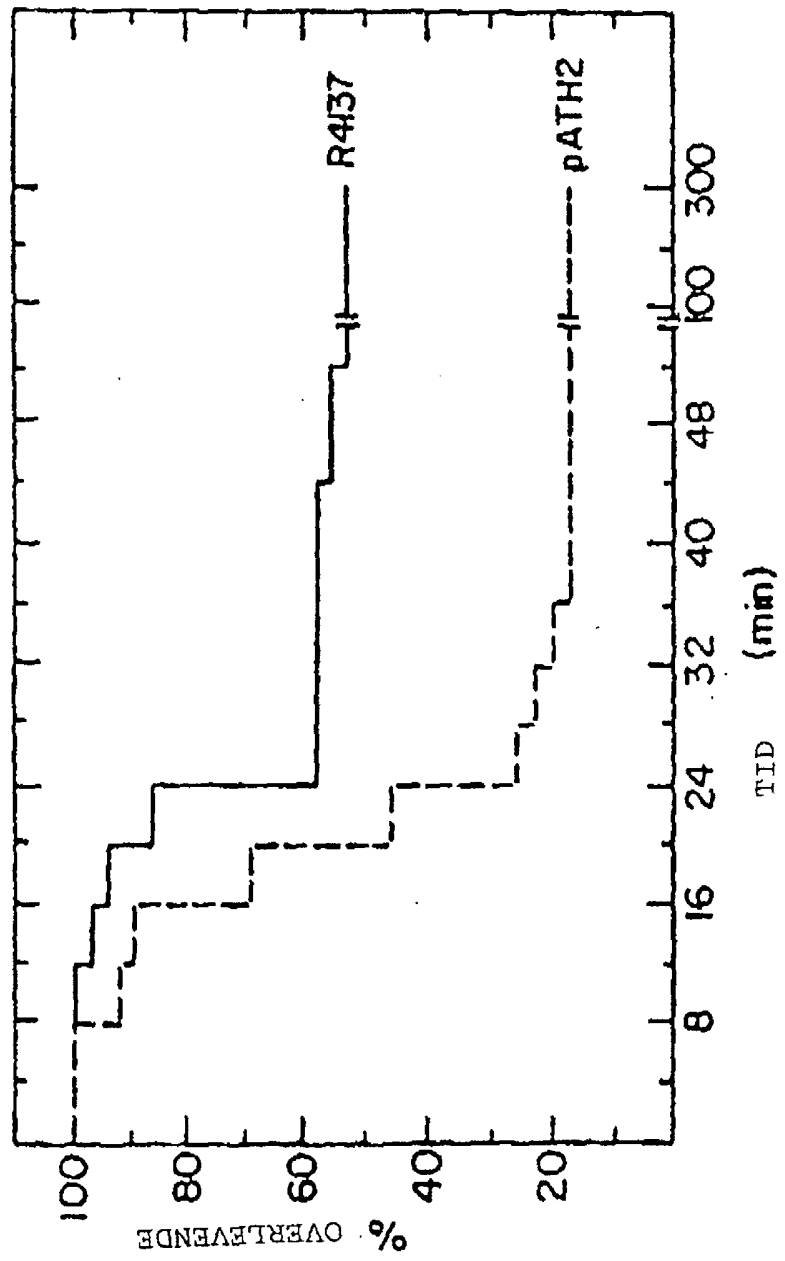


FIG. 7