

**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY**

U7880

A.1

P02 00713

K I V O N A T

Immunoglobulin E nagy affinitású receptorához történő kötődését gátló antitestekkel szembeni anti-idiotípusos antitestek

A találmány rekombináns, monoklonális antitestekre vagy antitest fragmensekre vonatkozik, amelyek anti-idiotípusosak az IgE Cε3 régió nagy affinitású receptorához történő kötődését gátló antitestekre (mimotestek), különösen anti-idiotípusosak a BSW17 antitestre (BSW17-mimotestek), valamint ezek alkalmazására ~~valamint~~ IgE-közvetített betegségek kezelésére szolgáló gyógyszerkészítményekben, előnyösen vakcinákban.

jellemző ábrák: 1-4

FR

73.350/SM

S.B.G. & K.
Nemzetközi
Szabadalmi Iroda
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.
Telefon: 34-24-950, Fax: 34-24-323



P02 00713

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

71

Immunglobulin E nagy affinitású receptorához történő kötődését gátló antitestekkel szembeni anti-idiotípusos antitestek

A találmány tárgya anti-idiotípusos antitestek. Az ilyen antitestek olyan kölcsönhatások gátlására összpontosítanak, amelyek rendes körülmények között egy allergénhez kapcsolt sejthez kötött immunglobulin E (IgE) által indukált hízósejtek és bazofil granulociták ürítését okozzák, amely a hisztamin és más mediátorok felszabadulását, valamint az allergiás és gyulladásos reakciók szabályozásában résztvevő citokinek ismételt szintézisét eredményezi. A találmány olyan anti-idiotípusos antitestekre vagy antitest fragmensekre vonatkozik, amelyek meggátolják az IgE Cε3 régiójának az IgE-t nagy affinitással kötő receptorhoz történő kötődését.

Az IgE-t nagy affinitással kötő receptorral (FcεRI) kölcsönhatásba lépő, az IgE-n elhelyezkedő specifikus kötőhelyekkel kapcsolatos ismeretek biztosítják az alapot az olyan antitestek létrehozásához, amelyek megakadályozzák ezt a kölcsönhatást a kapcsolódó epitópok felismerésének segítségével. Az ilyen antitestek vakcinálással történő indukálása új és általánosan alkalmazható terápiát eredményez az allergia esetében. A találmány különösen olyan rekombináns antitest fragmensek azonosítását és előállítását ismerteti, amelyek vakcina alakjában formulázhatók anti-IgE antitestek létrehozása érdekében, amelyek megvédnek az IgE-közvetített allergiás reakciók kialakulásától.

Az allergiás tünetek a vazoaktív aminok (mediátorok), nevezetesen a hisztamin sejtekből a környező szövetbe és vaszkuláris szerkezeti elemekbe történő felszabadulásával jönnek létre. A hisztamint rendes körülmények között a hízósejtként és a bazofil granulocitaként ismert speciális sejtek tárolják. A hízósejtek az állati szövetekben oszlanak szét, míg a bazofil granulociták az érrendszeren belül keringenek. Ezek a sejtek szintetizálják és tárolják a hisztamint a sejtben belül, mígnem az események speciális sorozata kiváltja azok felszabadulását.

Az IgE antitestek allergiás reakciók közvetítésében játszott szerepe jól ismert. Az IgE a polipeptid láncok komplex elrendeződése, amely csakúgy, mint más immunglobulinok esetében két könnyű- és két nehézláncból áll, amelyeket diszulfid hidak kapcsolnak össze „Y” alakú térszerkezetben. Mindegyik könnyűlánc két doménnel rendelkezik, ahol egy variábilis (V_L) domén kapcsolódik egy viszonylag állandó aminosav szekvenciával rendelkező doménnel, amelyet konstans doménnek (C_L) neveznek. Ezzel ellentétben a nehéz láncok egy variábilis doménnel (V_H) és az IgE esetében négy konstans doménnel (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} , C_{H4} , amelyek $C_{\epsilon 1}$, $C_{\epsilon 2}$, $C_{\epsilon 3}$, $C_{\epsilon 4}$ -ként is ismertek) rendelkeznek. Az antitest két „karja” felelős az antigén kötéséért, amely azokat a régiókat tartalmazza, ahol a polipeptid szerkezet változik, és amelyet Fab' fragmenseknek vagy $F(ab')_2$ -nek neveznek, amely két Fab' kar diszulfid-kötésekkel történő összekapcsolódását jelenti. Az antitest „farka” vagy tengelye változatlan vagy állandó szekvenciájú peptideket tartalmaz és ezt Fc fragmensnek nevezik. Az Fc fragmens olyan interaktív helyeket tartalmaz, amelyek lehetővé



teszik az antitest számára, hogy azok Fc receptoraihoz kötődve az immunrendszer más molekuláival vagy sejtjeivel érintkezzen. Az Fc receptorok olyan molekulák, amelyek specifikusan kötődnek az immunoglobulin Fc régióin belüli aktív molekuláris helyekhez. Az Fc receptorok integrális membránfehérjeként fordulhatnak elő a sejt külső plazmamembránján belül, vagy szabad „oldható” molekulákként fordulhatnak elő, amelyek szabadon keringenek a vérplazmában vagy más testfolyadékokban. Az emberi szervezetben az IgE Fc ϵ RI-hez történő nagy affinitású kötődése egy komplex fehérje-fehérje kölcsönhatás révén valósul meg, amelyben az IgE nehézlánc harmadik konstans régió doménjének (C ϵ 3) különféle részei és az Fc ϵ RI alegység membrán-közeli immunglobulinhoz hasonló doménje (α 2) vesz részt. Jóllehet a kötődéshez fontos Fc ϵ C ϵ α doménjén belüli maradékokat és az Fc ϵ RI α α 2 doménjéhez tartozó régiókat már azonosították, a kötődés folyamatának részletes mechanizmusa még nem ismert. Kísérleti bizonyítékok azt mutatják, hogy a humán IgE egy meghajlított szerkezetet vesz fel, amely hozzájárul az IgE nagy affinitásához az Fc ϵ RI esetében ($K_d \approx 10^{-10}$ M). Azonkívül a hajlított szerkezet is szükséges feltétele az IgE és sejthatár vagy az oldható Fc ϵ RI α közötti ekvimoláris komplexnek, jóllehet az IgE molekulának a két C ϵ 3 doménon azonos epitópokat kell biztosítania a receptorhoz történő kötődéshez. Ez a monovalencia szükséges a működéshez, ha allergén hiányában el akarjuk kerülni a receptor kiválását.

A működésüktől függően az interaktív helyek így már hozzáférhetők az antitestek számára, és ezért képesek a sejtreceptorokhoz kötődni. Másik lehetőségként e helyek rejtve lehetnek,



amíg az antitestek az antigénhez kötődnek, aminek következtében az antitest szerkezetében változás történhet és ezt követően más aktív helyeket is felfed, amelyek ezután specifikus immunaktivitást tudnak kiváltani. A receptorhoz történő kötődés során a konformációs átrendeződésre ható Cε3-at javasolják magyarázatként az Fcε/FcεRI komplex 1:1 arányú sztöchiometriájára a sejtfelszínen.

A mediátorok szervezeten belüli, a hízósejtekből és bazofil granulocitákból származó allergiás (immunológiai) felszabadulása csak a következő körülmények között történhet meg: az IgE molekulának rá kell magát kapcsolnia vagy hozzá kell kötődnie az Fc részével a sejten lévő Fc receptor helyhez, így rögzítve az IgE molekulát a hízósejthez vagy a bazofil granulocitához; a sejthez kötött IgE molekulák Fab' darabjainak keresztkötést kell kialakítania egy konkrét kompatibilis antigénnel (allergén). Ha ilyen kölcsönhatás létrejön, a hízósejt vagy a bazofil granulocita automatikusan megindítja a hisztamin helyi környezetbe történő kiválasztását, a már ismert allergiás tünetek megjelenése mellett (1. ábra). A reakció késői fázisában más biokémiai események következnek, a citokinek és más mediátorok de novo szintézisét és felszabadulását eredményezve.

Az allergia kezelésének hagyományos megközelítései magában foglalják az anti-hisztaminokkal történő rendszeres terápiát vagy a túlérzékenység betegek esetében történő megszüntetésének megkísérlését, illetve az olyan megközelítéseket, amelyek nem fordulnak az alapvető IgE-hízósejt/bazofil granulocita kölcsönhatások irányába. Egy másik megközelítés az IgE antitest sejt-

felszíni Fc receptorokhoz történő kötődését blokkolni képes polipeptid láncok termelésével és az IgE kötési helyekről a már odakötött IgE eltávolításával foglalkozik, és az IgE Fc régióján belüli feltételezett „effektor” hely természetét vizsgálták, amely feltételezhetően egy olyan immunológiai jelet biztosít, ami kiváltja a hízósejtek/bazofil granulociták hisztamin felszabadítását.

A rekombináns IgE fragmensek immunogénként történő alkalmazását az anti-IgE védőoltás létrehozására már kipróbálták és az hatékonynak bizonyult. A legfőbb kifogás az ilyen vakcinával szemben annak a lehetőségnek az eredménye, hogy a nagy IgE fragmensek immunizálásra történő felhasználása a betegekben nem csak a gátló antitestek termelését indíthatja el, hanem kereszt-kötések és ezáltal anafilaxiáért felelős antitestek létrehozását is.

E probléma leküzdésére szolgáló stratégia a lehetséges legkisebb IgE fragmens azonosítására törekszik, amely ideálisan csak a receptor kötési helyből áll, amely a kötődést követően az IgE/IgERI komplexen belül van beágyazódva és ezáltal a továbbiakban nem hozzáférhető a kereszt-kötések kialakításához a vakcinával létrehozott immunválasz által. Habár még végeznek ezzel a stratégiával kísérleteket, ez nem valószínű, hogy sikeres lesz a az IgE/IgERI kölcsönhatásban résztvevő különféle Cε3 régiók térbeli távolságai miatt.

A valóságban a „klasszikus” vakcina megközelítéssel kapcsolatos problémák a rövid mimotóp peptidek aktív immunizálás céljából történő felhasználásával oldhatók meg, amelyek vagy megfe-

lelő hordozóanyagokhoz kapcsolt kémiai úton szintetizált peptidek, vagy például ovalbuminnal vagy IgG-vel közös rekombináns fúziós szerkezetek. Ilyen peptidek a BSW17 monoklonális antitest által felismert epitóp szerkezeti utánzatai, amely antitest az Fc ϵ -n lévő konformációs epitópot ismeri fel, ahol az epitóp részben a C ϵ 3-on belül, részben a C ϵ 4-en belül helyezkedik el. A BSW17-et termelő hibridóma sejtvonalat 1996 december 19-én a mikroorganizmusok letétbe helyezéséről szóló Budapesti Egyezmény előírásai szerint az ECACC-nél 96121916 deponálási szám alatt helyezték letétbe. Ez az antitest érdekes profilú biológiai aktivitást mutat, amelyet a 2. ábrán összegeztünk. Önmagában nem anafilaktogén, és megvédi a humán hízósejteket és bazofil granulocitákat a kiváltó anyagok által előidézett IgE-függő hisztamin-felszabadulástól. Az érrendszerben keringő BSW17 vagy BSW17-hez hasonló antitestek védenek az allergiás reakcióktól, mivel a) gátolják a hízósejtek és bazofil granulociták beindítását az IgE/IgERI kölcsönhatás kompetitív gátlásán keresztül és b) csökkentik a szérum IgE szintet a B-sejtek szintjén történő IgE szintézis leszabályozásán keresztül. Az anti-IgE antitest epitóp szerkezeti utánzataiként a kémiai úton szintetizált BSW17 mimotóp peptidek olyan immunválaszt indukálnak, amely BSW17-hez hasonló antitestek termelését eredményezi a gazdaszervezetben. Mivel a BSW17-ről kimutatták, hogy nem anafilaktogén és gátolja az IgE/IgERI kötődést és a B-sejtek IgE szintézisét, ezért a BSW17 mimotóp peptid alapú vakcinákkal szemben termelt antitestek hasonló védő tulajdonságokkal rendelkeznek. Az ilyen BSW17 mimotóp peptid alapú vakcinák lehetséges

hátránya abból adódhat, hogy a kémiai úton szintetizált peptidekkel szükségképpen összekapcsolt hordozó fehérjék növelik a peptidek immunogén hatását. Továbbá a rövid peptidek szerkezeti rugalmassága lehetővé teszi számukra, hogy számos különböző sztérikus konformációt vegyenek fel. Következésképpen, csak a poliklonális anti-mimotóp immunválasz töredéke lesz terápiásan hatásos a humán IgE-vel ellentétesen reagálva.

A találmány elkerüli a mimotóp peptid megközelítésből adódó lehetséges hátrányokat. A találmány olyan antitesteken vagy antitest fragmenseken alapul, amelyek anti-idiotípusosak az IgE nagy affinitású receptorához történő kötődését gátló antitestekre nézve, különösen a BSW17-re anti-idiotípusos rekombináns antitestek. Jerne-féle hálózatemlélet alapján (Jerne N.: Ann. Immunol. 125C (1974) 373) egy antitest (Ab1) hipervariábilis régiói maguk szolgálhatnak antigénként. Az ilyen módon előállított antitesteket anti-idiotípusos (anti-id) antitestekként (Ab2) ismerik, mivel ezek az antitestek az első antitest idiotípusos régiójához kötődnek (3. ábra). Az ilyen anti-id antitestek az első antitest (Ab1) kötőhelyét (paratóp) ismerik fel és így ezek az eredeti antigén „belső képmását” jelentik. Következésképpen a belső képmás antitestnek vagy Ab2 β -nak nevezett anti-id antitestek (Ab2) is képesek a hipervariábilis régióikon keresztül antitest képződését kiváltani. Ezek az anti-anti-id antitestek (Ab3) szerkezetileg utánozzák az Ab1 paratópot és ezáltal hasonló biológiai tulajdonságokkal rendelkeznek, mint az Ab1 antitest. A hIgE/BSW17 rendszer esetében, az IgE jelenti az eredeti antigént és a BSW17 az Ab1 antitestet. Az anti-BSW17 idiotípusos antitest

Ab2 paratópja következésképpen a BSW17 által felismert hIgE régió (az epitóp) szerkezeti utánzata.

Szerkezetileg az Ab2 paratóp azonos a fent említett kémiai úton szintetizált BSW17 mimotóp peptidekkel. Ha egy ilyen (rekombináns) anti-BSW17 idiotípusos antitestet használunk vakcinaként, akkor BSW17-szerű immunválasz (Ab3) jön létre a beoltott betegben. A BSW17-hez hasonlóan ezek a (poliklonális) Ab3 immunglobulinok meggátolják az IgE és annak nagy affinitású receptora közötti kötődést, ezáltal allergia ellenes szerként képesek működni. A rugalmas szintetikus mimotóp peptidekkel ellentétben az Ab2 paratóp a környezete számára egy szerkezetileg meghatározott konformációban fog megjelenni. Így a meghatározott hIgE epitóppal szemben irányuló immunreakció sokkal specifikusabb lesz. Továbbá, nincs szükség heterogén immunogén hatású hordozó fehérjére. Így elkerülhetők a fehérje hordozó, például a tetanusz toxoid vagy a diftéria toxoid által okozott lehetséges mellékhatások.

A találmány tárgya olyan antitestek vagy antitest fragmensek, amelyek anti-idiotípusosak az olyan antitestekre nézve, mint az E25 (olizumab) vagy a CGP56901 vagy előnyösen a BSW17, amely meggátolja az IgE C ϵ 3 régiójának a nagy affinitású IgE receptorhoz történő kötődését; amelyeket a következőkben röviden csak a „találmány szerinti mimotesteknek” nevezünk. Amennyiben ezek anti-idiotípusosak a BSW17-re nézve, úgy a következőkben ezeket röviden „BSW17-mimotesteknek” nevezzük.

A találmány szerinti mimotestek így olyan anti-idiotípusos antitestek vagy antitest fragmensek, amelyek specifikusan kötőd-

nek egy epitóphoz, amely egy olyan anti-IgE antitest paratópja, amely a nagy affinitású IgE receptorhoz (FcεRI) kötődő IgE molekula Cε3 régióján lévő helyet ismeri fel.

A találmány szerinti mimotestek lényegében humán eredetűek, amennyiben az alkalmazást az emberekben vizsgáljuk. A mimotestek előnyösen rekombinánsak és monoklonálisak. A mimotestek előnyösen olyan antitest fragmensek, amelyek a következőkből állnak vagy azokat tartalmazzák:

- vagy mind a nehéz-, mind a könnyűláncok (például Fab fragmensek), vagy külön a nehéz-, külön a könnyűláncok (például könnyűlánc dimerek), előnyösen azok konstans régió komponens szakaszaival együtt, például a 4. ábrán megadottak szerint (SEQ ID NO (azonosító számú szekvenciák) 35, 36, 37 és 38), minélfogva a „konstans régió” alatt az azt fedő kisebb sztérikus módosulásokat is értjük, ilyenek találhatók például az allotípusos variánsokban, például a konstans részben 1-5-ig terjedő, de normális esetben csak egy aminosav helynél bekövetkezett változások;
- vagy ezek részei, különösen a legalább a specifitást meghatározó részeik, például az 5a-5d ábrákon megadottak (SEQ ID NO 2, 4, 6, 8);
- vagy ezek alrészei, különösen legalább a hipervariábilis alrészeik, például a legalább egy CDR-t tartalmazó aminosavak szakaszaiból összeállított peptidek, amely például az 5a, 5b, 5c vagy 5d ábrák szerinti legalább egy CDR-t, vagy előnyösen két, vagy előnyösebben három CDR-t tartalmaz, adott esetben szomszédos szerkezeti szekvenciákkal együtt, például a CDR

egyik vagy mindegyik végén elhelyezkedő 10 aminosavig terjedő szekvenciákkal.

A találmány szerinti mimotestek izolált és alapjában véve tiszta természetben hozzáférhető anti-id anti-IgE antitestekből származó antitesteket és antitest fragmenseket jelentenek. Előnyösen a mimotestek alapjában véve mentesek más antitestektől. Az „alapjában véve tiszta” kifejezés alatt legalább 60 tömeg %-os, előnyösen 90 tömeg %-os, előnyösebben 99 tömeg % vagy nagyobb tisztaságot értünk.

A találmány tárgya továbbá gyógyszerkészítmények, különösen vakcinák, amelyek a találmány szerinti mimotesteket, vagy önmagában molekulaként, vagy egy immunogén hordozó molekulával kémiai-ailag összekapcsolt fehérje konjugátumként, egy adjuvánssal és további hagyományos kötőanyagokkal együtt tartalmazzák.

A találmány tárgya továbbá a találmány szerinti mimotestek gyógyszerkészítményként, különösen vakcinaként történő alkalmazása, különösen az IgE-közvetített betegségek kezelésében.

A találmány tárgya továbbá az IgE Cε3 régiójának a nagy affinitású IgE receptorhoz történő kötődését gátló antitestek, például a BSW17 alkalmazása a találmány szerinti mimotestek azonosítására hagyományos eljárások alkalmazásával, ilyen például a fág-bemutató technológia (a fág felületén expresszálnak a ki-mutatni kívánt peptidek).

A találmány tárgya továbbá eljárás IgE-közvetített betegségek kezelésére, különösen oltás segítségével, amelyben a találmány szerinti mimotestek terápiásan hatékony mennyiségét adjuk be olyan betegeknek, akiknek az ilyen kezelésre vagy oltásra

szükségük van.

A találmány tárgya továbbá a találmány szerinti mimotestek alkalmazása az IgE-közvetített betegségekkel szembeni gyógyszerek, különösen vakcinák előállítására.

A találmány tárgya továbbá a találmány szerinti mimotestek alkalmazása poliklonális vagy monoklonális antitestek termelésére az azok elleni passzív immunizálás céljából; a találmány szerinti mimotestekkel szembeni poliklonális vagy monoklonális antitestek előállítására passzív immunizálás céljából, vagy a találmány szerinti mimotestek egy megfelelő nem-humán állatba beadva és a vele szemben képződött antitestek izolálásával és tisztításával, vagy hagyományos hibridóma technológiával; és a találmány szerinti mimotestekből bármikor nyerhető poliklonális vagy monoklonális antitestek alkalmazása az IgE-közvetített betegségek kezelésében passzív immunizálás segítségével.

A találmány tárgya továbbá eljárás a találmány szerinti mimotestek azonosítására, amely a következő lépésekből áll:

- azonosítjuk a természetben előforduló anti-idiotípusos anti-IgE antitesteket;
- izoláljuk azok fragmenseit; és
- azok rekombináns fragmenseit szelektáljuk egy megfelelő anti-IgE monoklonális antitest, például a BSW17, kötődésének segítségével, ahol a monoklonális antitest gátolja az IgE Cε3 régiójának a nagy affinitású IgE receptorhoz történő kötődését.

Miután ezeket sikerül izolálni és jellemezni, a találmány szerinti mimotestek hagyományos módszerrel, például rekombináns DNS technológiával vagy kémiai szintézissel állíthatók elő.



A fent említett mimotóp peptidekkel (azaz az IgE-n kiválasztott epitóp) azonos specifitást mutató anti-idiotípusos antitestek azonosítására egy bakteriofág-bemutató könyvtár használható, amely a humán antitest repertoár Fab részét expresszálja. A könyvtárat például humán betegek mandulájából nyert B sejtek készletéből és biológiai kereséshez célanyagként használt immobilizált BSW17 antitestből szerkesztjük. Olyan humán Fab-expresszáló fágreszecskeket izolálunk és dúsítunk, amelyek specifikusan BSW17-et ismernek fel. Így ezek a rekombináns Fab fragmensek a találmány szerinti mimotestek, és anti-idiotípusosnak tekinthetők a BSW17 hipervariábilis régióival szemben. Amennyiben vakcinaként használjuk őket, olyan immunválaszt indukálnak, amely az allergiás betegben BSW17-hez hasonló antitestek termelését eredményezik. Mivel a BSW17 nem anafilaktogén és gátolja az IgE/IgERI kötődést és az IgE szintézist a B-sejtekben, a BSW17 anti-idiotípusos Fab vakcinával szemben a betegben termelt poliklonális antitestek hasonló tulajdonságokkal rendelkeznek. Az immunválasz nagyon specifikus és biztonságos, mivel a „klasszikus vakcina megközelítéssel” ellentétben nincsenek jelen IgE-ből származó fehérje fragmensek, amelyek keresztkötéses antitesteket hozhatnának létre az immunizált betegekben és olyan készítmények tervezhetők, amelyek mentesek a hordozóanyagtól.

Ezek a BSW17-mimotestek rekombináns antitestek vagy antitest fragmensek, amelyek a humán immunoglobulin G-ből származó variábilis doménekből (V-domének) és konstans doménekből (C-domének) állnak. Két különböző, a felszínükön eltérő mimotest

fragmenseket mutató klónt (52 és 43 klónok) azonosítottunk a BSW17 antitestben immobilizált antitest fágkönyvtárak biológiai keresésének segítségével. A humán IgE-n lévő BSW17 epitópot utánzó mimotest szerkezet a V-domének hipervariábilis régióin (CDR) és a szomszédos szerkezeti régiókon (FR) belül helyezkedik el. Az 52-es klón és a 43-as klón nehéz- és könnyűlánc V-doménjeinek cDNS-ét és aminosav szekvenciáját az 5a-5d ábrákon (SEQ ID NO 1-8) mutatjuk be.

Az 52-es klón könnyűlánc szerkezete (L.C.)₂ egy dimer „Fab-szerű” könnyűlánc fragmensből áll. E BSW17-mimotestek teljes szerkezetét mutatjuk be sematikusán a 4A-4C ábrán, amiből ezek konstans régió részeibe bele kell érteni a kisebb sztérikus módosítások lefedéseit is, ilyenek például a fent említett allotípusos variánsok. A klónok mindegyikének teljes nehéz- és könnyűláncainak aminosav szekvenciáját a 12a-12d ábrák mutatják (SEQ ID NO 35-38).

A találmány szerinti mimotestek gyógyászati aktivitással bírnak. Következésképpen e mimotestek alkalmasak gyógyszerkészítményként, például vakcinák esetében antitestekként történő alkalmazásra. Míg a mimotestek alapjában véve képtelenek nem-citolitikus hisztamin-felszabadulást közvetíteni, addig képesek az IgE Fc régiójának aminosav célszekvenciájával erős szerológiai keresztreaktivitással rendelkező antitesteket kiváltani.

A találmány szerinti mimotestek kiindulási dózisa 0,05 mg - 5 mg-ig terjed, előnyösen 1 mg; és például nazálisan, vagy szubkután, vagy intramuszkulárisan adagolhatók, az azonos dózisok ezt követő ismétlésével (fokozatosan), például 14-28 nap el-

teltével. Az alkalmazandó adag a kor és a beteg általános egészségi állapotának mértékétől fog függeni és ezeknek megfelelően lehet beállítani.

A találmány szerinti mimotópokkal végzett közvetlen immunizálást, nevezetesen az aktív immunizálást előnyösen rekombináns peptidek (Fab fragmensek, könnyű- vagy nehézlánc) alkalmazásával hajtjuk végre, amelyek hagyományos módszerek során különféle expressziós gazdarendszerekben, például baktériumokban, gombákban vagy eukarióta sejtekben hozhatók létre.

Előnyös a szabad rekombináns mimotest beadása. Azonban az immunogén immunogenitásának további növelésére is lehetőség van immunogén hordozó kémiai kapcsolásával. Az „immunogén hordozóanyag” kifejezés a leírásban azokat az anyagokat jelenti, amelyek immunogén válasz önálló kifejtésének tulajdonságával rendelkeznek egy gazdaállatban, és amelyek kovalensen kapcsolhatók a polipeptidhez, vagy közvetlenül a peptid kialakulása során, vagy észter kötésekkel a polipeptiden lévő szabad karboxil-amino- vagy hidroxil csoportok és az immunogén hordozóanyag megfelelő csoportjai között, vagy egy hagyományos kétfunkciós összekötő csoporton keresztüli kötődéssel. Ilyen hordozókra példák az állatszérumok albuminjai, az állatszérumok globulinjai, az állati eredetű tiroglobulinok, hemoglobinok, hemocianinok (különösen a Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH)), orsóféregből extrahált fehérjék, például a J. Immun. 111 (1973) 260-268, a J. Immun. 122 (1979) 302-308, a J. Immun. 98 (1967) 893-900 és az Am. J. Physiol. 199 (1960) 575-578 publikációkban ismerttetett orsóféreg extraktumok vagy ezek tisztított termékei; a

polilizin, poliglutaminsav, lizin-glutaminsav kopolimerek, lizint vagy ornitint tartalmazó kopolimerek, stb. Az utóbbi időben a vakcinákat diftéria toxoid, például CRM197 vagy tetanusz toxoid immunogén hordozóanyagok (Lepow. M. L., és mtsai., J. Infectious Diseases 150 (1984) 402-406; és Coen Beuvery E. és mtsai.: Infection and Immunity 40 (1983) 39-45) felhasználásával állítják elő és ezeket a toxoid anyagokat használhatjuk a leírásban is. A kémiai úton méregtelenített diftéria toxinnal ellentétben előnyösen a rekombinánsan mutáns diftéria toxin CRM197-et használjuk. A CRM197-ben a glicin-52 maradékot glutaminsavval cseréljük ki, amely egy nem toxikus terméket eredményez. A CRM197 egy jól jellemzett nem toxikus hordozófehérje és nyilvántartásba vett humán vakcinákban használják. A tuberkulin (PPD) tisztított fehérjeszármazéka is használható az „aktív” immunizálási rendszerben, mivel: (1) magától nem indukál T-sejt választ (azaz valójában egy „T-sejt haptén”), és ráadásul egy teljesen feldolgozott antigénként viselkedik, és ily módon felismerik a T-sejtek; (2) az egyik leghatékonyabb haptén „hordozóként” ismert a kapcsolt felismerési módban; és (3) további vizsgálat nélkül használható emberekben.

A haptén-hordozó kötőanyagokként az antigén készítményekben hagyományosan alkalmazott anyagok alkalmazhatók. A találmány szerinti mimotestek immunogén hordozóanyaghoz történő kovalens kapcsolása hagyományos módszerekkel hajtható végre. Például a közvetlen kovalens kapcsolat céljából lehetőség van a bisz-N-szukcinimidil-származékok, legelőnyösebben a bisz-(szulfoszukcinimidil)-szuberát kapcsolóanyagként történő felhasználásá-

ra, vagy glutáraldehid, vagy karbodiimid, legelőnyösebben a (diciklohexil-karbodiimid vagy az 1-etil-3-(3-dimetil-amino-propil)-karbodiimid felhasználására.

A haptén, haptén-hordozó kötőanyag és hordozó arányai pontosan meghatározhatók, de előnyös, ha a hordozó 1-6-szorosa, előnyösen 1-5-szöröse a haptén tömegének, és a haptén-hordozó kötőanyag 5-10-szerese a haptén moláris ekvivalensének. A fenti kapcsoló reakcióval a hordozó a haptén-hordozó kötőanyagon keresztül a hapténhez kötődik, melynek során a találmány szerinti mimotóp és a hordozó peptid-hordozó komplexéből álló kívánt antigént kapunk.

A reakció befejezése után a kapott immunogén hagyományos módszerekkel, például dialízissel, gélszűréssel vagy frakcionálásos kicsapással izolálható és tisztítható.

A találmány lényegében közvetlen oltás segítségével aktív immunizálásra vonatkozik; azonban a passzív immunizálás is a tárgyát képezi. Ilyen esetben a találmány szerinti mimotesteket egy megfelelő nem humán állatba adjuk be és az ezzel szemben létrehozott antitesteket izoláljuk és tisztítjuk, és ezt követően egy betegnek adjuk be az allergiás tünetek enyhítésének előidézése céljából.

A találmány szerinti mimotestek gyógyszerkészítményként, különösen vakcinaként történő alkalmazásra alkalmasak, főleg az IgE-közvetített betegségek, például az allergia, azon belül is az asztma, atopikus bőrgyulladás, az eozinofil sejtek vérben történő megszorodás allergiás formái, nátha, krónikus csalánkiütés és az élelmiszer-allergia kezelésében.

A „kezelés” kifejezés alatt értjük a megelőző, valamint a gyógyító jellegű kezeléseket. A gazdaszervezet előnyösen az ember, de a találmány a szükséges változtatásokkal lényegében bármely emlősen, például macskán vagy kutyán is alkalmazható.

A következő dokumentumok tartoznak a leírással kapcsolatban a technika állásához:

- D1 Progr. Allergy Clin. Immunol. (Proc. Int. Congress Allergol. Clin. Immunol., 16th) 4 (1997) 339-342;
 D2 Int. Arch. Allergy Immunol. 118 (1999) 119-121;
 D3 Tumor Biology 18 (1997) Suppl. 2, 59;
 D4 Tanox WO 89/06138 számú PCT nemzetközi közzétételi irat;
 D5 JP 11/000174 japán szabadalmi leírás (C.A. 130 (19999) 138296k)

Az ábrák magyarázata:

1. ábra: Az IgE és a nagy affinitású IgE receptor közötti kölcsönhatás.

2. ábra: A monoklonális anti-hIgE antitest BSW17 tulajdonságai.

3. ábra: Az anti-idiotípusos hálózat:

A BSW17 által felismert hIgE epitópot és az anti-idiotípusos paratópot vázlatosan fekete pontokként jelöltük. A fekete körök jelzik a BSW17 (Ab1) homológ hipervariábilis régióit és a poliklonális antitest 3-at (Ab3), amelyeket az anti-idiotípusos antitest Ab2-vel történő immunizálással hoztunk létre.

4. ábra: Három rekombináns BSW17 mimotest szerkezete:

A: Anti-id-BSW17, 52-es klón (SDS426); könnyűlánc: (L.C.)₂ (SEQ

ID NO 36)

B: Anti-id-BSW17, 52-es klón (SDS427); Fab: F_{AB} (SEQ ID NO 35 és 36)

C: Anti-id-BSW17, 43-as klón (SDS463); Fab: F_{AB} (SEQ ID NO 37 és 38).

5. ábra: Az anti-BSW17 Fab klónok: a bakteriofágra-kiterjesztett humán immunglobulin DNS szekvenciája és a származtatott aminosav szekvencia:

A hipervariábilis régiókat (Komplementaritást Meghatározó Régiók; CDR) dőlt betűkkel jelöltük:

5a. ábra: 52-es klón; variábilis nehézlánc (SEQ ID NO 1 és 2) (CDR1: SEQ ID NO 39 és 40; CDR2: SEQ ID NO 41 és 42; CDR3: SEQ ID NO 43 és 44);

5b. ábra: 52-es klón; variábilis könnyűlánc (SEQ ID NO 3 és 4) (CDR1: SEQ ID NO 45 és 46; CDR2: SEQ ID NO 47 és 48; CDR3: SEQ ID NO 49 és 50);

5c. ábra: 43-as klón; variábilis nehézlánc (SEQ ID NO 5 és 6) (CDR1: SEQ ID NO 51 és 52; CDR2: SEQ ID NO 53 és 54; CDR3: SEQ ID NO 55 és 56);

5d. ábra: 43-as klón; variábilis könnyűlánc (SEQ ID NO 7 és 8) (CDR1: SEQ ID NO 57 és 58; CDR2: SEQ ID NO 59 és 60; CDR3: SEQ ID NO 61 és 62).

6. ábra: Az anti-BSW17 rFab és a humán IgE C ϵ 3 doménje közötti aminosav homológia:

A: anti-id Fab, 52-es klón, nehézlánc (hIGE, C ϵ 3: SEQ ID NO 25; 52-es klón: SEQ ID NO 26);

anti-id Fab, 52-es klón, könnyűlánc, sorozat 1 (hIGE, C ϵ 3: SEQ ID NO 27; 52-es klón: SEQ ID NO 28);

anti-id Fab, 52-es klón, könnyűlánc, sorozat 2 (hIGE, Cε3: SEQ ID NO 29; 52-es klón: SEQ ID NO 30);

B: anti-id Fab, 43-as klón, nehézlánc (hIGE, Cε3: SEQ ID NO 31; 43-as klón: SEQ ID NO 32);

anti-id Fab, 43-as klón, könnyűlánc (hIGE, Cε3: SEQ ID NO 33; 43-as klón: SEQ ID NO 34);

Aminosav szekvencia sorrendek: az azonos aminosav-maradékok a fekete dobozokban, a hasonló aminosavak a szürke dobozokban láthatók (Lipman és Pearson). Az Fcε maradékokat a sorozatok felett jeleztük. A rekombináns Fab fragmensek hipervariábilis (CDR) és a szerkezeti régióinak (FR) részei a szekvenciapárok alatt láthatók.

7. ábra: Az anti-id BSW17 rFab kompetitív kötődése a FITC-jelzett BSW17-tel IgE-telített CHOα sejteken.

8. ábra: Az affinitáskromatográfiával tisztított nyúl anti-BSW17 mimotest immunoglobulinok kötődése a humán IgE-n:

A hIgE/anti-mimotest komplexek meghatározása szendvics-ELISA segítségével: hIgE-t és immunoaffinitás alapján tisztított anti-BSW17 mimotest készítményeket ekvimoláris koncentrációban kevertünk össze és ezt 4°C-on éjszakán át inkubáltuk. Az inkubációs keveréket ezt követően mikrotiter lemez lyukakba adagoltuk, amelyeket monoklonális anti-hIgE antitest LE27-tel vontunk be befogó antitestként. A megkötött mimotest IgG-t kecske anti-nyúl IgG-HRP-vel mutattuk ki:

□ = hIgE / SDS410 komplexek;

o = hIgE / SDS411 komplexek.

9. ábra: Anti-BSW17 mimotest immunválasz Balb/c egerekben:



■ = 1. egér; ● = 2. egér; ▼ = 3. egér; ▲ = 4. egér; ◆ = 5. egér

A: anti-id-BSW17.52; könnyűlánc (SDS426);

B: anti-id-BSW17.52; Fab (SDS427);

C: anti-id-BSW17.43; Fab (SDS463);

Az O.D. értékek mutatják az optikai denzitás eredményeit a nem-bevont lyukakhoz történő háttér-kötődésre korrigálva. A párhuzamos mérések átlagértékeit ábrázoltuk. Az eltérés általában 0,05 O.D. értéknél kisebb volt.

10. ábra: A HlgE/FcεRIα kötődésének gátlása immunaaffinitás alapján tisztított anti-mimotest antitestekkel:

A: ■ = BSW17

● = anti-klón 52; könnyűlánc (SDS410)

Δ = anti-klón 52; Fab (SDS411)

▼ = anti-klón 52; könnyűlánc (oszlopon átáramló rész)

B: ■ = BSW17

● = anti-klón 43; Fab (SDS476)

11. ábra: A különféle mimotóp készítményekkel immunizált rhesus majom-csoportok (n=2) PCA-pont profiljai:

A: Immunogén: anti-id-BSW17.52; könnyű lánc (SDS426);

B: Immunogén: anti-id-BSW17.52; Fab (SDS427);

C: Immunogén: anti-id-BSW17.43; Fab (SDS463).

Passzív bőr-anafilaxiás (túlérzékenység) (PCA) reakció rhesus majom bőrén az immunizálás utáni különféle időpontokban. A PCA-pont értékek az injektált IgE (JW8) koncentrációkkal szemben a bőrön lévő kék pontok átmérőinek grafikus ábrázolásával létrehozott görbék (AUC) alatti területből számolt PCA intenzitásokat jelzik. A pontok az azonos mimotóp készítménnyel immunizált két

majom mindegyik csoportjának átlagértékei, amelyet a 4. táblázatban bemutatott egye majmok esetén kapott értékekből számítottunk ki. Az eltéréseket a hibasávok mutatják. A statisztikai p értékeket a hibasávok felett jelöltük. A pótlólagos injekciók időpontjait az x-tengely alatt jelöltük.

12. ábra: A három rekombináns BSW17-minotest nehéz- és könnyűláncának teljes aminosav szekvenciája:

12a. ábra: Anti-id-BSW17, 52-es klón: a nehézlánc variábilis és az első konstans doménjei (SEQ ID NO 35);

12b. ábra: Anti-id-BSW17, 52-es klón: a kappa könnyűlánc variábilis és konstans doménjei (SEQ ID NO 36);

12c. ábra: Anti-id-BSW17, 43-as klón: a nehézlánc variábilis és az első konstans doménjei (SEQ ID NO 37);

12d. ábra: Anti-id-BSW17, 43-as klón: a lambda könnyűlánc variábilis és konstans doménjei (SEQ ID NO 38).

A mimotest (L.C.)₂ 52-es klón a 12b ábra szerinti könnyűláncokat (SEQ ID NO 36) a 4A ábra szerint jelzett diszulfid hidakkal kapcsolatosan tartalmazza.

A mimotest Fab 52-es klón a 12b ábra szerinti könnyűláncot (SEQ ID NO 36) és a 12a ábra szerinti nehézláncot (SEQ ID NO 35) a 4B ábra szerint jelzett diszulfid hidakkal kapcsolatosan tartalmazza.

A mimotest Fab 43-as klón a 12d ábra szerinti könnyűláncot (SEQ ID NO 38) és a 12c ábra szerinti nehézláncot (SEQ ID NO 37) a 4C ábra szerint jelzett diszulfid hidakkal kapcsolatosan tartalmazza.

A következő példák a találmányt kívánják bemutatni és nem

korlátozó jellegűek. A hőmérsékleteket Celsius-fokban adtuk meg.

A leírásban a következő rövidítéseket használjuk:

anti-id = anti-idiotípusos

ABTS = [2,2'-azinodi-(3-etil-benzthiazolin)-szulfonát]

BSA = szarvasmarha szérum albumin

BSW17 = egér monoklonális anti-humán IgE antitest; Cε3 specifikus

CDR = komplementaritást meghatározó régió

Cε3 = az IgE harmadik nehézlánc konstans régió doménje

Cε4 = az IgE negyedik nehézlánc konstans régió doménje

CεE = a BSW17 Cε3 epitóp régióját utánzó mimotóp peptid

CεM = A BSW17 Cε4 epitóp régióját utánzó mimotóp peptid

cfu = telepképződési egység

ELISA = enzimhez kapcsolt immunszorbens kimutatási vizsgálat

Fab = a 2. és 3. nehézlánc konstans régiók nélküli antitest
fragmens

FcεRI; IgERI = nagy affinitású IgE receptor

FcεRIα = nagy affinitású IgE receptor, α lánc

FCS = magzati borjúsérum

FR = szerkezeti régiók

FITC = fluoreszcein izotiocianát-konjugált

HRP = torma-peroxidáz

HSA = humán szérum albumin

(h)IgE = (humán) immunoglobulin E

mAb = monoklonális antitest

MNC = egysejtmagvú (mononukleáris) sejtek

NIP = 3-nitro-4-hidroxijódifenil-ecetsav

p.c. = poliklonális

Phab = fág bemutató Fab fragmensek (Fab-ot expresszáló bakterio-fág)

PBS = foszfáttal pufferolt sóoldat

PCA = passzív bőr-anafilaxis

PWM = fehér zászpa mitogén

r = rekombináns

RT = szobahőmérséklet

SPR = felületi plazmon rezonancia

1. példa: Fág-bemutató könyvtárak összeállítása

a) Limfocita-források

Két felnőtt férfi donort használtunk perifériás vérből származó egysejtmagvas sejtek (MNC) előállítására. Az első felnőtt atopikus férfi donor, aki az allergia klinikai tüneteit mutatta 0,5 ml timsó-adszorbeált tetanusz toxoid (Te Anatoxal Bern, Swiss Serum and Vaccine Institute, Bern, Svájc) intramuszkuláris injekcióját kapta. Az MNC-t 7 nappal később izoláltuk Ficoll gradiens centrifugálást (Lymphoprep, Pharmacia, Milwaukee, WI, USA) alkalmazva, majd 3 napig tenyésztettük olyan RPMI-1640 táptalajon, amely 10^3 U/ml IL-2-t (Sigma, St-Louis, MO, USA), 50 µg/ml Pansorbin sejteket (Staphylococcus aureus Cowan törzs 1, Calbiochem, La Jolla, CA, USA) és tetanusz toxoidot tartalmaz 1:1000 arányban RPMI-1640 táptalajban (Seromed, Basel, Svájc) hígítva. Ezután a sejtekből elkészítettük a teljes RNS-t fenolkloroform guanidium izotiocianát eljárás (Chomczynski, P. és Sacci, N., Anal. Biochem. 162 (1987) 156) segítségével. A máso-

dik felnőtt férfi donor, aki hiperimmunis Rhesus D donor, 2 ml 0 RhD+ vércsoportú ismert férfi donortól származó csomagolt vörösvérsejtek intravénás adagját kapta. Az MNC-t Ficoll gradiens centrifugálás segítségével izoláltuk a beadás után 18 nappal. A sejteket az RNS extrakciót megelőzően először 3 napig tenyésztettük 10^3 U/ml IL-2-t és 10 µg fehér zászpa mitogént (PWM; Sigma L9379, Buchs, Svájc) tartalmazó RPMI-1640 táptalajon.

Emberi mandula mintákat vettünk három mandulaeltávolításon átesett gyerekből. A mandulákat steril petri csészében RPMI-1640 táptalajban maceráltuk, és kis darabokra vágtuk szét. A szövetet, sejteket és táptalajt ezután steril csövekbe tettük át, a szövettörmelékét hagytuk megtelepedni és az MNC-t Ficoll gradiens centrifugálás segítségével a felülúszóból izoláltuk. B-sejteket szelektáltunk az MNC CD19-cel bevont paramágneses gyöngökkel történő inkubálásával, majd RNS-t készítettünk a fent említett fenol-kloroform guanidinium izotiocianát eljárás alapján.

Az összes mimotest láncainak klónozására használható pComb3 vektort a Scripps Research Institute-től (La Jolla, CA, USA, Barbas III, C.F. and Lerner, R.A., Companion Methods Enzymol. 2 (1991) 119) szereztük be. A pComb3 transzformálására használt *Escherichia coli* XL1-Blue törzset és a VCSM13 helper fágot a Stratacyte (La Jolla, CA, USA) cégtől vásároltuk.

b) A bakteriofág könyvtárak összeállítása

Három különálló könyvtárat állítottunk össze: a **BS**-nek nevezett elsőt az első atopkus férfi donorból izolált MNC-ből, az **LD2**-nek nevezett másodikat a második férfi donorból az intravénás beadás után 18 nappal begyűjtött MNC-ből, és a **CT**-nek neve-

zett harmadikat a gyerekektől származó mandulákból izolált B-sejt dúsított MNC populációból. Az e sejtekből készített teljes RNS-t fenol kloroform guanidinium-izotiocianát eljárással készítettük. Ebből az RNS-ből, 10 µg-ot használtunk cDNS készítéséhez oligo(dT) primert (400 ng) alkalmazva és a gyártó (Boehringer Mannheim, Németország) által megadott körülmények szerint M-MuLV reverz transzkriptázzal visszaírtuk RNS-é. A PCR amplifikációt a Vogel, M. és mtsai., E.J. of Immunol. 24 (1994) 1200 publikációban ismertetettek szerint végeztük. Röviden, 100 µl PCR reakcióközeg tartalmaz 10mM MgCl₂-t tartalmazó Perkin-Elmer puffert, 5 µl cDNS-t, a megfelelő 5' és 3' primer mindegyikének 150 ng-ját, 200 µM-t mind a négy dNTP-ből és 2 U/ml Taq Polimerázt (Perkin Elmer, NJ, USA). A Fab molekula nehéz- és könnyűláncának PCR amplifikációját külön-külön végeztük a Stratacyte cégtől származó primerek sorozatával (amelyeknek a részletes listáját később ismertetjük). A nehézlánc esetében 6 darab upstream primert használtunk, hogy a V_H gének hat családjának mindegyikéhez hibridizáljon, míg a könnyűlánc esetében egy kappa és egy lambda lánc primert alkalmaztunk. A downstream primereket úgy terveztük, hogy illeszkedjenek a nehézlánc γ1 és γ3 konstans doménjeinek kapcsolási régiójához. A könnyűlánc esetében a downstream primerek a kappa és lambda konstans domének 3' végével illeszkednek. A nehéz- és könnyűlánc PCR termékeket külön-külön összegyűjtöttük, gélen tisztítottuk, majd XhoI/SpeI és SacI/XbaI restriktációs enzimekkel (Boehringer Mannheim, Németország), külön-külön hasítottuk. Az emésztést követően a PCR termékeket egyszer fenol : kloroform : izoamil-alkohollal extraháltuk, majd gélimésztéssel

tisztítottuk. Az Xho1/Spe1 emésztett Fd fragmens beillesztését és a Sac1/Xba1 emésztett könnyűlánc pComb3 vektorba történő ezt követő ligálását, annak XL1-Blue sejtekbe történő transzformálását és a fágok termelését a Barbas III, C. F. és Lerner, R.A., Companion Methods Enzymol. 2 (1991) 119 publikációban ismertettek szerint végeztük. Az XL1-Blue E. coli sejtek transzformálását követően a mintákat kinyertük és lemezeken titráltuk a könyvtár méretének meghatározása érdekében. Ezek az eredmények 1×10^7 , $7,7 \times 10^6$ és 3×10^6 cfu (telepképző egység) expressziós könyvtárakat mutattak a BS, LD2 és CT esetében, külön-külön.

c) PCR primerek

VHI 5'-CAC TCC CAG GTG CAG CTG CTC GAG TCT GG-3'

(SEQ ID NO 9);

VHII 5'-GTC CTG TCC CAG GTC AAC TTA CTC GAG TCT GG-3'

(SEQ ID NO 10);

VHIII 5'-GTC CAG GTG GAG GTG CAG CTG CTC GAG TCT GG-3'

(SEQ ID NO 11);

VHIV 5'-GTC CTG TCC CAG GTG CAG CTG CTC GAG TCG GG-3'

(SEQ ID NO 12);

VHV 5'-GTC TGT GCC GAG GTG CAG CTG CTC GAG TCT GG-3'

(SEQ ID NO 13);

VHVI 5'-GTC CTG TCA CAG GTA CAG CTG CTC GAG TCA GG-3'

(SEQ ID NO 14);

CHI(γ 1) 5'-AGC ATC ACT AGT ACA AGA TTT GGG CTC-3'

(SEQ ID NO 15);

VL(κ) 5'-GT GCC AGA TGT GAG CTC GTG ATG ACC CAG TCT CCA-3'

(SEQ ID NO 16);

CL(κ) 5'- T CCT TCT AGA TTA CTA ACA CTC TCC CCT GTT GAA GCT

CTT TGT GAC GGG CGA ACT C-3' (SEQ ID NO 17)

VL(λ) 5'- C TGC ACA GGG TCC TGG GCC GAG CTC GTG GTG ACT CA-
3' (SEQ ID NO 18);

CL(λ) 5'- G CAT TCT AGA CTA TTA TGA ACA TTC TGT AGG GGC-3'
(SEQ ID NO 19).

2. példa: A rekombináns BSW17-specifikus antitest fragmensek (BSW17-mimotestek) fágkönyvtárakból történő szelektálása

A BSW17-specifikus fágok szelektálását a keresés négy körben történő végrehajtásával végeztük. Mindegyik kör két anti-IgE mAb Le27-en történő elő-abszorpciót foglalt magában az anti-IgE mAb BSW17-en történő abszorpciót megelőzően. Az elő-abszorpciót a következők szerint végeztük: két immunológiai célokra használt csövet (Maxisorp, Nunc) 4 ml Le27-tel (20 μ g/ml) vontunk be 4°C hőmérsékleten éjszakán át, majd 2 óráig 37°C-on 4 ml PBS/2 % leförlözött tejjel blokkoltuk. Az első csövet egy alul-felül forgó tányéron a fágkönyvtár mindegyikéből (BS, LD2 és CT) 2×10^{12} cfu-t tartalmazó 4 ml blokkoló oldatával inkubáltuk szobahőmérsékleten 30 percig. A fágokat ezután áttettük a második csőbe és a folyamatot egyszer megismételtük. A második elő-abszorpció után a nem-Le27-specifikus fágokat hozzáadtuk a 4 ml BSW17-tel (20 μ g/ml) bevont csőhöz és a fentiek szerint ismertetett PBS/2% leförlözött tejjel blokkoltuk. Az alul-felül forgó tányéron szobahőmérsékleten 2 óráig tartó inkubálás után a csövet egymás után 10-szer mostuk PBS/0,1% Tween oldattal, majd 10-szer PBS-sel. A hozzátapadt fágokat egymás után, először 500 μ l 0,1 M

triethylaminnal mostuk ki, majd háromszor PBS-ben történő öblítés után 500 µl 0,1 M HCl-val 2,2 pH-ra beállított glicinnel mostuk ki, amely 1 mg/ml BSA-t tartalmaz. Minden kimosási lépést 10 percig szobahőmérsékleten végeztünk és a kimosott fágokat 7,4 pH értékű 250 µl 1M Tris.HCl-lel, illetve 30 µl 2M Tris-szel semlegesítettük. A kiválasztott fágokat E. coli XL1-Blue sejtek segítségével amplifikáltuk a Barbas and Lerner, fentiekben, (1991) publikációban ismerttetettek szerint, mielőtt ezt követően a keresés három további körében felhasználtuk volna. A keresés mindegyik köre után a kimosott fágok titerét a cfu meghatározásával követtük nyomon (2. táblázat):

2. táblázat

A BSW17 specifikus Phab-ok dúsítása a keresés egymást követő köreiben

A keresés aktuális köre ^{a)}	Kimosott fágok száma (cfu)
1	3×10^5
2	2×10^4
3	3×10^5
4	5×10^7

^{a)} a keresés mindegyik körében 6×10^{12} fág-részecskét abszorbeáltunk előre kétszer 20 µg/ml Le27-tel bevont csuben az azt követő 20 µg/ml BSW17-tel bevont csőben történő inkubálással.

3. példa: A rekombináns BSW17-mimotestek nukleotid szekvenciája

A szelektált fág klónokból plazmid DNS-t készítettünk Nucleotap kit (Machery-Nagel, Düren, Németország) felhasználásá-

val és nukleinsav szekvenálást végeztünk egy ABI 373A szekvenáló rendszeren PRISM Ready Reactin DyDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Németország) alkalmazásával.

A nehézlánc szekvencia szekvenálásához használt primerek a következők voltak:

CHy1 (5'-CGCTGTGCCCCAGAGGT-3') (SEQ ID NO 20) és

pCH (5'-GGCCGCAAATTCTATTTCAAGG-3') (SEQ ID NO 21).

A könnyűlánc szekvenciák eléréséhez a következő primereket használtuk:

Cλ (5'-GAGACACACCACTGTGGC-3') (SEQ ID NO 22),

Cκ (5'-GAGACACACCACTGTGGC-3') (SEQ ID NO 23) és

pCL (5'-CTAAACTAGCTAGTCGCC-3') (SEQ ID NO 24).

A primereket Microsynth (Balgach, Svájc) segítségével szintetizáltuk. A különféle szelektált fág klónok DNS szekvenciáiból a BSW17-specifikus, rekombináns antitest nehéz- és könnyűláncokra két különböző aminosav szekvenciát vezettünk le (52-es klón, 43-as klón). A szekvenciákat, és a hipervariábilis régiókban (CDR) és a szerkezeti régiókban történő elhelyezkedéseiket az 5a-5d ábrákon mutatjuk be (SEQ ID NO 1-8).

Az 52-es és 43-as klónok által bemutatott BSW17-specifikus rekombináns antitest fragmensek aminosav szekvenciáinak igazodása a humán IgE-hez homológiát mutat a humán Cε3 domén szakaszaival, amelyek a nagy affinitású receptorhoz történő kötődésben vesznek részt (6. ábra) (SEQ ID NO 25-34). Így a rekombináns antitest fragmensek által bemutatott paratópok a humán IgE-ben jelenlévő jól meghatározott szerkezeteket utánozzák („mimotestek”). Az ilyen rekombináns mimotestekkel történő

vakcinálással az allergiás betegekben létrehozott antitestek ezáltal fel fogják ismerni a humán IgE-t és az IgE/IgERI kötődés gátlásával megakadályozzák az allergiás reakciókat.

4. példa: A rekombináns BSW17-mimotestek előállítása és tisztítása

A fág 43-as és 52-es klónokból származó oldható mimotesteket hoztunk létre (5. ábra) (SEQ ID NO 1-8). Azért, hogy oldható Fab fragmenseket termeljünk a fág-részecske pIII farok-fehérjét kódoló gIII szekvenciát eltávolítottuk és egy hexahisztidin véggel helyettesítettük, hogy megkönnyítsük a Fab fragmens Ni^{2+} -kelát affinitás kromatográfia segítségével történő tisztítását.

Fágemid DNS-t készítettünk Nucleotrap kit (Macherey-Nagel, Düren, Németország) segítségével, majd SpeI és NheI enzimekkel emésztettük. A gIII rész nélküli 4,7 kb DNS fragmenst lúgos foszfátazzal kezeltük és agaróz gélelektroforézissel tisztítottuk. A kiegyenesített DNS-t hat hisztidint kódoló DNS fragmenssel ligáltuk az SpeI és NheI restriktációs helyek 5', illetve 3' végein. A ligálás után a DNS-t E. coli XL1-Blue sejtekbe transzformáltuk és az oldható mimotesteket termelő egyedi klónokat szelektáltuk. E klónok egyikét nagymértékű tisztítás céljából választottuk ki és 50 $\mu\text{g/ml}$ karbenicillin-t tartalmazó 1 l SB-oldatban (Super Broth) 37°C-on növesztettük 600 nm-en mért 1,0 optikai denzitás értékig. A kultúrát ezután 1 mM izopropil β -D-tiogalaktopiranoziddal (IPTG) (Biofinex, Praroman, Svájc) indukáltuk és 4 órán át 37°C-on növesztettük. A baktériumokat 20 percig 4°C-on 6000 ford/perces centrifugálással

pelletáltuk, 30 ml szonikáló pufferben (0,1 M NaPO_4 , 8 M karbamid, pH 8,0) szuszpendáltuk és ezt követően jégen szonikáltuk. Az oldhatatlan komponenseket ezután 30 perces 4°C -on és 15000 ford/perces centrifugálással távolítottuk el és a Fab-ot tartalmazó felülúszót egy 1 ml-es nikkel-nitriloacetát oszlopon tisztítottuk. Az oszlopot a szonikáló pufferrel mostuk, hogy eltávolítsuk a szennyeződések, melyet két eluciós lépés követ a szonikáló pufferrel 5,1, illetve 4,9 pH értéken. A frakciókat OD 280 nm-en figyeltük meg és az alikvótokat SDS-PAGE-val (12 %-os nem redukáló gél) vizsgáltuk, hogy igazoljuk a mimotest tisztaságát és azonosságát. A mimotesteket tartalmazó frakciókat ezután összegyűjtöttük, töményítettük és PBS-sel szemben dializáltuk.

A végső mimotest készítmények (A 4. és 12. ábrákon megadottak szerinti) (SEQ ID NO 35, 36, 37, 38) tisztaságát egy minta SDS-PAGE-val történő vizsgálatával értékeltük ki. A fehérje sávokat Coomassie-kék festéssel mutattuk ki. A koncentrációt a Coomassie-kék festett mimotest sáv egy standard fehérje (BSA) ismert mennyiségéhez viszonyítva, valamint spektrofotometrián határoztuk meg. E mimotest készítményeket használtuk ezt követően a kompetitív kötődési vizsgálathoz és nyulak immunizálására.

5. példa: A receptor-kötött IgE BSW-közvetített kiszorításának gátlása rekombináns BSW17-mimotestek segítségével

A BSW17 felismeri és pótolja az IgE kötődést annak nagy affinitású receptorához. Azért, hogy meghatározzuk, hogy az anti-id BSW17 rFab fragmensek képesek gátolni a kiszorítási reakciót,

egy sejtfelszínhez kötött IgE-nek kitett IgERI alkalmazásával kompetitív kötődési vizsgálatot végeztünk. Humán IgERI α -láncát kódoló DNS-sel stabilan transzfektált rekombináns kínai hörcsög petefészek sejtvonalát (CHO) használtuk a vizsgálathoz (CHO α sejtvonal; Blank, U. és mtsai., Eur. J. Biol. Chem. 266 (1991) 2639). Az 5×10^4 CHO α sejteket tartalmazó vizsgálati mintasorozatok FACS pufferben (PBS, 0,3% BSA, 0,02% NaN₃) 48 ng IgE B11 hibridómával (Zürcher, A.W. és mtsai.: Immunol. Lett. 46 (1995) 49-57) 15 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. FACS pufferrel történő egyszeri mosás után minden mintát 15 percig fluoreszcein izotiocianát-konjugált BSW17 (BSW17-FITC) és növekvő mennyiségű anti-id BSW17 rFab-ok előre elkészített komplexeivel inkubáltuk szobahőmérsékleten. A komplexeket a következők szerint készítettük el: 50 μ l 1,3 nM koncentrációjú BSW-FITC-t különböző mennyiségű anti-id-BSW17 rFab-okkal (40 nM; 200 nM; 1 μ M; 4 μ M, és 40 μ M) inkubáltuk 30 percig szobahőmérsékleten. A csak CHO α sejteket tartalmazó kontrol mintát 15 percig BSW17-FITC-vel inkubáltuk szobahőmérsékleten a nem specifikus kötődés meghatározása céljából. A CHO α sejteket egyszer FACS pufferrel mostuk, majd 100 μ l puffer hozzáadása után a sejteket 488 nm-re beállított Argon lézerrel felszerelt FACSCalibur (Becton Dickinson) áramlási citométerben vizsgáltuk. Az előre irányuló fényszóródású/oldalirányú fényszóródású pontfoltban lévő kapukat a monomer sejtek köré állítottuk be, és a fluoreszcenciát mennyiségileg meghatároztuk és átlagos csatorna fluoreszcenciaként (mcf) fejeztük ki. A pozitív sejtek arányát a CHO α sejtekhez kötődő BSW17 százalékaként számoltuk ki. Amint a 7. ábrán látható BSW17

kötődése a CHO α sejtekhez csökkent az anti-id-BSW17 Fab fragmensek növekvő koncentrációja mellett, ami azt jelzi, hogy a két anti-id BSW17 Fab klón képes volt a BSW17 IgE-hez történő kötődését gátolni.

6. példa: Nyulak rekombináns BSW17 mimotestekkel történő immunizálása

Ez a példa azt mutatja be, hogy akár az anti-BSW17 rFab-bal (a 4B ábrán, illetve a 12a és 12b ábrákon bemutatott 52-es klón nehéz- és könnyűláncáiból áll) (SEQ ID NO 35 és 36), akár csak a könnyűláncból álló rekombináns mimotestekkel (a 4A ábra a 12b ábrával együtt) (SEQ ID NO 36) végzett immunizálás olyan humorális immunválaszt indukál a nyulakban, amely a humán IgE-vel keresztreagál. Két új-zélandi fehér nőtény nyúl kapott elsődleges immunizálást szubkután úton 300 μ g/ml Freund-féle teljes adjuvánsban 1:1 arányban emulgeált anti-BSW17 rFab-bal vagy az 52-es klón könnyűlánc fragmensével, majd ezt ezután minden második héten háromszor Freund-féle hiányos adjuvánsban 1:1 arányban emulgeált mimotest azonos mennyiségével egészítettük ki. Szérumokat gyűjtöttünk a 0. napon (vérvétel előtt), majd az állatokat az utolsó injekció után 7 nappal vér vettünk.

A nyúl immunszérumokat a Sepharose 4B oszlopokhoz kémiai úton térhálósított humán IgE-t (SUS-11 IgE) alkalmazva immunafinitás kromatográfiával tisztítottuk. Ezzel az eljárással a teljes immunglobulinból kiizolálható az anti-hIgE frakció, lehetővé téve a terápiásan fontos immunválasz pontos jellemzését az antitest titerekre és affinitásra vonatkozóan.

A humán IgE-vel keresztreagáló anti-mimotest antitestek immunaffinitásos tisztítása két lépésből áll. Az első lépésben az IgG frakciót a nyúl antiszérumból ammónium-szulfátos kicsapással izoláltuk, míg a második lépésben a hIgE-specifikus anti-BSW17 mimotest antitesteket a CH-Sepharose 4B-vel kovalensen összekapcsolt humán IgE-hez (SUS-11 IgE) kötöttünk, amelyet elució, dialízis és töményítés követ.

Az immunaffinitással tisztított immunglobulinok humán IgE-vel oldatban történő koncentráció-függő komplex képződését ELISA-val igazoltuk: A SUS-11 IgE-t az anti-mimotest immunglobulinok ekvimoláris mennyiségeivel inkubáltuk éjszakán át 4°C hőmérsékleten. Az oldatban képződő komplexeket olyan mikrotiter lemez lyukaiba adagoltuk, amelyet befogó antitestként monoklonális anti-hIgE antitest LE27-tel van bevonva. A megkötött anti-mimotest IgG-t poliklonális anti-nyúl IgG-HRP-vel mutattuk ki. Az eredményeket a 8. ábra mutatja.

7. példa: Egerek immunizálása rekombináns BSW17 mimotestekkel

A 43-as és 52-es klónból származó rekombináns mimotestek anti-mimotest antitesteket indukálhatnak. Az immunizálásokat egerekben hajtottuk végre. 5 Balb/c egér csoportjait egerenként 5 µg olyan rekombináns BSW17 mimotesttel oltottuk be szubkután, amelyet E. coli baktériumokban termeltettünk és nikkel affinitás-kromatográfiával tisztítottunk. Alumínium-hidroxidot használtunk adjuvánsként:

Az 1. csoportot egy adag SDS426-tal immunizáltuk, amely az anti-Id-BSW17.52; könnyű láncot jelenti.

A 2. csoportot egy adag SDS427-tel immunizáltuk, amely az anti-id-BSW17.52; Fab-ot jelenti.

A 3. csoportot egy adag SDS463-mal immunizáltuk, amely az anti-Id-BSW17.43; Fab-ot jelenti.

Az elsődleges immunizálás utáni 21. és 41. napon két emlékeztető injekciót adtunk be (5 µg/egér). Vérmintákat vettünk a 0., 20., 28., 35., 42., 49. és 56. napon az elsődleges immunizálás után. A szérumokat elkészítettük és az anti-mimotest antitestek jelenlétére ELISA-val vizsgáltuk.

Mikrotiter lemez lyukakat 1 µg/ml poliklonális humán IgG-vel vontunk be és 1:50 arányban hígított olyan egér szérumokkal inkubáltunk, amelyeket az elsődleges immunizálás után a jelzett időpontoknál vett vérmintákból készítettünk. A megkötött anti-mimotest antitesteket (ahIgG, a humán keretrégió és konstans domén régiókkal szembeni) egy második inkubációval mutattuk ki, amelyet torma-peroxidáz-konjugált kecske anti-egér IgG-vel (gamIgG-HRP) végeztünk. A színreakciót festékképző ABTS szubsztráttal hívtuk elő.

Minden egér termelt anti-mimotest antitesteket az összes rekombináns mimotest készítménnyel történő második kiegészítő injekció után (9. ábra).

8. példa: A rekombináns BSW17 mimotestekkel szemben nyulakban létrehozott immunglobulinok nagy affinitással kötődnek a humán IgE-hez

A rekombináns BSW17 mimotestekkel történő vakcinálásról bemutatjuk, hogy a humán IgE-re vonatkozó nagy affinitású

humorális immunválaszt indukál. Az immunaффinitással tisztított anti-mimotest immunglobulinok humán IgE-hez történő kötődésének jellegzetes kinetikai jellemzőit felületi plazmon-rezonanciával (SPR) vizsgáltuk.

Az SPR méréseket egy BIAcore készülékben (Biacore, Uppsala, Svédország) végeztük. Specifikusan kötődő felületeket készítettünk humán IgE vagy rágcsgáló IgG₃ CM5 szenzor chip-pel történő összekapcsolásával, amihez a gyártó utasításai alapján amin-kapcsolást használtunk. Ezt az eljárást használva biomolekulákat kötöttünk elsődleges amino-csoportokon keresztül a szenzor chip karboximetilezett dextrán felületéhez. 10 pmol humán mielóma IgE-t vagy SUS-11 IgE-t kötöttünk a chip különálló áramlási celláihoz. Rágcsgáló IgG₃ mAb, ABL 364-et (ATCC HB 9324) ugyanannak a szenzor chip-nek a különálló sávjához immobilizáltunk. ABL 364-et használtunk referenciaként az anti-mimotest antitestek nem-hIgE immunglobulin szerkezetekhez történő kötődésének meghatározására és a puffer változások által okozott törésmutató lehetséges változásainak kijavítására. A kapcsolási sűrűség körülbelül 13000 RU volt.

A BIAcore készülékben mért összes biomolekuláris kölcsönhatást 25°C-on végeztük HBS (10 mM Hepes, pH = 7,4, 150 mM NaCl, 3,4 mM EDTA, és 0,005 % v/v P-20 felületaktív anyag) állandó áramlási pufferként történő alkalmazásával. A kinetikus vizsgálat céljából a szenzor chip felületén áthaladó mindegyik vizsgálati anyag koncentráció-tartománya 33 nM-tól 499 nM-ig terjedt. Az áramlási sebesség 5 µl/perc volt. A vizsgálandó anyagot 1200 másodpercig injektáltuk, amelyet a HBS követetett körülbelül

1800 másodpercig a megkötött vizsgálati anyag bomlásának megfigyelése céljából. A chip-et 10 mM HCl 120 másodperces impulzusával regeneráltuk. A nem specifikus kötődést a vizsgálati anyag ABL 364 kontrollsávon áthaladva figyeltük meg, amelyet az előző kinetikai vizsgálat specifikus kötődéséből kell levonni.

Az SPR mérésekkel kapott kötődési görbéket BIAevaluation 3.0 vizsgálati szoftvercsomag felhasználásával értékeltük ki. Az anti-mimotest/IgE kölcsönhatások relatív összehasonlítására egy egyfázisú modellt alkalmaztunk. Mindegyik görbe esetében meghatároztuk az asszociáció mértékének állandóit, k_a , a disszociáció mértékének állandóit, k_d és az egyensúlyi disszociációs állandókat $K_D = 1/K_A$ (K_A = affinitási állandó) és ezeket a 3. táblázatban összegeztük:

3. táblázat

A poliklonális (p.c.) nyúl anti-mimotest Ig készítmények és a hIgE közötti kölcsönhatás kinetikus állandói (SPR / BIAcore)

		Mielóma IgE	SUS-11 IgE
BSW17	K_a (1/Ms)	n.d.	$0,8 \pm 0,3 \times 10^4$
	K_d (1/s)	n.d.	$4,2 \pm 0,9 \times 10^{-6}$
	K_D (nM)	n.d.	$0,53 \pm 0,33$
a(anti-id-BSW17.52; köny- nyűlánc) ¹⁾ (SDS410)	K_a (1/Ms)	$2,1 \pm 0,8 \times 10^4$	$2,2 \pm 0,9 \times 10^4$
	K_d (1/s)	$2,8 \pm 0,5 \times 10^{-4}$	$2,3 \pm 0,2 \times 10^{-4}$
	K_D (nM)	$13,3 \pm 6,8$	$10,7 \pm 3,3$
a(anti-id-BSW17.52; Fab) ²⁾ (SDS411)	K_a (1/Ms)	$4,6 \pm 2,7 \times 10^4$	$2,5 \pm 1,0 \times 10^4$
	K_d (1/s)	$2,3 \pm 0,3 \times 10^{-4}$	$1,5 \pm 0,1 \times 10^{-4}$

	K_D (nM)	5,0±2,2	6,0±1,8
a (anti-id-BSW17.43; Fab) ³⁾ (SDS476)	K_a (1/Ms)	n.d.	2,2±0,4 × 10 ⁴
	K_d (1/s)	n.d.	1,6±0,1 × 10 ⁻⁵
	K_D (nM)	n.d.	0,75±0,02
a = anti-		¹⁾ azaz anti-SDS426	
n.d. = nem határoztuk meg		²⁾ azaz anti-SDS427	
		³⁾ azaz anti-SDS463	

Úgy tűnik, hogy a humán IgE-vel elleni nagy affinitású antitestek indukálhatók a rekombináns BSW17-mimotestekkel immunizált nyulakban (a K_D értékek a nanomoláris tartományban vannak). A 43-as klón eredetű Fab (SDS463; 4C. ábra; anti-id-BSW17.43) rendelkezik olyan kapacitással, amely a humán IgE esetében nagyon nagy affinitású immunválaszt képes indukálni (K_D < 1 nM).

Így a monoklonális anti-idiotípusos antitest használatával lehetőség van egy erős poliklonális válasz indukálására az IgE-vel szemben, amint azt a humán vakcinálási stratégia megkívánja.

9. példa: A rekombináns BSW17-antitestekkel szemben nyulakban létrehozott immunglobulinok gátolják a humán IgE nagy affinitású IgE receptorhoz történő kötődését

Annak vizsgálatára, hogy allergia ellenes vakcinaként aktív-e, az anti-mimotest antitestek és a hIgE közötti komplex képződésétől azt várjuk, hogy megakadályozza az IgE nagy affinitású IgE receptorhoz történő kötődését. A BSW17-mimotest CDR-rel aminosav szekvencia homológiát mutató Val(370)-Asn(383) szakaszban (6. ábra) (SEQ ID NO 25) elhelyezkedő Val(370)-Gly(379) Cε3



epitóp régió vesz részt a nagy affinitású receptor kötődésben. Következésképpen, a rekombináns BSW17 mimotestekkel szemben termelt IgE-specifikus antitestektől azt várjuk, hogy a kötési domén blokkolásával a terápiás hatásukat az IgE nagy affinitású receptorához történő kötődésének gátlásán keresztül fejti ki. Ennek bizonyítására az immunizált nyulakból nyert tisztított anti-mimotest antitesteket a hIgE/Fc ϵ RI α kötődés gátlását vizsgáltuk kompetitív ELISA során. Betegsége vonatkozó eredményként szabad IgE-t mértünk a rekombináns Fc ϵ RI α -hoz történő kötődésének képessége által (RI α -HSA-RI α dupla fúziós fehérje; DFP) (10. ábra).

Előzetesen hIgE-t (SUS-11; 1 μ g/ml a 10A. ábra esetében és 0,1 μ g/ml a 10B. ábra esetében) inkubáltunk 16 órán át 4°C hőmérsékleten referenciaként az anti-mimotest immunglobulinok vagy mAb BSW17 növekvő mennyiségével. Az SDS410 készítmény immunaffinitási oszlopon átfolyó részében jelenlévő immunglobulinok nagyobb része negatív kontrolként szolgált. A képződött komplexeket a mikrotiter lemez lyukaiba adtuk, amelyeket befogó antitestként 1 μ g/ml anti-IgE antitest Le27-tel vontunk be, majd Fc ϵ RI α -HSA-Fc ϵ RI α dupla fúziós fehérjével (DFP) jelzett torma-peroxidázzal inkubáltuk 1 órán át 37°C-on. A megkötött DFP-t festékképző szubsztráttal mutattuk ki. Az O.D. értékeket a kötődés arányában fejeztük ki. A versengő anyag nélküli SUS-11 IgE-hez történő kötődést vettük 100 %-nak. A párhuzamos mérések átlagértékeit mutatjuk be. Az eltérés 2 % alatt volt.

Az eredmények azt mutatják, hogy a BSW17 mimotestekkel végzett immunizálás a specifikus nagy affinitású anti-hIgE antites-

tek képződését eredményezi a rágcsálókban. Ezek az anti-mimotest antitestek in vitro gátolják az IgE nagy affinitású receptorához történő kötődését, ezzel is jelezve a BSW17-mimotest vakcinálási stratégia értékét az allergia ellenes vakcina kifejlesztése számára.

10. példa: A passzív bőr-anafilaxis gátlása a rhesus majmok rekombináns BSW17 mimotestekkel történő vakcinálásával.

A passzív bőr-anafilaxis (PCA) gátlása majmokban az allergia elleni aktivitással rendelkező vegyületek in vivo vizsgálatára használható.

A mimotest vakcinálás az anafilaxiás bőrreakciók gátlását eredményezi a rhesus majmokban. Két majomból álló csoportokat állatonként 500 µg rekombináns anti-BSW17 mimotesttel injektáltunk szubkután. Az elsődleges immunizálás után két kiegészítő injekciót adtunk be. Körülbelül 10 nappal a kiegészítő injekciók után, PCA vizsgálatot végeztünk. A VI 91, VI 92, VI 93 és VI 95 majmokat még egyszer megvizsgáltuk PCA reakcióra az utolsó kiegészítő injekció után három hónappal. Az immunizálási tervet a következő 1. táblázatban összegeztük:

1. táblázat

Majom	Immunogén	Kiegészítő in- jekció (melyik napon)	PCA (melyik na- pon)
VI 91	anti-id-BSW17.52; könnyű- lánc (SDS426) (4A. ábra)	0, 21, 54, 92	0, 30, 61, 105, 203
VI 92	anti-id-BSW17.52; könnyű- lánc (SDS426) (4A. ábra)	0, 21, 54, 92	0, 30, 61, 105, 203
VI 93	anti-id-BSW17.52; Fab (SDS427) (4B. ábra)	0, 21, 54, 92	0, 30, 61, 105, 203
VI 95	anti-id-BSW17.52; Fab (SDS427) (4B. ábra)	0, 21, 54, 92	0, 30, 61, 105, 203
VI 2	anti-id-BSW17.43; Fab (SDS463) (4C. ábra)	0, 21, 54, 112	0, 33, 64, 123
VI 75	anti-id-BSW17.43; Fab (SDS463) (4C. ábra)	0, 21, 54, 112	0, 33, 64, 123

A rhesus majmokat előzetesen ketamin-hidroklorid kis dózisa-
ival (10-15 mg/kg, intramuszkulárisan) (Ketalar®, Parke Davis,
Nagy-Britannia) kezeltük, majd IgE (JW8) (Serotec, Oxford, Egye-
sült Királyság) különféle dózisainak injekcióit i.c. adtuk be a
hasi bőrbe. Az IgE (JW8) egy kiméra antitest, amely a NIP
hapténra specifikus egér antitest-kötő részből és egy humán Fc ϵ -
nehézláncból áll. Az IgE (JW8) növekvő mennyiségeit (0, 2, 10,
50, 250 ng/ml sóoldat) 100 μ l mennyiségben injektáltuk
cefalokaudális sorozatokban egy 30-as tüvel. 2 órával később ál-
latonként 25 mg BSA-hoz konjugált NIP-et adtunk be intravénásan.
A NIP-BSA konjugátummal végzett intravénás immunpróba után az

állatokat újra megnyugtattuk. A bőrreakció láthatóvá tételének érdekében Evans-féle kékfestéket (1%, 0,5 ml/kg) injektáltunk intravénásan közvetlenül az antigén immunpróba után. A bőrreakciókat 20 perccel az antigén injektálása után olvastuk le a kék pontok két átmérőjének lemérésével és átlaguk mm-ben történő kiszámításával.

Az elsődleges immunizálás és a kiegészítések után a jelzett időpontokban PCA-vizsgálatot végeztünk. A PCA intenzitást az injektált IgE (W8) koncentrációkkal szemben kapott kék bőrterületek átmérőinek grafikus ábrázolásával kapott görbék (AUC) alatti területből számoltuk ki. A minden egyes majom esetében a 4. táblázatban bemutatott PCA pontok jelentik a kiszámolt AUC értékeket:

4. táblázat

A BSW17-mimotest vakcinálás hatása a passzív bőr-anafilaxisra
rhesus majmokban

A

Az immunizálás utáni napok száma	PCA pontok			
	Immunogén: anti-id-BSW17.52; könnyűlánc (SDS426) (4A. ábra)		Immunogén: anti-id-BSW17.52; Fab (SDS427) (4B. ábra)	
	VI 91 Majom	VI 92 Majom	VI 93 Majom	VI 95 Majom
0	11,6 ¹⁾ (100) ²⁾	10,6 (100)	15,8 (100)	15,6 (100)
30	10,5 (91)	10,5 (99)	15,4 (97)	16,8 (108)
61	10,1 (87)	1,8 (17)	21,4 (139)	16,5 (106)
105	4,6 (40)	2,1 (20)	5,6 (35)	7,0 (45)
203	9,8 (84)	6,3 (59)	12,6 (80)	11,2 (72)

B

Az immunizálás utáni napok száma	PCA pont	
	Immunogén: anti-id-BSW17.43; Fab (SDS463) (4C. ábra)	
	VI 2 Majom	VI 75 Majom
0	15,8 ¹⁾ (100) ²⁾	15,8 (100)
33	16,5 (104)	18,9 (120)
64	9,8 (62)	13,0 (82)
124	16,8 (106)	18,9 (120)

¹⁾ A PCA pontokat az előzőleg ismertettek szerinti (77) IgE (W8) koncentrációkkal szemben kapott kék bőrterületek átmérőinek grafikus ábrázolásával kapott görbék (AUC) alatti területből számoltuk ki

²⁾ A PCA intenzitás az előimmunizáláshoz tartozó értékekhez viszonyítva. PCA a 0. napon = 100 %.

Az egyéni előimmunizáláshoz tartozó PCA értékeket (0. nap értéke) véve referenciának az összes majom válaszreakciót mutatott a BSW17 mimotest vakcinálásra a PCA intenzitás csökkenésével. A legjobb eredményeket az 52-es klón könnyűlánc összeállítással (SDS426) (4A ábra) kaptuk 60-83 % gátlási aránnyal (40 és 17 PCA pont). Az 52-es klón Fab-bal immunizált majmok (SDS427 tétel) (4B. ábra) a PCA-t 55-65 %-kal szupresszálták (PCA pontok 45 és 35). Valamivel alacsonyabb 18-38 %-os PCA gátlást figyeltünk meg a 43-as klón Fab-bal (SDS463 tétel) (4C. ábra), annak

ellenére, hogy jobbak az 52-es klónnál a BSW17 kötődést és nyulakban a nagy affinitású anti-hIgE indukciót tekintve.

Tovább haladva a vakcinálási protokolban, az 52-es klón mimotestekkel történő vakcinálás a harmadik kiegészítő injekció után vált hatékonyá (kivéve a VI 92 majom esetében) és a részleges PCA szupressziót még 3 hónappal később is megfigyeltük. Ezzel ellentétben a 43-as klón Fab a második kiegészítő injekció után volt hatékony, mivel a harmadik mimotest kezelésnek nem volt hatása.

Az azonos mimotest készítménnyel immunizált két majomból álló mindegyik csoport átlagos PCA pont profilját a 4. táblázatban lévő egyedi majom értékekből számítottuk és a 11. ábrán mutattuk be.

A pozitív PCA eredmény a vakcinált majmokban tisztán mutatja a mimotest vakcinálás hatékonyságát és igazolja a mechanisztikus koncepciójának érvényességét. A rhesus majmok rekombináns BSW17 antitestekkel történő vakcinálása nagy affinitású anti-humán IgE antitestek képződését eredményezi, amelyek gátolják a PCA-t in vivo.



SZEKVENCIA LISTA

<110> Novartis AG
 <120> REKOMBINÁNS ANTI-IDIOTÍPUSOS ANTITESTEK
 <130> A 4-30888 szekvencia lista
 <140>
 <141>
 <150> GB 9908533.4
 <151> 1999-04-14
 <160> 62
 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
 <211> 345
 <212> DNS
 <213> Homo Sapiens
 <400> 1
 caggtgaaac tgctcgagtc ggggggaggc ctggtcaagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag tctctggatt caccttcagt aactctccta tgaactgggt ccgccaggct 120
 ccagggccgg gactagagtg ggtctcatcc attagtagtc gaaattctta catatactac 180
 gcagactcag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccgagag taccttgtat 240
 ctgcaaatgg acaacctggg agtcgaagac acggctgtct atttttgtac gagcggccgc 300
 cttttcgact actggggcca gggaaccctg gtcaccgtct cctct 345

<210> 2
 <211> 115
 <212> Fehérje
 <213> Homo sapiens
 <400> 2
 Gln Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Ser Ser Arg Asn Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Glu Ser Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asp Asn Leu Gly Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Thr Ser Gly Arg Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser
 115

<210> 3
 <211> 315
 <212> DNS
 <213> Homo Sapiens
 <400> 3

47880

```

gtgatgaccc agtctccatc ctcaactgtct gcatctgtag gagacagagt caccatcact 60
tgctgggcta gtcagggcat taacaattat ttagcctggt ttcagcagaa accagggaaa 120
gccctaagt ccctgatcta tagtgcattc attttgcaaa gtgggggtccc atccaagttc 180
agcggcagtg gatctgggac agatttcact ctcacatca gcaacctgca gcctgaagat 240
tttgcaactt attactgcca acaatataat tattatccgc tcactttcgg cggagggacc 300
aaggtggaga tcaaa 315

```

<210> 4

<211> 105

<212> Fehérje

<213> Homo sapiens

<400> 4

```

Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg
 1          5          10          15
Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn Tyr Leu Ala
          20          25          30
Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr Ser
          35          40          45
Ala Ser Ile Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Lys Phe Ser Gly Ser Gly
          50          55          60
Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Leu Gln Pro Glu Asp
 65          70          75          80
Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Tyr Tyr Pro Leu Thr Phe
          85          90          95
Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          100          105

```

<210> 5

<211> 378

<212> DNS

<213> Homo Sapiens

<400> 5

```

caggtgaaac tgctcgagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctgggtg ctccatcagc agtgggtggt actactggac ctggatccgc 120
cagcgccag ggaagggcct ggagtggatt ggatacatct attacagtgg gagcacctcc 180
tacaaccgt ccctcaagag tcgagtcacc atgtcagtg acacgtctaa aaaccagttc 240
tccctgaggc tgacctctgt gactgccgcg gacacggccg tctattactg tgcgcgagag 300
cggggtgaga cgggtctata ttaccctat tactacatag acgtctgggg cacagggacc 360
accgtcacg tctctca 378

```

<210> 6

<211> 126

<212> Fehérje

<213> Homo sapiens

<400> 6

```

Gln Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1          5          10          15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
          20          25          30

Gly Tyr Tyr Trp Thr Trp Ile Arg Gln Arg Pro Gly Lys Gly Leu Glu
          35          40          45
Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser
          50          55          60
Leu Lys Ser Arg Val Thr Met Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65          70          75          80

```



Ser Leu Arg Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Glu Arg Gly Glu Thr Gly Leu Tyr Tyr Pro Tyr Tyr Tyr
 100 105 110
 Ile Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 7

<211> 342

<212> DNS

<213> Homo Sapiens

<400> 7

gagctcgtgg tgactcagcc tgcctccgtg tctgggtctc ctggacagtc gatcaccatc 60
 tctgcactg gaaccagaag tgacgttggt gggtataact atgtctcctg gtaccaacaa 120
 caccaggca aagccccaa actcatgatt tatgatgtca gtaatcggcc ctcagggggt 180
 tctaactcgt tctctggctc caagtctggc aacacggcct ccctgaccat ctctgggctc 240
 caggctgagg acgaggctga ttattactgc agtcatata caagcagcag cactctcggg 300
 gtgttcggcg gagggaccaa gttgaccgtc ctaggtcagc cc 342

<210> 8

<211> 114

<212> Fehérje

<213> Homo sapiens

<400> 8

Glu Leu Val Val Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Arg Ser Asp Val Gly Gly Tyr
 20 25 30
 Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45
 Met Ile Tyr Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80
 Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Ser
 85 90 95
 Ser Thr Leu Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110
 Gln Pro

<210> 9

<211> 29

<212> DNS

<213> Homo Sapiens

<400> 9

cactcccagg tgcagctgct cgagtctgg

29

<210> 10

<211> 32

<212> DNS

<213> Homo Sapiens

<400> 10

gtcctgtccc aggtcaactt actcgagtct gg

32



<210> 11
 <211> 32
 <212> DNS
 <213> Homo Sapiens
 <400> 11
 gtccaggtgg aggtgcagct gctcgagtct gg 32

<210> 12
 <211> 32
 <212> DNS
 <213> Homo Sapiens
 <400> 12
 gtctgtccc aggtgcagct gctcgagtcg gg 32

<210> 13
 <211> 32
 <212> DNS
 <213> Homo Sapiens
 <400> 13
 gtctgtgccg aggtgcagct gctcgagtct gg 32

<210> 14
 <211> 32
 <212> DNS
 <213> Homo Sapiens
 <400> 14
 gtctgtcac aggtacagct gctcgagtca gg 32

<210> 15
 <211> 27
 <212> DNS
 <213> Homo Sapiens
 <400> 15
 agcatcacta gtacaagatt tgggctc 27

<210> 16
 <211> 35
 <212> DNS
 <213> Homo Sapiens
 <400> 16
 gtgccagatg tgagctcgtg atgacccagt ctcca 35

<210> 17
 <211> 56
 <212> DNS
 <213> Homo Sapiens
 <400> 17
 tccttctaga ttactaacac tctcccctgt tgaagctctt tgtgacgggc gaactc 56

<210> 18
 <211> 36
 <212> DNS
 <213> Homo Sapiens
 <400> 18
 ctgcacaggg tcctggggccg agctcgtggt gactca 36

```

<210> 19
<211> 34
<212> DNS
<213> Homo Sapiens
<400> 19
gcattctaga ctattatgaa cattctgtag gggc 34

<210> 20
<211> 18
<212> DNS
<213> Homo Sapiens
<400> 20
cgctgtgccc ccagaggt 18

<210> 21
<211> 22
<212> DNS
<213> Homo Sapiens
<400> 21
ggccgcaaatt tctatttcaa gg 22

<210> 22
<211> 18
<212> DNS
<213> Homo Sapiens
<400> 22
gagacacacc agtgtggc 18

<210> 23
<211> 18
<212> DNS
<213> Homo Sapiens
<400> 23
cacaacagag gcagttcc 18

<210> 24
<211> 18
<212> DNS
<213> Homo Sapiens
<400> 24
ctaaactagc tagtcgcc 18

<210> 25
<211> 14
<212> Fehérje
<213> Homo sapiens
<400> 25
Val Asn Leu Thr Trp Ser Arg Ala Ser Gly Lys Pro Val Asn
  1             5             10

<210> 26
<211> 15
<212> Fehérje
<213> Homo sapiens
<400> 26

```

Tyr Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 1 5 10 15

<210> 27

<211> 16

<212> Fehérje

<213> Homo sapiens

<400> 27

Pro Ser Pro Phe Asp Leu Phe Ile Arg Lys Ser Pro Thr Ile Thr Cys
 1 5 10 15

<210> 28

<211> 16

<212> Fehérje

<213> Homo sapiens

<400> 28

Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 1 5 10 15

<210> 29

<211> 10

<212> Fehérje

<213> Homo sapiens

<400> 29

Val Asn Leu Thr Trp Ser Arg Ala Ser Gly
 1 5 10

<210> 30

<211> 10

<212> Fehérje

<213> Homo sapiens

<400> 30

Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly
 1 5 10

<210> 31

<211> 29

<212> Fehérje

<213> Homo sapiens

<400> 31

Thr Ile Thr Cys Leu Val Val Asp Leu Ala Pro Ser Lys Gly Thr Val
 1 5 10 15

Asn Leu Thr Trp Ser Arg Ala Ser Gly Lys Pro Val Asn
 20 25

<210> 32

<211> 30

<212> Fehérje

<213> Homo sapiens

<400> 32

Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly Gly Tyr
 1 5 10 15

Tyr Trp Thr Trp Ile Arg Gln Arg Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 20 25 30



<210> 33
 <211> 25
 <212> Fehérje
 <213> Homo sapiens
 <400> 33
 Gly Thr Arg Asp Trp Ile Glu Gly Glu Thr Tyr Gln Cys Arg Val Thr
 1 5 10 15
 His Pro His Leu Pro Arg Ala Leu Met
 20 25

<210> 34
 <211> 26
 <212> Fehérje
 <213> Homo sapiens
 <400> 34
 Gly Thr Arg Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln
 1 5 10 15
 Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Met
 20 25

<210> 35
 <211> 218
 <212> Fehérje
 <213> Homo sapiens
 <400> 35
 Gln Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Ser Ser Arg Asn Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Glu Ser Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asp Asn Leu Gly Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Thr Ser Gly Arg Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 115 120 125
 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140
 Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160
 Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 165 170 175
 Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 180 185 190
 Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 195 200 205
 Val Asp Lys Lys Ala Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215

<210> 36

<211> 211

<212> Fehérje

<213> Homo sapiens

<400> 36

```

Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg
1          5          10          15
Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn Tyr Leu Ala
          20          25          30
Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr Ser
          35          40          45
Ala Ser Ile Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Lys Phe Ser Gly Ser Gly
          50          55          60
Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Leu Gln Pro Glu Asp
          65          70          75          80
Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Tyr Tyr Pro Leu Thr Phe
          85          90          95
Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys thr Val Ala Ala pro Ser Val
          100          105          110
Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
          115          120          125
Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln
          130          135          140
Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val
145          150          155          160
Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu
          165          170          175
Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
          180          185          190
Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ile Phe Asn Arg
          195          200          205
Gly Glu Cys
          210

```

<210> 37

<211> 229

<212> Fehérje

<213> Homo sapiens

<400> 37

```

Gln Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1          5          10          15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
          20          25          30
Gly Tyr Tyr Thr Trp Trp Ile Arg Gln Arg Pro Gly Lys Gly Leu Glu
          35          40          45
Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser
          50          55          60
Leu Lys Ser Arg Val Thr Met Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
          65          70          75          80
Ser Leu Arg Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
          85          90          95
Cys Ala Arg Glu Arg Gly Glu Thr Gly Leu Tyr Tyr Pro Tyr Tyr Tyr
          100          105          110
Ile Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

```

		115					120					125					
Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr		
	130					135					140						
Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro		
145					150					155					160		
Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val		
				165					170					175			
His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser		
			180					185					190				
Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile		
	195					200						205					
Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Ala		
	210					215					220						
Glu	Pro	Lys	Ser	Cys													
225																	

<210> 38

<211> 219

<212> Fehérje

<213> Homo sapiens

<400> 38

Glu	Leu	Val	Val	Thr	Gln	Pro	Ala	Ser	Val	Ser	Gly	Ser	Pro	Gly	Gln		
1				5				10					15				
Ser	Ile	Thr	Ile	Ser	Cys	Thr	Gly	Thr	Arg	Ser	Asp	Val	Gly	Gly	Tyr		
			20					25				30					
Asn	Tyr	Val	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	His	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu		
		35				40						45					
Met	Ile	Tyr	Asp	Val	Ser	Asn	Arg	Pro	Ser	Gly	Val	Ser	Asn	Arg	Phe		
	50					55					60						
Ser	Gly	Ser	Lys	Ser	Gly	Asn	Thr	Ala	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Gly	Leu		
65					70					75					80		
Gln	Ala	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Ser	Ser	Tyr	Thr	Ser	Ser		
			85					90					95				
Ser	Thr	Leu	Gly	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Gly		
		100					105						110				
Gln	Pro	Gln	Pro	Lys	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Thr	Leu	Phe	Pro	Pro	Ser		
	115					120						125					
Ser	Glu	Glu	Leu	Gln	Ala	Asn	Lys	Ala	Thr	Leu	Val	Cys	Leu	Ile	Ser		
	130				135						140						
Asp	Phe	Tyr	Pro	Gly	Ala	Val	Thr	Val	Ala	Trp	Lys	Ala	Asp	Ser	Ser		
145					150					155					160		
Pro	Val	Lys	Ala	Gly	Val	Glu	Thr	Thr	Thr	Pro	Ser	Lys	Gln	Ser	Asn		
			165					170					175				
Asn	Lys	Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Tyr	Leu	Ser	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Trp		
			180					185					190				
Lys	Ser	His	Lys	Ser	Tyr	Ser	Cys	Gln	Val	Thr	His	Glu	Gly	Ser	Thr		
	195					200						205					
Val	Glu	Lys	Thr	Val	Ala	Pro	Thr	Glu	Cys	Ser							
	210					215											

<210> 39

<211> 15

<212> DNS

<213> Homo Sapiens

<400> 39
aactataata tgaac 15

<210> 40
<211> 5
<212> Fehérje
<213> Homo sapiens
<400> 40
Asn Tyr Asn Met Asn
1 5

<210> 41
<211> 51
<212> DNS
<213> Homo Sapiens
<400> 41
tccattagta gtcgaaattc ttacatatac tacgcagact cagtgaaggg c 51

<210> 42
<211> 17
<212> Fehérje
<213> Homo sapiens
<400> 42
Ser Ile Ser Ser Arg Asn Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 43
<211> 18
<212> DNS
<213> Homo Sapiens
<400> 48
ggccgccttt tcgactac 18

<210> 44
<211> 6
<212> Fehérje
<213> Homo sapiens
<400> 44
Gly Arg Leu Phe Asp Tyr
1 5

<210> 45
<211> 33
<212> DNS
<213> Homo Sapiens
<400> 45
cgggctagtc agggcattaa caattattta gcc 33

<210> 46
<211> 11
<212> Fehérje
<213> Homo sapiens
<400> 46

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 47

<211> 21

<212> DNS

<213> Homo Sapiens

<400> 47

agtgcaccca ttttgcaaag t

21

<210> 48

<211> 7

<212> Fehérje

<213> Homo sapiens

<400> 48

Ser Ala Ser Ile Leu Gln Ser

1 5

<210> 49

<211> 27

<212> DNS

<213> Homo Sapiens

<400> 49

caacaatata attattatcc gctcact

27

<210> 50

<211> 9

<212> Fehérje

<213> Homo sapiens

<400> 50

Gln Gln Tyr Asn Tyr Tyr Pro Leu Thr

1 5

<210> 51

<211> 24

<212> DNS

<213> Homo Sapiens

<400> 51

agcagtgggtg gttactactg gacc

24

<210> 52

<211> 8

<212> Fehérje

<213> Homo sapiens

<400> 52

Ser Ser Gly Gly Tyr Tyr Trp Thr

1 5

<210> 53

<211> 51

<212> DNS

<213> Homo Sapiens

<400> 53

ggatacatct attacagtgg gagcacctcc tacaacccgt ccctcaagag t

51

<210> 54
 <211> 17
 <212> Fehérje
 <213> Homo sapiens
 <400> 54
 Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 1 5 10 15
 Ser

<210> 55
 <211> 48
 <212> DNS
 <213> Homo Sapiens
 <400> 55
 gagcgggggtg agaccggtct atattacccc tattactaca tagacgtc 48

<210> 56
 <211> 16
 <212> Fehérje
 <213> Homo sapiens
 <400> 56
 Glu Arg Gly Glu Thr Gly Leu Tyr Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Ile Asp Val
 1 5 10 15

<210> 57
 <211> 42
 <212> DNS
 <213> Homo Sapiens
 <400> 57
 actggaacca gaagtgacgt tgggtggttat aactatgtct cc 42

<210> 58
 <211> 14
 <212> Fehérje
 <213> Homo sapiens
 <400> 58
 Thr Gly Thr Arg Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser
 1 5 10

<210> 59
 <211> 21
 <212> DNS
 <213> Homo Sapiens
 <400> 59
 gatgtcagta atcggccctc a 21

<210> 60
 <211> 7
 <212> Fehérje
 <213> Homo sapiens
 <400> 60
 Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser
 1 5

<210> 61
 <211> 33
 <212> DNS
 <213> Homo Sapiens
 <400> 61
 agctcatata caagcagcag cactctcggg gtg

33

<210> 62
 <211> 11
 <212> Fehérje
 <213> Homo sapiens
 <400> 62
 Ser Ser Tyr Thr Ser Ser Ser Thr Leu Gly Val
 1 5 10



SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Rekombináns, monoklonális antitest vagy antitest fragmens, amely az IgE Cε3 régió nagy affinitású IgE receptorhoz történő kötődését gátló BSW17 antitestre anti-idiotípusos, vagyis egy mimotest, és a SEQ ID NO 35, 36, 37 és 38 szekvenciák szerinti, 4. ábrán bemutatott könnyűlánc dimert vagy két Fab fragmens egyikét tartalmazza, vagy azokból áll, minélfogva az abban lévő konstans régiók a legfeljebb 5 aminosav hosszúságú, azt fedő sztérikus módosításokat is magukban foglalják, amint az allotípusos variánsokban található.
2. Az 1. igénypont szerinti mimotest, amely az 5a, 5b, 5c vagy 5d ábrán bemutatott SEQ ID NO 2, 4, 6 és 8 aminosav szekvenciából áll vagy azt tartalmazza, minélfogva az abban lévő konstans régiók a legfeljebb 5 aminosav hosszúságú azt fedő sztérikus módosításokat is magukban foglalják, amint az allotípusos variánsokban található.
3. Az 1. igénypont szerinti mimotest, amely az 5a ábrán bemutatott SEQ ID NO 2 és 40, 42 és 44, 5b ábrán bemutatott SEQ ID NO 4 és 46, 48 és 50, 5c ábrán bemutatott SEQ ID NO 6 és 52, 54 és 56 vagy az 5d ábrán bemutatott SEQ ID NO 8 és 58, 60 és 62 szekvenciák szerinti egy, vagy két, vagy három CDR-ből áll, vagy azt tartalmazza, adott esetben egy legfeljebb 10 aminosav hosszúságú szomszédos szerkezeti szekvenciával együtt az egyik vagy mindegyik CDR-végen.

4. Az 1. igénypont szerinti mimotest, amely az 52-es és 43-as klónok esetében a 6. ábrán meghatározott szekvenciák legalább egyikéből áll, vagy azt tartalmazza, amelyek homológok a humán IgE Cs3 SEQ ID NO 26, 28, 30, 32 és 34 szekvenciájú doménjével.

5. Gyógyszerkészítmény, előnyösen egy vakcina, amely az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti mimotestből áll, vagy azt tartalmazza egyedi molekulaként, vagy egy immunogén hordozó molekulához kémiaiilag kapcsolt fehérje konjugátumként, egy megfelelően alkalmas adjuvánssal és további hagyományos kötőanyagokkal együtt.

6. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti mimotest gyógyszerkészítményként történő alkalmazásra az IgE-közvetített betegségek kezelésében.

7. Eljárás az IgE-közvetített betegségek kezelésére, azzal jellemezve, hogy az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti mimotest terápiásan hatékony mennyiségét adjuk be az ilyen kezelésre rászoruló betegnek.

8. Eljárás az asztma, atopikus bőrgyulladás, nátha, krónikus csalánkiütés vagy élelmiszer-allergia kezelésére vakcinálás segítségével, azzal jellemezve, hogy az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti mimotest terápiásan hatékony mennyiségét adjuk be az ilyen kezelésre rászoruló betegnek.

9. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti mimotest alkalmazása mimotest elleni poliklonális vagy monoklonális antitestek termelésére passzív immunizálással.

10. Az IgE Cε3 régió nagy affinitású IgE receptorhoz történő kötődését gátló BSW17 antitest alkalmazása az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti mimotest azonosítására.

60 oldal leírás

20 oldal rajz

80 oldal



A meghatalmazott

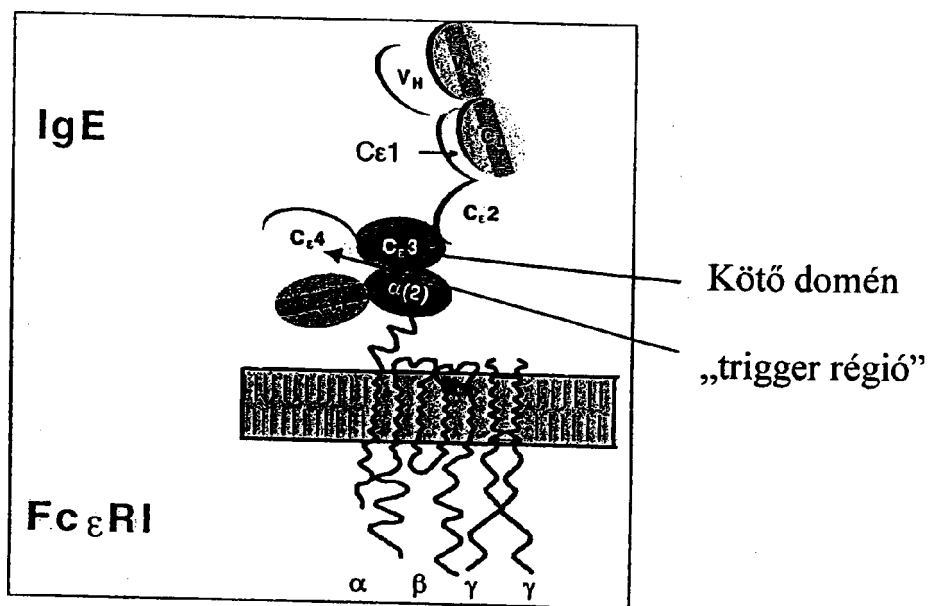

Somlai Mária
szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. & K. Szabadalmi Ügyvivői Iroda
tagja
H-1062 Budapest, Andrásy út 113.
Telefon: 461-1000 Fax: 461-1099

P02 00/13

20/1

1. Ábra

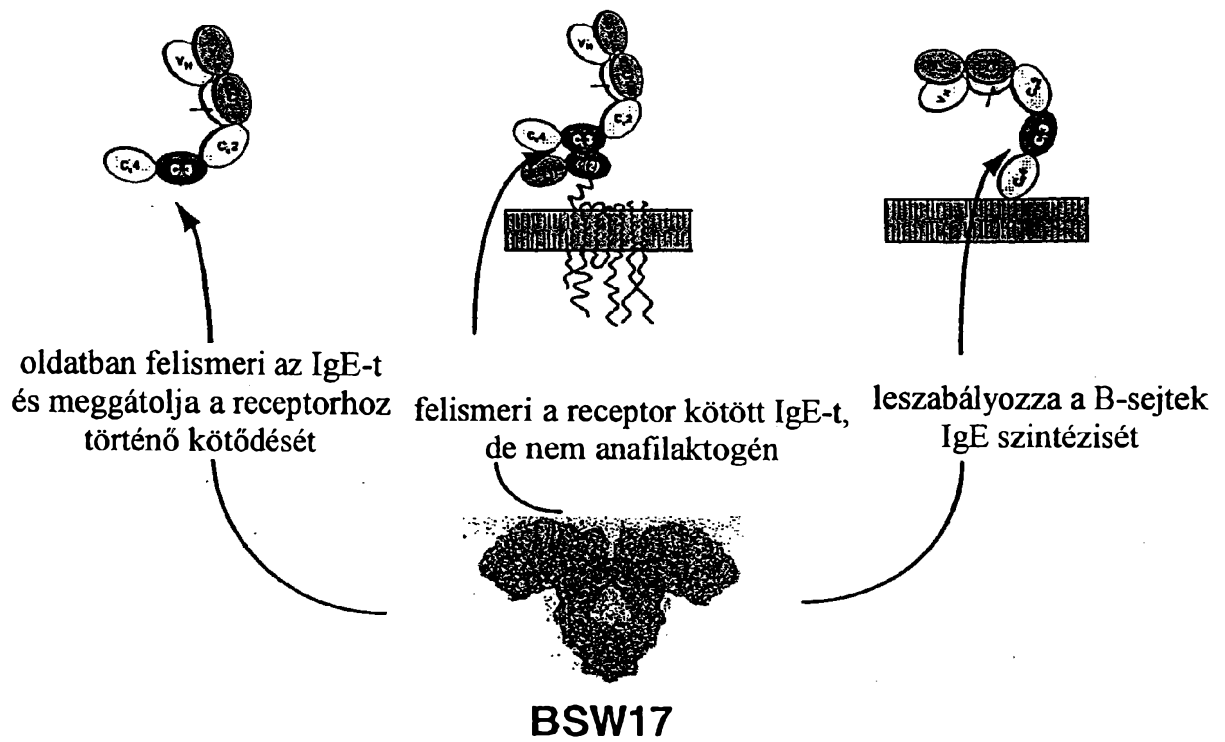
Az IgE és a nagy affinitású receptora közötti kölcsönhatás



20/2

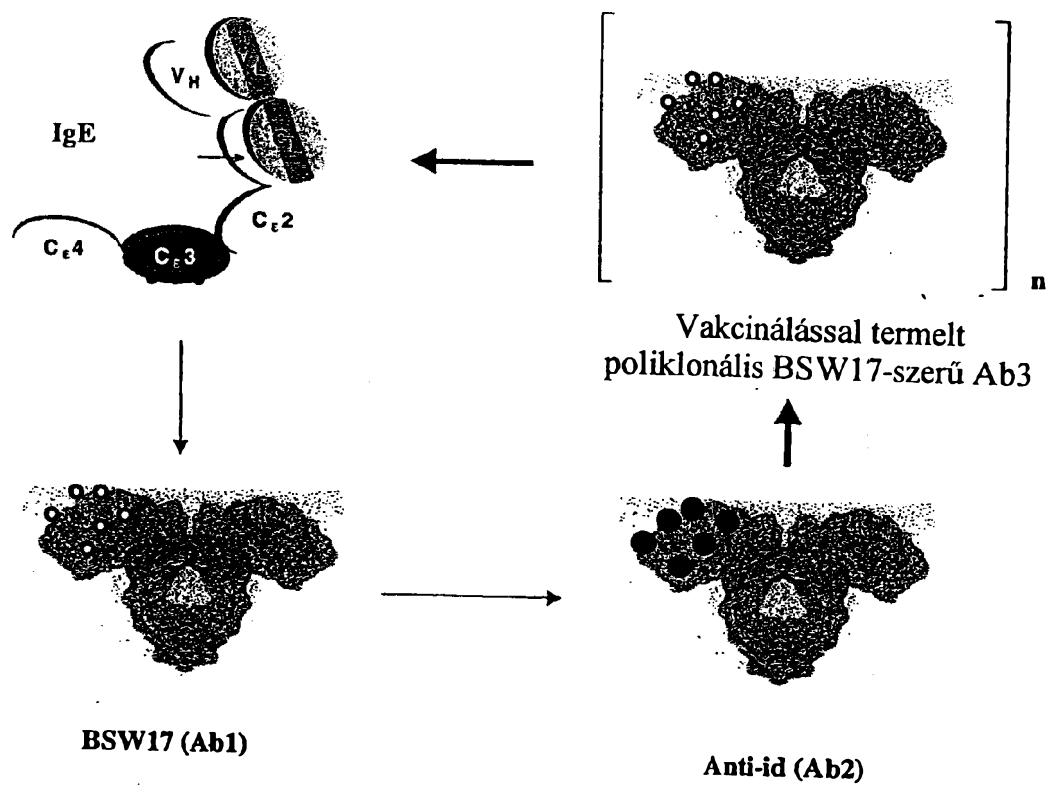
2. Ábra

A monoklonális anti-hIgE BSW17 antitest tulajdonságai



20/3

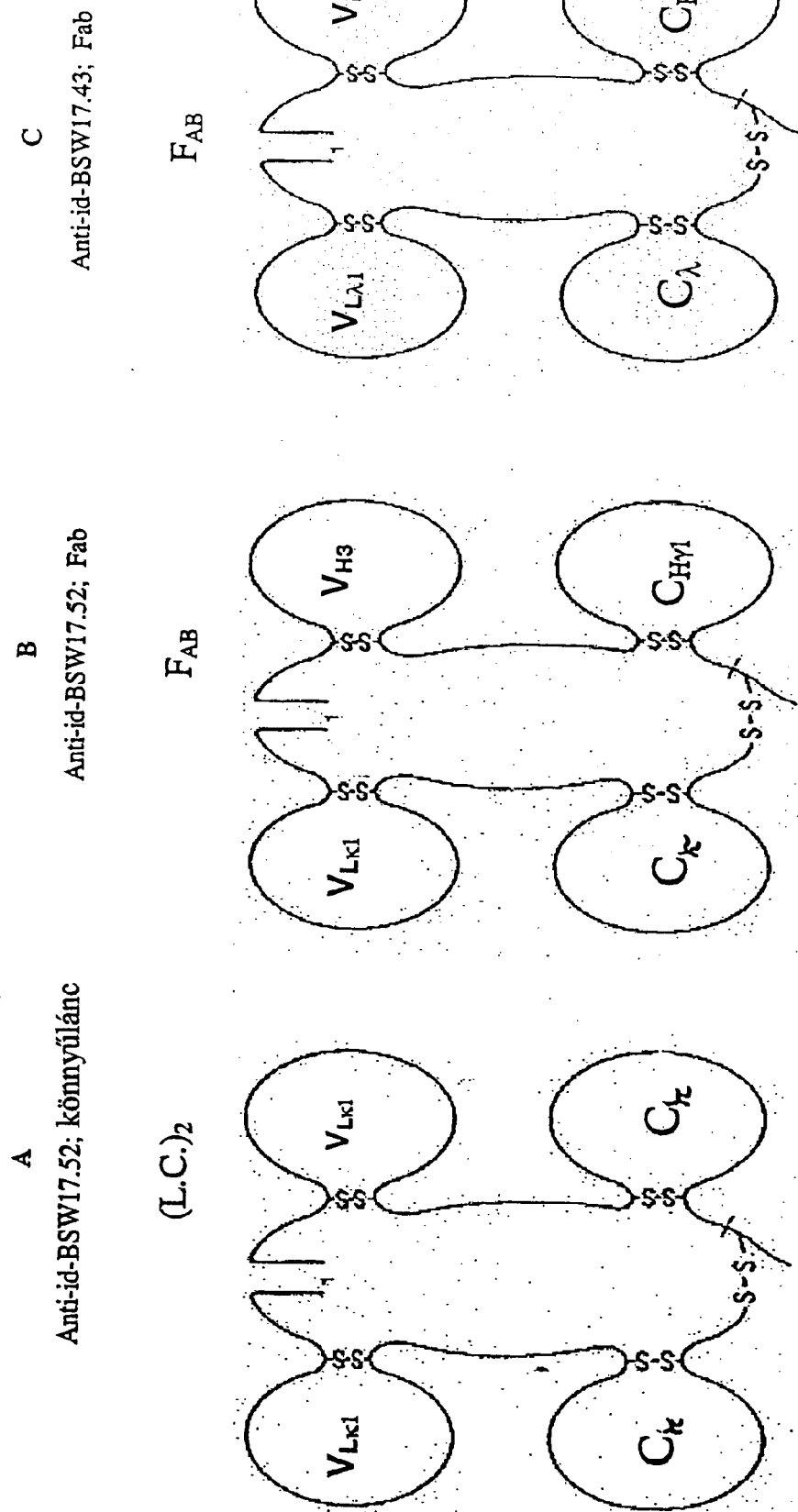
3. Ábra
Az anti-idiotípusos hálózat



20/4

4. Ábra

A rekombináns mimotestek sematikus szerkezete



17880

5a. Ábra

Anti-BSW17 Fab 52-es klón: variábilis nehézlánc: A bakteriofág-bemutató humán immunglobulin DNS szekvencia és az ebből származtatott aminosav szekvencia.
A hipervariábilis régiókat (Komplementaritást Meghatározó Régiók; CDR) dőlt betűk mutatják.

5'	CAG	GTG	AAA	CTG	CTC	GAG	TCG	GGG	GGA	GGC	CTG	GTC	AAG	CCT	GGG	GGG	TCC	CTG	
	Q	V	K	L	L	E	S	G	G	G	L	V	K	P	G	G	S	L	
	AGA	CTC	TCC	TGT	GCA	GTC	TCT	GGA	TTC	ACC	TTC	AGT	AAC	TAT	AAT	ATG	AAC	TGG	
	R	L	S	C	A	V	S	G	F	T	F	S	N	Y	N	M	N	W	
	GTC	CGC	CAG	GCT	CCA	GGG	AAG	GGA	CTA	GAG	TGG	GTC	TCA	TCC	ATT	AGT	AGT	CGA	
	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	S	S	I	S	S	R	
	AAT	TCT	TAC	ATA	TAC	TAC	GCA	GAC	TCA	GTG	AAG	GGC	CGA	TTC	ACC	ATC	TCC	AGA	
	N	S	Y	I	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	
	GAC	AAC	GCC	GAG	AGT	ACC	TTG	TAT	CTG	CAA	ATG	GAC	AAC	CTG	GGA	GTC	GAA	GAC	
	D	N	A	E	S	T	L	Y	L	Q	M	D	N	L	G	V	E	D	
	ACG	GCT	GTC	TAT	TTT	TGT	ACG	AGC	GGC	CGC	CTT	TTC	GAC	TAC	TGG	GGC	CAG	GGA	
	T	A	V	Y	F	C	T	S	G	R	L	F	D	Y	W	G	Q	G	
	ACC	CTG	GTC	ACC	GTC	TCC	TCT	3'											
	T	L	V	T	V	S	S												



5b. Ábra

Anti-BSW17 Fab 52-es klón: variábilis könnyűlánc: A bakteriofág-bemutató humán immunglobulin DNS szekvencia és az ebből származtatott aminosav szekvencia.

A hipervariábilis régiókat (Komplementaritási Meghatározó Régiók; CDR) dőlt betűk mutatják.

5'	GTG	ATG	ACC	CAG	TCT	CCA	TCC	TCA	CTG	TCT	GCA	TCT	GAC	AGA	GTC	ACC
	V	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	D	R	V	T
	ATC	ACT	TGT	CGG	GCT	AGT	CAG	GGC	ATT	AAC	AAT	TTA	GCC	TTT	CAG	Q
	I	T	C	R	A	S	Q	G	I	N	N	L	A	F	Q	Q
	AAA	CCA	GGG	AAA	GCC	CCT	AAG	TCC	CTG	ATC	TAT	AGT	TCC	ATT	TTG	CAA
	K	P	G	K	A	P	K	S	L	I	Y	S	A	I	L	Q
	GGG	GTC	CCA	TCC	AAG	TTC	AGC	GGC	AGT	GGA	TCT	GGG	ACA	GAT	CTC	ACC
	G	V	P	S	K	F	S	G	S	G	S	G	T	D	T	T
	ATC	AGC	AAC	CTG	CAG	CCT	GAA	GAT	TTT	GCA	ACT	TAT	TGC	CAA	TAT	AAT
	I	S	N	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	C	Q	Y	N
	TAT	TAT	CCG	CTC	ACT	TTC	GGC	GGG	GGG	ACC	AAG	GTG	GAG	ATC	AAA	3'
	Y	Y	P	L	T	F	G	G	G	T	K	V	E	I	K	

.....

5c. Ábra

Anti-BSW17 Fab 43-as klón: variábilis nehézlánc: A bakteriofág-bemutató humán immunglobulin DNS szekvencia és az ebből származtatott aminosav szekvencia.

A hipervariábilis régiókat (Komplementaritást Meghatározó Régiók; CDR) dőlt betűk mutatják.

5'	CAG	GTG	AAA	CTG	CTC	GAG	TCG	GGC	CCA	CCA	GTG	GTG	AAG	CCT	TCG	GAG	ACC	CTG	54
	Q	V	K	L	L	E	S	G	P	P	L	V	K	P	S	E	T	L	
	TCC	CTC	ACC	TGC	ACT	GTC	TCT	GGT	GGC	GGC	ATC	AGC	AGT	GGT	GGT	TAC	TAC	TGG	108
	S	L	T	C	T	V	S	G	G	G	I	S	S	G	G	Y	Y	W	
	ACC	TGG	ATC	CGC	CAG	CGC	CCA	GGG	AGG	AGG	CTG	GAG	TGG	ATT	CGA	TAC	ATC	TAT	162
	T	W	I	R	Q	R	P	G	K	K	L	E	W	I	G	Y	I	Y	
	TAC	AGT	GGG	AGC	ACC	TCC	TAC	AAC	CCG	CCG	CTC	AAG	AGT	CGA	GTC	ACC	ATG	TCA	216
	Y	S	G	S	T	S	Y	N	P	P	L	K	S	R	V	T	M	S	
	GTG	GAC	ACG	TCT	AAA	AAC	CAG	TTC	TCC	TCC	CTG	AGG	CTG	ACC	GTG	ACT	GCC	GCG	270
	V	D	T	S	K	N	Q	F	S	S	L	R	L	T	V	T	A	A	
	GAC	ACG	GCC	GTC	TAT	TAC	TGT	GCG	CGA	CGA	GGG	GGT	GAG	ACC	GGT	CTA	TAT	TAC	324
	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	R	E	R	E	T	G	L	Y	Y	
	CCC	TAT	TAC	TAC	ATA	GAC	GTC	TGG	GGC	ACA	GGG	ACC	ACC	GTC	ACC	GTC	TCC	TCA	378
	P	Y	Y	Y	I	D	V	W	G	T	G	T	T	V	T	V	S	S	3'



5d. Ábra

Anti-BSW17 Fab 43-as klón: variábilis könnyűlánc: A bakteriofág-bemutató humán immunglobulin DNS szekvencia és az ebből származtatott aminosav szekvencia.

A hipervariábilis régiókat (Komplementaritást Meghatározó Régiók; CDR) dőlt betűk mutatják.

5'	GAG	CTC	GTG	GTG	ACT	CAG	CCT	GCC	TCC	GTG	TCT	GGG	TCT	CCT	GGA	CAG	TCG	ATC	54
	E	L	V	V	T	Q	P	A	S	V	S	G	S	P	G	Q	S	I	
	ACC	ATC	TCC	TGC	ACT	GGG	ACC	AGA	AGT	GAC	GTT	GGT	GGT	TAT	AAC	TAT	GTC	TCC	108
	T	I	S	C	T	G	T	R	S	D	V	G	G	Y	N	Y	V	S	
	TGG	TAC	CAA	CAA	CAC	CCA	GGC	AAA	GCC	CCC	AAA	CTC	ATG	ATT	TAT	GAT	GTC	AGT	162
	W	Y	Q	Q	H	P	G	K	A	P	K	L	M	I	Y	D	V	S	
	AAT	CGG	CCC	TCA	GGG	GTT	TCT	AAT	CGC	TTC	TCT	GGC	TCC	AAG	TCT	GGC	AAC	ACG	216
	N	R	P	S	G	V	S	N	R	F	S	G	S	K	S	G	N	T	
	GCC	TCC	CTG	ACC	ATC	TCT	GGG	CTC	CAG	GCT	GAG	GAC	GAG	GCT	GAT	TAT	TAC	TGC	270
	A	S	L	T	I	S	G	L	Q	A	E	D	E	A	D	Y	Y	C	
	CDR3	TCA	TAT	ACA	AGC	AGC	AGC	ACT	CTC	GGG	GTG	TTC	GGC	GGG	ACC	AAG	AAG	TTG	324
	S	S	Y	T	S	S	S	S	L	G	V	F	G	G	T	T	K	L	
	ACC	GTC	CTA	GGT	CAG	CCC	3'												
	T	V	L	G	Q	P													

.....
.....
.....
.....
.....

6. Ábra

Az anti-BSW17 rFab és a humán IgE Cε3 domén közötti aminosav szekvencia homológia

A

Anti-Id Fab, 52-es klón; nehézlánc:

370	V	N	L	T	W	S	R	-	A	G	G	K	P	V	N	383
	Y	N	M	N	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	

hIgE, Cε 3
52-es klón

CDR 1

FR 2

Anti-Id Fab, 52-es klón; könnyűlánc; 1. sorozat:

343	P	S	P	F	D	L	F	T	R	K	S	P	T	I	T	C	358
	P	S	S	L	S	A	S	M	G	D	R	V	T	I	T	C	

hIgE, Cε 3
52-es klón

FR 1

Anti-Id Fab, 52-es klón; könnyűlánc; 2. sorozat

370	V	N	L	T	W	R	A	S	-	G	379
	V	T	L	T	-	R	A	S	Q	G	

hIgE, Cε 3
52-es klón

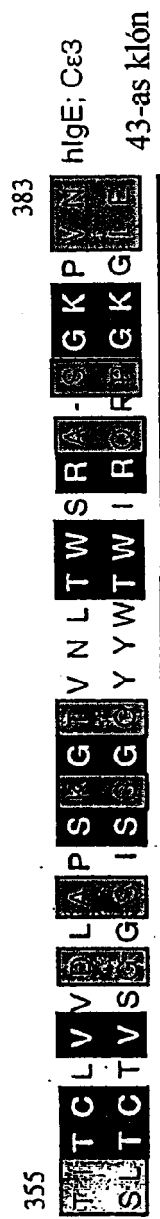
FR 1

CDR 1

370 379 383



Anti-Id Fab, 43-as klón; nehézlánc:

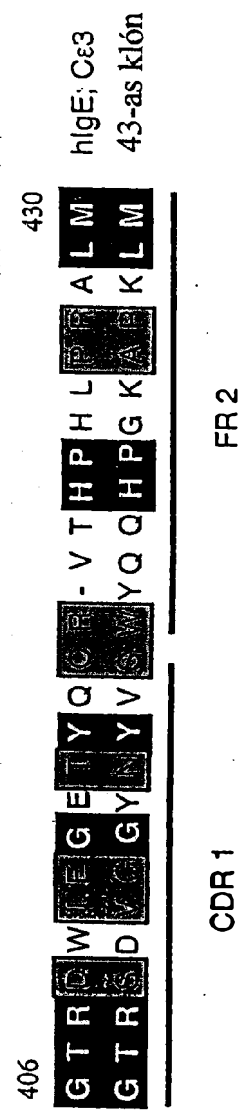


FR 2

CDR 1

FR 1

Anti-Id Fab, 43-ās klón; könnyűlánc:

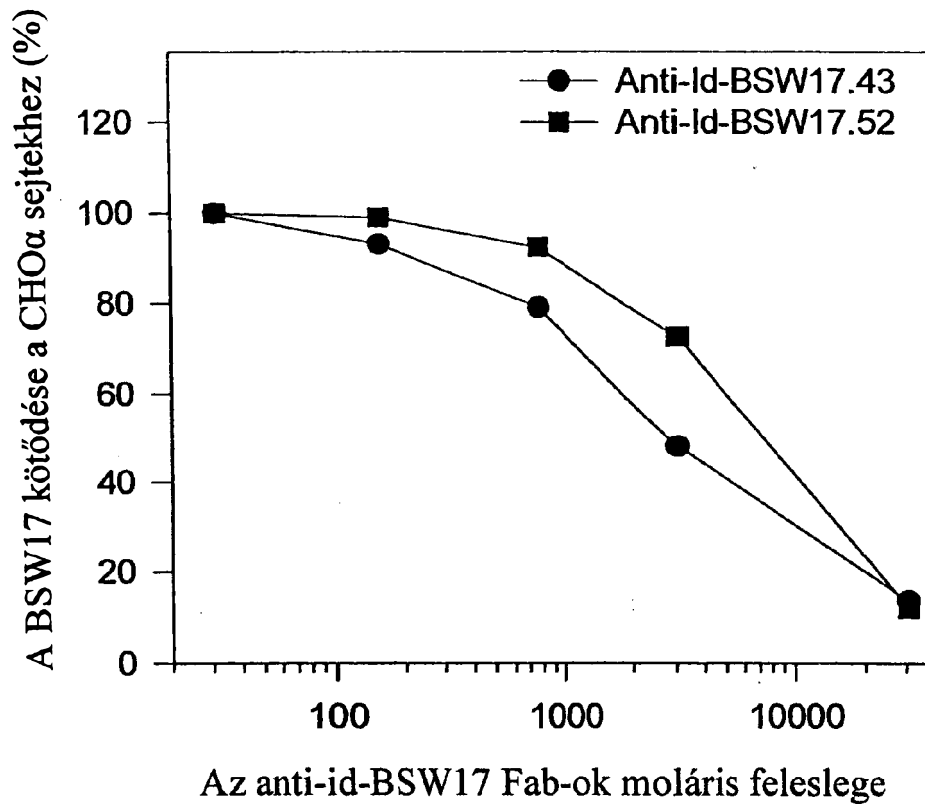


A 4x4 grid of black dots forming the word 'WISDOM'. The dots are arranged in a pattern that is 4 rows high and 4 columns wide. The word 'WISDOM' is formed by the dots, with each letter being 2 rows high and 2 columns wide. The dots are arranged in a pattern that is 4 rows high and 4 columns wide. The word 'WISDOM' is formed by the dots, with each letter being 2 rows high and 2 columns wide.

20/11

7. Ábra

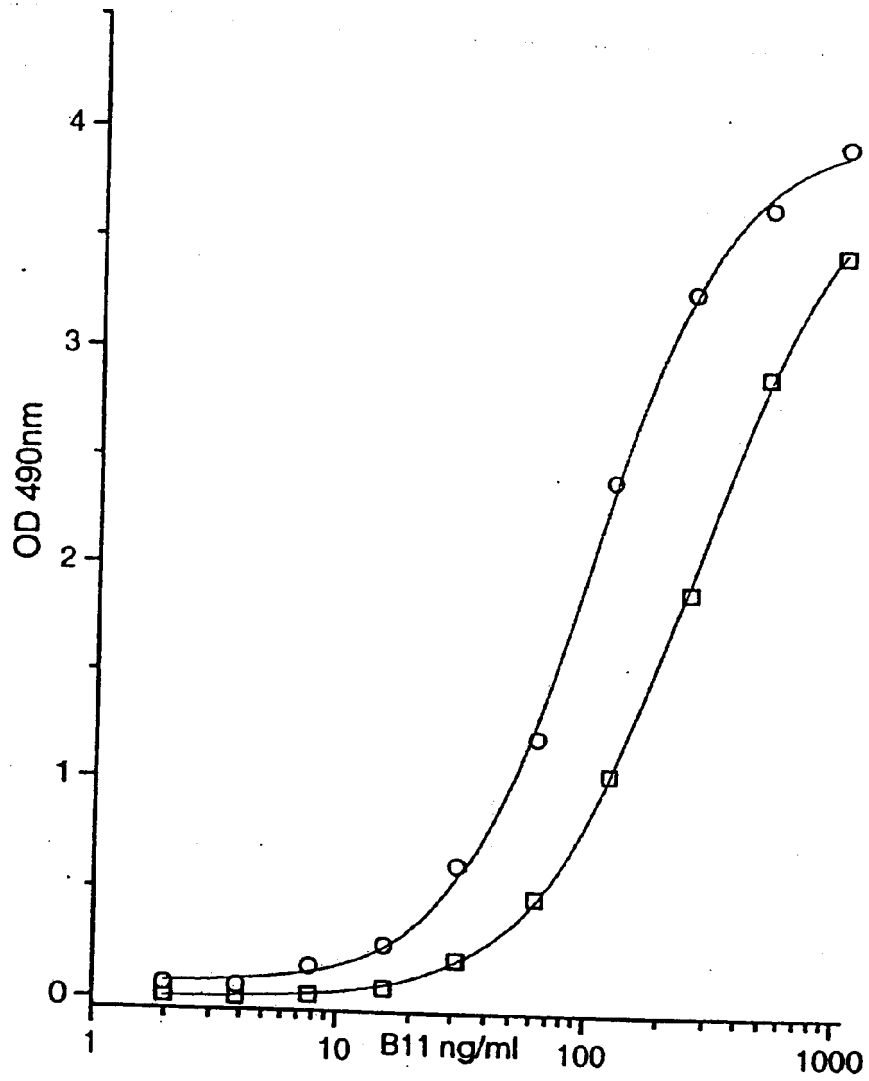
Az anti-id BSW17 rFab kompetitív kötődése az IgE-telített CHO α sejteken
FITC-jelzett BSW17-tel



20/12

8. Ábra

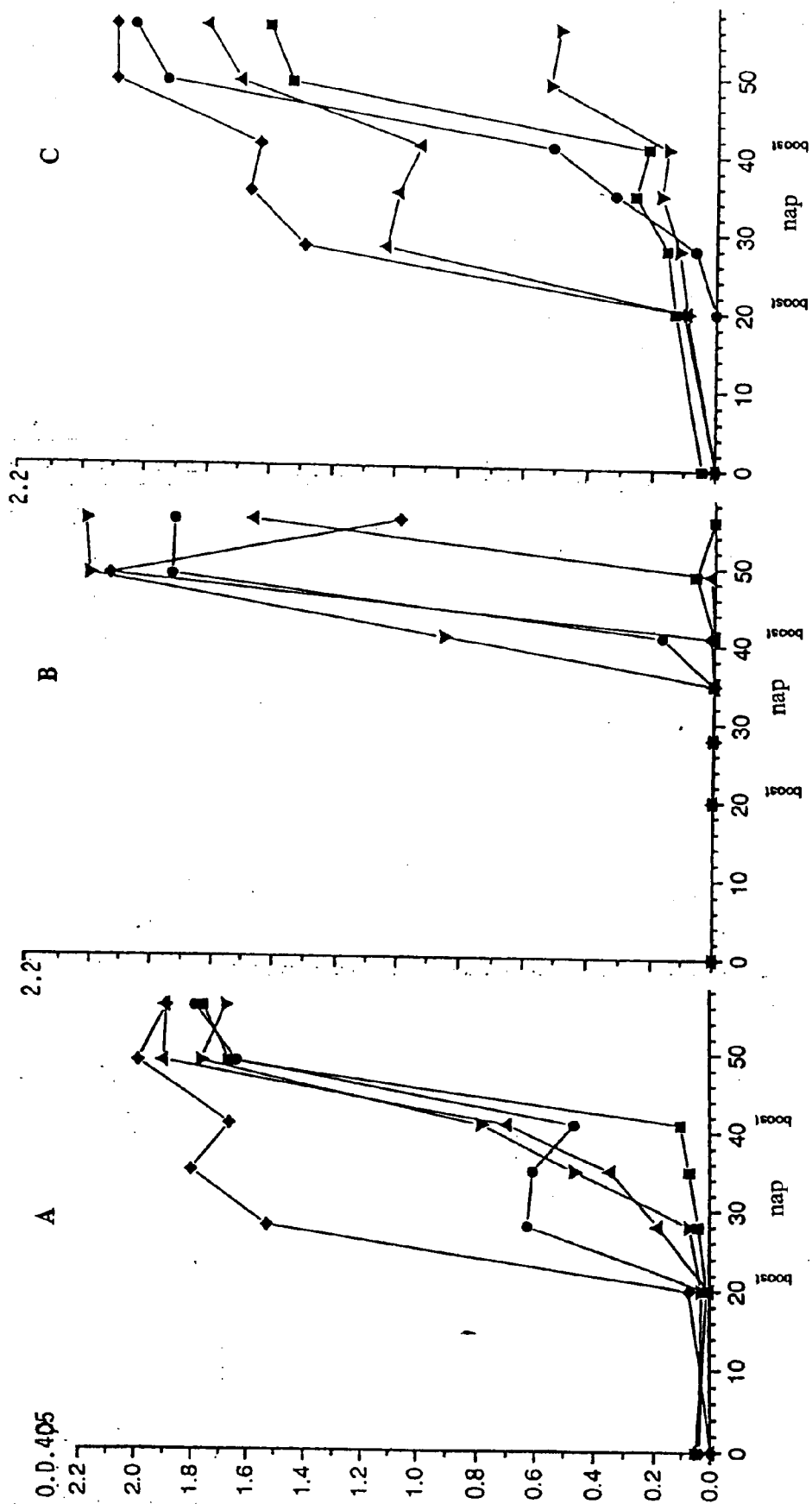
Az affinitással tisztított nyúl anti-BSW17 mimotest immunglobulinok kötődése a humán IgE-hez



20/13

9. Ábra

Anti-B Σ W17 mimotest immunválasz a Balb/c egerekben



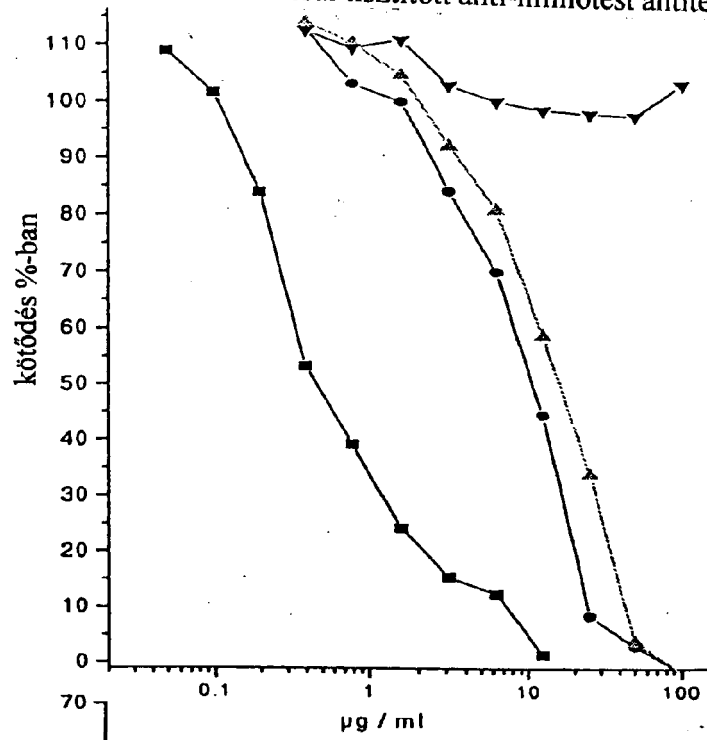
47880

20/14

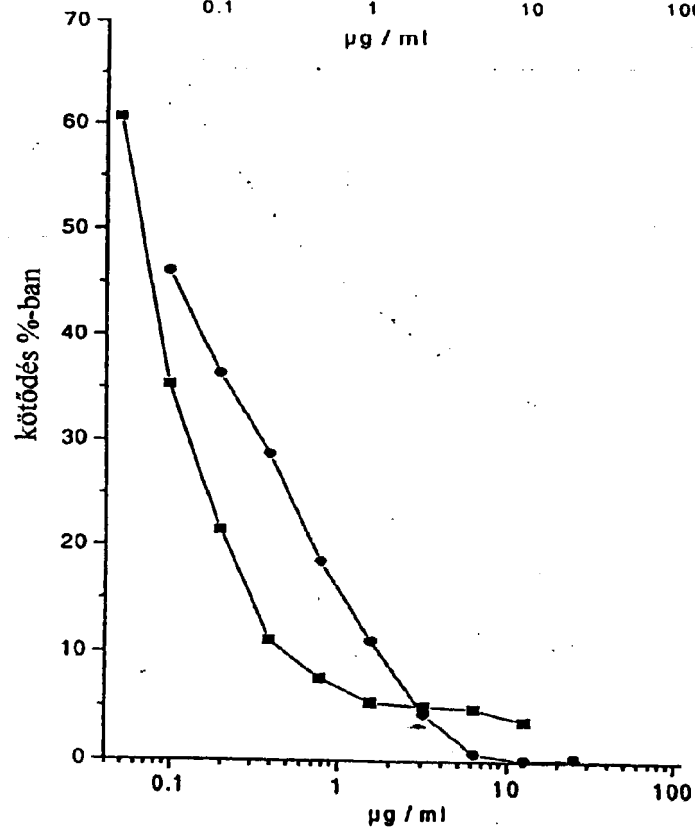
10. Ábra

A hIgE/FcεRIα kötődés gátlása immunaffinitással tisztított anti-mimotest antitestekkel

A



B

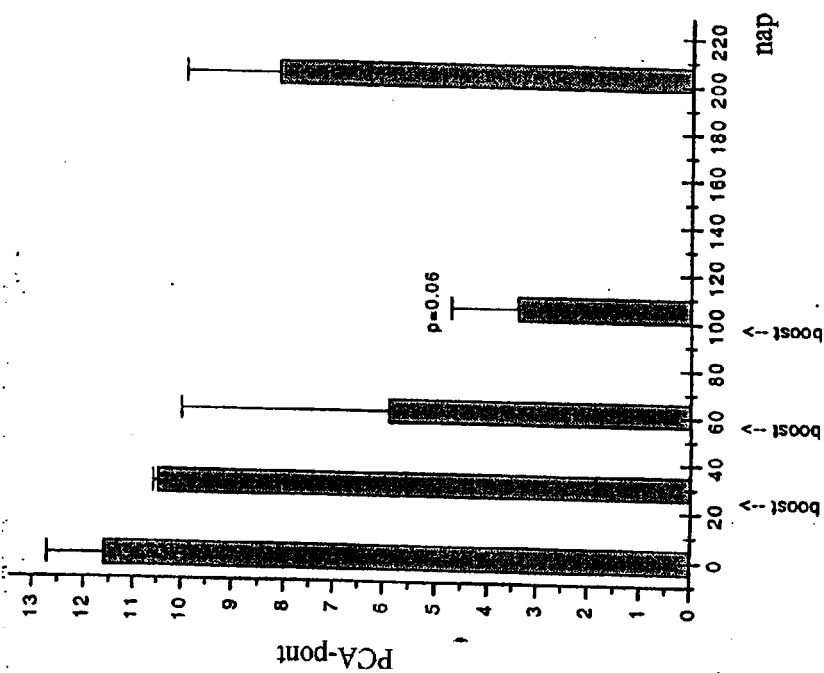


20/15

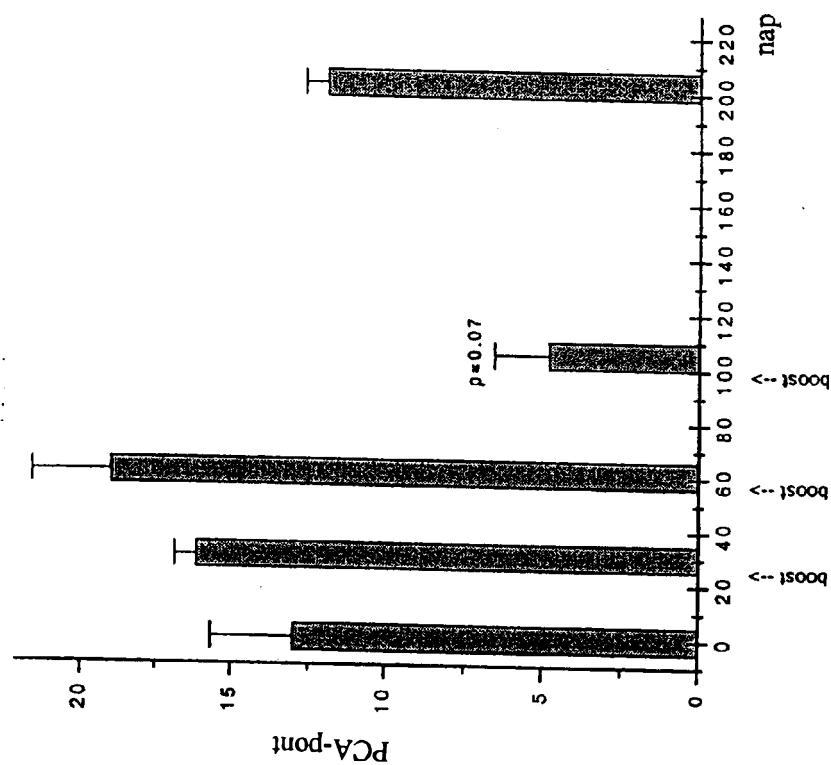
11. Ábra

A különböző mimotest készítményekkel immunizált rhesus majom csoportok (n=2)
PCA-pont profiljai

A: Immunogén: anti-id-BSW 17.52; intrakután (SDS426)

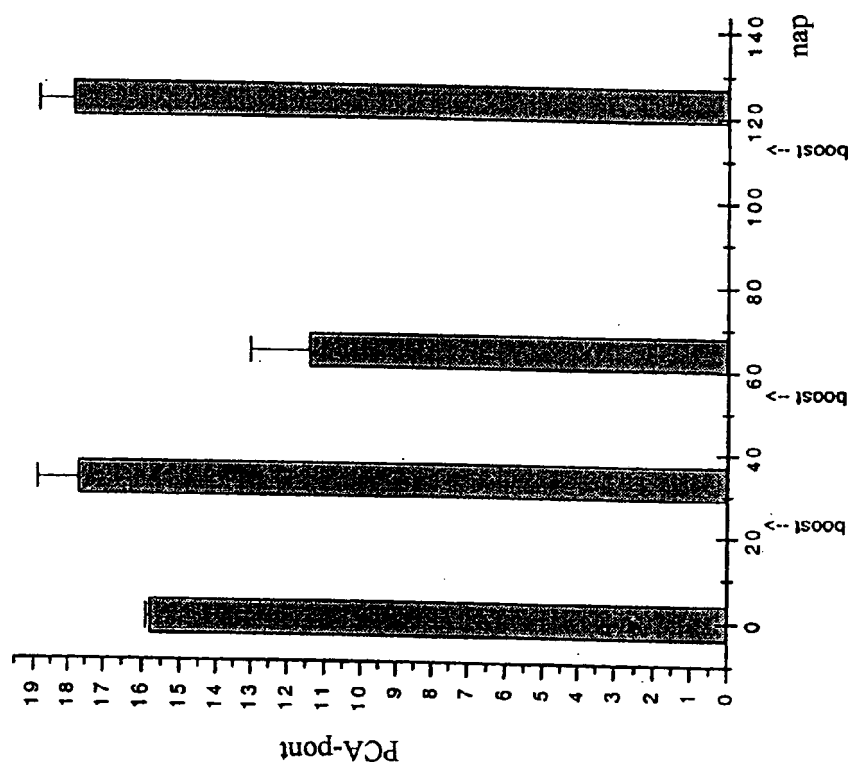


B: Immunogén: anti-id-BSW 17.52; Fab (SDS427)



20/16

C: Immunogén: anti-id-BSW 17.43; Fab (SDS463)



0.7880

12a. Ábra

Anti-BSW17 52-es klón; a nehézlánc variábilis és első konstans doménje

Q	V	K	L	L	E	S	G	G	G	L	V	K	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	V	S
G	F	T	F	S	N	Y	N	M	N	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	S	S
I	S	S	R	N	S	Y	I	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	A
E	S	T	L	Y	L	Q	M	D	N	L	G	V	E	D	T	A	V	Y	F	C	T	S	G	R
L	F	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	A	S	T	K	G	P	S	V	F	P
L	A	P	S	S	K	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E
P	V	T	V	S	W	N	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S
G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C	N	V
N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	A	E	P	K	S	C							

57880

12b. Ábra

Anti-BSW17 52-es klón; a kappa könnyűlánc variábilis és konstans doménje

V	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q
G	I	N	N	Y	L	A	W	F	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	S	L	I	Y	S	A	S
I	L	Q	S	G	V	P	S	K	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	N
L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	N	Y	Y	P	L	T	F	G	G	T	
K	V	E	I	K	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P	P	S	D	E	Q	L	K	S	G
T	A	S	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A
L	Q	S	G	N	S	Q	E	S	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T
L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S
P	V	T	K	I	F	N	R	G	E	C														

12c. Ábra

Anti-BSW17 43-as klón; a nehézlánc variábilis és első konstans doménje

Q	V	K	L	L	E	S	G	P	G	L	V	K	P	S	E	T	L	S	L	T	C	T	V	S
G	G	S	I	S	S	G	G	Y	Y	T	W	W	I	R	Q	R	P	G	K	G	L	E	W	I
G	Y	I	Y	Y	S	G	S	T	S	Y	N	P	S	L	K	S	R	V	T	M	S	V	D	T
S	K	N	Q	F	S	L	R	L	T	S	V	T	A	A	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	E
R	G	E	T	G	L	Y	Y	P	Y	Y	Y	I	D	V	W	G	T	G	T	T	V	T	V	S
S	A	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G	T	A	A	
L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W	N	S	G	A	L	T	S	G
V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S
S	L	G	T	Q	T	Y	I	C	N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	A	E
P	K	S	C																					

4300

12d. Ábra

Anti-BSW17 43-as klón; a lambda variábilis és konstans doménje

E	L	V	V	T	Q	P	A	S	V	S	G	S	P	G	Q	S	I	T	I	S	C	T	G	T
R	S	D	V	G	G	Y	N	Y	V	S	W	Y	Q	Q	H	P	G	K	A	P	K	L	M	I
Y	D	V	S	N	R	P	S	G	V	S	N	R	F	S	G	S	K	S	G	N	T	A	S	L
T	I	S	G	L	Q	A	E	D	E	A	D	Y	Y	C	S	S	Y	T	S	S	S	T	L	G
V	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L	G	Q	P	Q	P	K	A	A	P	S	V	T	L	F
P	P	S	S	E	E	L	Q	A	N	K	A	T	L	V	C	L	I	S	D	F	Y	P	G	A
V	T	V	A	W	K	A	D	S	S	P	V	K	A	G	V	E	T	T	T	P	S	K	Q	S
N	N	K	Y	A	A	S	S	Y	L	S	L	T	P	E	Q	W	K	S	H	K	S	Y	S	C
Q	V	T	H	E	G	S	T	V	E	K	T	V	A	P	T	E	C	S						

53880